

Nr. Decizie Senat _____ din _____



TEZĂ DE DOCTORAT

**Intensificarea cu ajutorul US și/sau a MW a proceselor de
esterificare și de transesterificare ce utilizează catalizatori de tip
enzime sau de tip rășini**



Autor: ing. Anamaria Săulescu (Vartolomei)

Conducător de doctorat: Prof.dr.ing. Ioan CĂLINESCU

Președinte	Prof.dr.ing. Vasile Lavric	de la	FACSM, Universitatea Politehnica din București
Coordonator doctorat	Prof.dr.ing. Ioan Călinescu	de la	FACSM, Universitatea Politehnica din București
Referent	C.S.I.dr.ing. Filip Petru	de la	Centrul de Chimie Organică al Academiei Române
Referent	Conf.dr.chim. Christina Zălaru	de la	Facultatea de Chimie, Universitatea din București
Referent	Conf.dr.ing. Adina-Ionuța Gavrila	de la	FACSM, Universitatea Politehnica din București

București
-2022-

**Intensificarea cu ajutorul US și/sau a MW a proceselor de
esterificare și de transesterificare ce utilizează catalizatori de tip
enzime sau de tip rășini**

Rezumatul tezei

Autor: ing. Anamaria Săulescu (Vartolomei)
Conducător de doctorat: Prof.dr.ing. Ioan CĂLINESCU

Cuprins

Partea I- STUDIU DE LITERATURA	5
A. Reacția de esterificare	5
1. Esteri—utilizări în industria alimentară și în compoziția parfumurilor	5
2. Esterificarea Enzimatică	5
3. Esterificarea cu Rașini Schimbătoare de Ioni	6
4. Transesterificarea Enzimatică	6
Partea II-STUDIU EXPERIMENTAL	7
A. Esterificarea în Prezența Enzimelor-Metode de Intensificare a Procesului.....	7
Obiectivele Cercetării	7
A1. Esterificare Enzimatică în Regim Discontinuu.....	8
Materiale și Metode	8
Rezultate și Discuții	9
Concluzii Parțiale.....	11
A2. Esterificare Enzimatică într-un reactor tip “Loop” Ultrasunetele Aplicate cu Baia de Ultrasunete	11
Materiale și Metode	11
Rezultate și Discuții	12
Concluzii Parțiale.....	13
A3. Esterificare Enzimatică într-un reactor tip “Loop” - Ultrasunetele Aplicate cu Sonda de Ultrasunete	13
Materiale și Metode	14
Rezultate și Discuții	16
Concluzii Parțiale.....	20
Obiectivele Cercetării	20
B.1. Esterificarea cu Rașini Acide- Intensificarea cu US.....	21
Materiale și Metode	21
Rezultate și Discuții	21
Concluzii Parțiale.....	23

C. Transesterificarea Enzimatică—Metode de intensificare a procesului.....	23
Obiectivele Cercetării	23
Materiale și Metode	24
C1. Transesterificarea enzimatică—Procedeu Discontinuu-MMM Clamp-On	24
Materiale si Metode	24
Rezultate și Discuții	24
Concluzii Parțiale	27
C2. Transesterificare Enzimatică -reactorul de tip “Loop”	27
Concluzii Parțiale	28
C3. Transesterificare Enzimatică-Baia Rheus	28
Materiale și Metode	28
Concluzii Parțiale	30
D. Concluzii Generale.....	31
E. Contribuții Proprii	33
F. Direcții Viitoare de Cercetare	34
G. Lista Publicațiilor	34
Bibliografie	36

Cuvinte cheie: reacție de esterificare; reacție de transesterificare; cataliza enzimatică; enzime; intensificarea proceselor cu ultrasunete

Notă: Notațiile capitolelor, subcapitolelor și respectiv ale figurilor și tabelor din acest document sunt aceleași cu cele existente în teza de doctorat.

Partea I- STUDIU DE LITERATURA

A. Reacția de esterificare

1. Esteri—utilizări în industria alimentară și în compoziția parfumurilor

Esterii sunt una dintre cele mai importante clase de compuși organici. Esterii organici sunt folosiți ca solvenți, arome, parfumuri și precursori într-o varietate de industrii. În particular, esterii alifatici sunt utilizați ca arome în industria alimentară și esterii aromatici sunt folosiți în compoziția parfumurilor [1]. Esterii sintetizați din acizi cu lanț scurt și alcooli sunt larg folosiți ca și arome și odorante în industria alimentară, industria medicamentelor și în industria cosmetică [2]. Odorantele sunt folosite în deodorante, creme depilatoare, săpunuri și creme demachiante, iar aromele sunt folosite în rujuri, balsamuri de buze, glosuri de buze și pastă de dinți [3]. Acizii cu lanț scurt de atomi de carbon, cum sunt acidul acetic, acidul butiric și acidul propionic, împreună cu alcooli, precum butanol, etanol, alcool izoamilic, geraniol, citronelol și 1-metanol, au fost folosiți pentru sinteza de arome și odorante [4].

Printre aceste produse, esterii de izoamil (în special acetatul de izoamil) sunt folosiți în industria alimentară (74.000 kg/an) datorită aromei puternice de banană [2].

2. Esterificarea Enzimatică

Esterii naturali extrași din plante și utilizați drept arome sunt adesea fie insuficienți, fie prea scumpi pentru uzul comercial. Pentru multe produse industriale, aromele sunt obținute prin sinteză chimică și nu sunt considerate produse naturale. Din acest motiv, valoarea pe piață a acestora este mai mică decât a esterilor obținuți din surse naturale [5]. Acești esterii sunt însă considerați "verzi" atunci când sunt obținuți prin sinteză mediată de lipaze. Biotransformările catalizate de lipaze în medii neapoase au început să capete importanță datorită proprietăților remarcabile, cum ar fi îmbunătățirea termostabilității, specificitatea regio, stereo și de substrat, condiții mai blânde de reacție și nevoia unei cantități mai mici de energie. Lipazele au fost folosite pentru esterificarea directă și reacții de transesterificare în solvenți organici pentru producerea de esterii ai glicerinei, alcooli alifatici și alcooli terpenici [6]. Totuși, esterificarea acizilor cu lanț scurt cu alcooli nu a primit prea multă atenție. Mai mult, substraturile cu masă moleculară mică se pare că au o afinitate mai mică pentru aceste enzime, comparativ cu substraturile cu lanț lung, deoarece aceste molecule au un efect inhibitor asupra enzimei. Aplicațiile industriale ale lipazelor prezintă un potențial bun pentru obținerea unui număr de esterii importanți din punct de vedere comercial [7]. Pentru obținerea conversiei maxim posibile este nevoie de optimizarea parametrilor ce afectează sinteza biocatalizată a esterilor. Un impact important în activitatea enzimatică și în conversia obținută în sinteza esterilor îl au parametrii de operare, temperatura, cantitatea de enzimă,

raportul molar alcool:acid [8]. Acești parametri afectează și costul total al procesului. Din acest motiv, este util să discutăm despre aceste variabile și să oferim niște indicații bazate pe literatura de specialitate și pe lucrările de cercetare din acest domeniu.

3. Esterificarea cu Rășini Schimbătoare de Ioni

Cererea anuală de acetat de izoamil este mai mare de 90.000 kg [9]. Până în prezent, au fost utilizate mai multe căi sintetice și catalizatori pentru obținerea acestor esteri. Rășinile schimbătoare de ioni, drept catalizatori eterogeni, au fost folosite pentru cataliza diferitelor reacții ca esterificare, transesterificare, alchilare, acilare și alte transformări [10, 11].

Utilizarea catalizatorilor solizi acizi eterogeni poate depăși dezavantajele acizilor minerali, cum ar fi: coroziunea echipamentelor, selectivitate scăzută, contaminarea produsului și costurile de reciclare. Recent, Duque-Bernal [12] a raportat o expresie de viteză a reacției pentru esterificarea dintre acidul acetic și alcoolul izoamilic, în absența catalizatorilor. Au arătat că există un efect autocatalitic al acidului acetic asupra vitezei de reacție, iar constanta de echilibru poate fi considerată independentă de temperatură. Anterior, Teo [13] și Singh [14] au studiat cinetica acestei reacții de esterificare în cataliză eterogenă folosind rășina schimbătoare de ioni Purolite CT- 175. Prin urmare, catalizatorii de tip rășini schimbătoare de ioni au câștigat popularitate pentru că prezintă avantaje: sunt ecologici, non-corozivi, au o bună selectivitate și stabilitate termică [15]. Utilizarea rășinilor schimbătoare de ioni (IER) drept catalizatori prezintă avantaje distincte [81] față de cataliza omogenă:

- (a) puritatea produselor este mai mare, deoarece reacțiile secundare pot fi complet eliminate sau sunt semnificativ reduse;
- (b) catalizatorul poate fi îndepărtat cu ușurință din amestecul de reacție prin filtrare;
- (c) mediul coroziv cauzat de deversarea deșeurilor care conțin acid este eliminat.

4. Transesterificarea Enzimatică

Producția de biodiesel a câștigat importanța pentru capacitatea sa de a înlocui combustibilii fosili. Problemele de mediu cauzate de emisiile de gaze de eșapament prin utilizarea combustibililor fosili, sunt parte din motivele pentru care este încurajată utilizarea biodieselului care s-a dovedit a fi prietenoasă cu mediul înconjurător. Biodieselul este un amestec de esteri mono-alcilici obținuți din uleiuri vegetale, cum ar fi uleiul de soia, ulei de rapiță, ulei de palmier, ulei de floarea-soarelui, ulei de porumb, ulei de arahide, ulei de canola și ulei de bumbac [16]. În afară de uleiuri vegetale, biodieselul poate fi, de asemenea, produs din alte surse, cum ar fi grăsimi animale (seu, untură), uleiuri alimentare uzate, și alge [17].

Procesul de transesterificare se poate realiza folosind diverși catalizatori cum ar fi cei anorganici lichizi sau solizi (acizi sau baze) sau biocatalizatori (enzime). În procesul alcalin, hidroxidul de sodiu (NaOH) sau potasiu (KOH) este utilizat ca și catalizator, împreună cu metanol sau etanol. Acest proces este cel mai eficient și cel mai puțin coroziv dintre toate procesele și viteza de reacție este destul de mare, chiar și la o temperatură scăzută de 60 °C. Dacă are loc contaminarea cu acid sau cu apă se formează săpun, îngreunând procesul de

separare [18-20]. Un alt mod convențional de producere a biodieselului este folosirea unui catalizator acid în loc de o bază. Orice acid mineral poate fi folosit pentru a cataliza procesul; cei mai frecvenți acizi utilizați sunt acidul sulfuric și acizii sulfonici. Deși randamentul este mare, acizii, fiind corozivi, pot provoca daune echipamentului [21].

S-a constatat recent că enzimele, cum ar fi lipazele pot fi utilizate pentru a cataliza procesul de transesterificare. Pentru a ușura recuperarea acestora se preferă imobilizarea lor pe un suport adecvat. De asemenea, temperatura de funcționare a procesului este scăzută (50 °C) în comparație cu alte tehnici. Producerea de biodiesel folosind un biocatalizator elimină dezavantajele procesului alcalin prin obținerea unui produs de puritate foarte mare, cu mai puține operații auxiliare [61]. Enzima care catalizează reacția de obținere a biodieselului este o lipază, iar aceasta se poate obține de la microorganisme precum *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*. Au fost încercați diverși alcooli pentru procesul de transesterificare inclusiv metanol, etanol, isopropanol și butanol. Avantajele transesterificării enzimatică sunt purificarea ușoară a produsului secundar, condiții blânde de operare, puritate ridicată a produsului și aplicabilitatea procesului pentru materii prime cu conținut mare de acizi grași liberi (free fatty acids – FFA) [67-70]. Dezavantajele procesului enzimatic includ efecte de inhibare a enzimei datorită prezenței metanolului și faptul că enzimele sunt scumpe [22], costul ridicat al enzimelor și un timp de reacție lung. Deoarece enzimele imobilizate pot fi refolosite, ele au fost utilizate ca soluție pentru a micșora costurile [67].

Partea II-STUDIUL EXPERIMENTAL

A. Esterificarea în Prezența Enzimelor-Metode de Intensificare a Procesului

Obiectivele Cercetării

Principalul obiectiv al acestei cercetări l-a constituit studiul influenței ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimatică. Datorită noutății acestui subiect cercetarea fundamentală este capabilă să deschidă noi posibilități de cercetări aplicative.

Obiectivele principalele ale studiului se împart în:

1. Studiul procesului de esterificare enzimatică pentru obținerea esterilor cu lanț scurt cu utilizări în produsele alimentare și cosmetice.
2. Utilizarea ultrasunetelor pentru intensificarea procesului de esterificare enzimatică.

Obiectivul cercetării experimentale constă în studiul sintezei acetatului de izoamil (aroma de banană) prin esterificarea directă a acidului acetic cu alcool izoamilic, în prezența enzimelor și a solvenților ca și adjuvanți în masa de reacție. Un astfel de sistem evită problemele de separare, toxicitate, inflamabilitate a solvenților organici și prezintă avantajul reducerii costului produsului final și permite recuperarea produsului, fără etape ulterioare complexe de purificare sau de evaporare. Acest tip de esterificare este avantajos la obținerea esterilor cu utilizări în produsele alimentare sau cosmetice.

A1. Esterificare Enzimatică în Regim Discontinuu

Materiale și Metode

Materiale

Lipaza Lipozyme 435 de la *Candida antarctica*[23], imobilizată pe o rășină acrilică macroporoasă a fost furnizată cu amabilitate de Novozymes A/S (Danemarca). Toate substanțele chimice: alcool *i*-amilic (Merck), acid acetic (Merck), acetat de *i*-amil—standard pentru analiza GC (Aldrich) au fost de calitate analitică.

Procedura de Esterificare a Acidului Acetic cu Alcool Izoamilic

Acidul acetic (50 mmol), alcoolul izoamilic (100 mmol) și enzima au fost încălzite la 50°C. Progresul reacției a fost urmărit prin colectarea de probe la diferite intervale de timp și s-a analizat conversia acidului acetic prin determinarea indicelui de aciditate și prin analiză cromatografică. Reacția a avut loc într-un reactor de 200 mL, prevăzut cu agitare mecanică și refrigerent de reflux. Temperatura în masă de reacție a fost măsurată cu ajutorul unui termocuplu. Condițiile de reacție constante au fost: raportul molar acid acetic: alcool izoamilic de 1:2, temperatura de 50 °C. Experimentele în prezența ultrasunetelor s-au realizat într-o baie de ultrasunete (Ultrasonic cleaning bath COLIBRI L488, volum 200 mL, 22W, frecvența 66–80 kHz, STIMIN SRL, Italy) prevăzută cu sistem de încălzire și cu un sistem de variație a puterii ultrasonice (Figura A1.2).

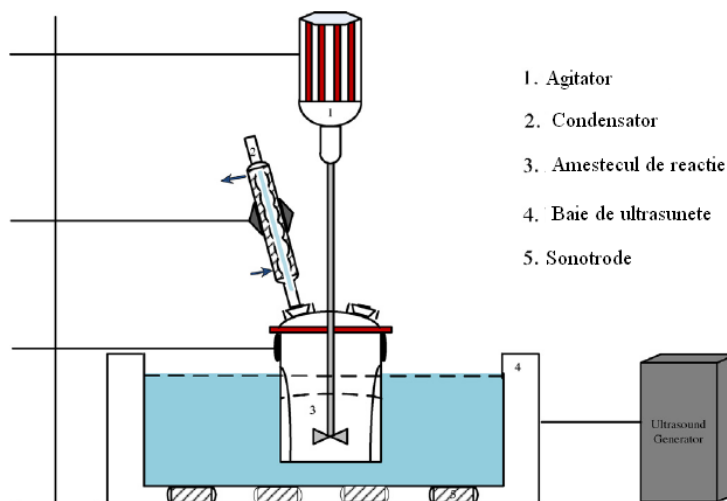


Figura A1.2: Schema instalației de intensificare cu ultrasunete a reacției de esterificare a alcoolului izoamilic cu acid acetic

Rezultate și Discuții

Influența Diferitelor Tipuri de Enzime Asupra Esterificării Enzimatică a Acidului Acetic cu Alcoolul i-Amilic

În această etapă a experimentărilor s-a urmărit influența diferitelor lipaze asupra procesului de esterificare. Pentru aceasta s-au folosit diferite enzime: lipaza *Candida antarctica* imobilizată pe o rășină acrilică (CALB), Lipozyme 435 și un amestec de enzime ce conține lipaze. Aceste lipaze au fost folosite în procesul de esterificare a acidului acetic. Studiile experimentale s-au realizat la temperatura de 50 °C, un raport molar alcool *i*-amilic : acid acetic de 2:1, cu agitare mecanică maximă. Concentrațiile de ester obținute în masa de reacție raportate la gram de enzimă utilizată sunt reprezentate grafic în Figura A1.4.

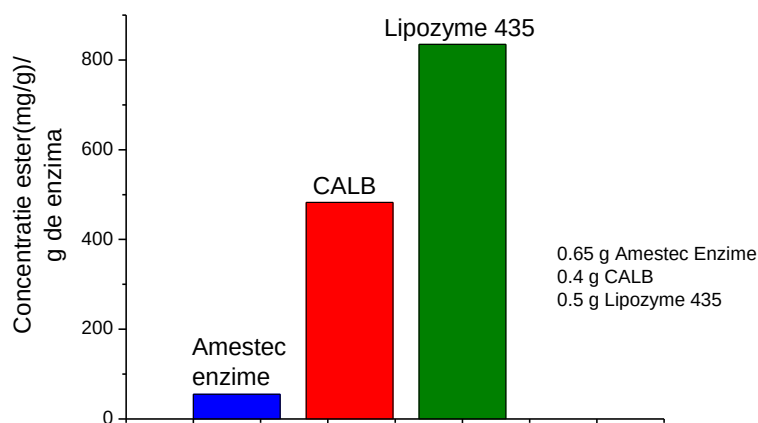


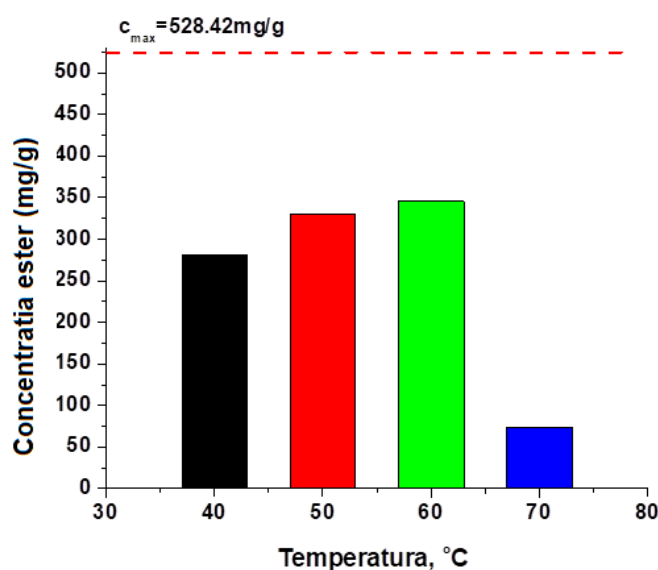
Figura A1.4: Concentrația acetatului de *i*-amil în procesul de esterificare enzimatică la utilizarea diferitelor lipaze

Din analiza datelor rezultate se observă ca cele mai bune rezultate s-au obținut pentru enzima de tipul Lipozyme 435. Această enzimă prezintă și avantajul ca este o enzimă imobilizată pe un suport solid și astfel poate fi reutilizată[23].

Studiul Procesului de Esterificare Enzimatică prin Metoda Convențională în Prezența Lipazei Lipozyme 435

- Influența Temperaturii de Reacție asupra Esterificării Enzimatică a Acidului Acetic cu Alcoolul *i*-Amilic

Temperatura de reacție este un factor important pentru reacțiile catalizate enzimatic, deoarece activitatea lipazei este dependentă de temperatură. Următoarele experimente s-au efectuat în prezența enzimei Lipozyme 435. Condițiile experimentale au fost: temperatura între 40–70 °C, un raport molar alcool *i*-amilic:acid acetic de 2:1, cu agitare mecanică ușoară. Variația concentrației acetatului de *i*-amil în procesul de esterificare enzimatică în funcție de temperatură este prezentată în Figura A1.7.



FiguraA1.7: Variația concentrației esterului în procesul de esterificare enzimatică în funcție de temperatură, (condiții de reacție: raport molar alcool:acid 2:1, cantitatea de enzima 40 mg/g amestec, timp de reacție 2h)

Din Figura A1.7 se poate observa că o creștere a temperaturii de la 40 la 50 °C a condus la creșterea concentrației de acetat de *i*-amil. La o temperatură mai mare de 60 °C, este posibil să apară fenomenul de denaturare a enzimei, fapt care ar duce la o creștere a timpului de reacție și respectiv, la o scădere a conversiei acidului. Pe baza acestor rezultate, experimentele ulterioare au fost efectuate la 50 °C pentru a evita denaturarea enzimei.

Intensificarea Procesului de Esterificare Enzimatică cu Ajutorul Ultrasunetelor

Studiul influenței ultrasunetelor asupra procesului de esterificare a fost realizat prin efectuarea de experimente cu ultrasunete la diferite setări de putere. Baia cu ultrasunete nu a fost echipată cu un sistem de control al puterii și am reglat puterea folosind un autotransformator cu tensiune variabilă. Am folosit 100, 150 și 200 V și am determinat puterea cu ultrasunete printr-o metodă calorimetrică [23]. Valorile determinate pentru puterea ultrasonice la diferite tensiuni au fost de 3, 6 și 8.5 mW/cm³. Testarea influenței puterii ultrasonice asupra randamentului esterului a fost efectuată la diferite temperaturi de 40 °C, 50 °C și respectiv 60 °C. Ceilalți parametri s-au menținut constanți, un raport molar de alcool *i*-amilic: acid acetic de 2:1, cantitate de Lipozyme 435—50 mg_{enzimă}/g_{amestec} de reacție și agitare mecanică. Variația concentrației de esteri în procesul de esterificare enzimatică asistată de ultrasunete pentru diferite temperaturi este prezentată în Figura A1.9.

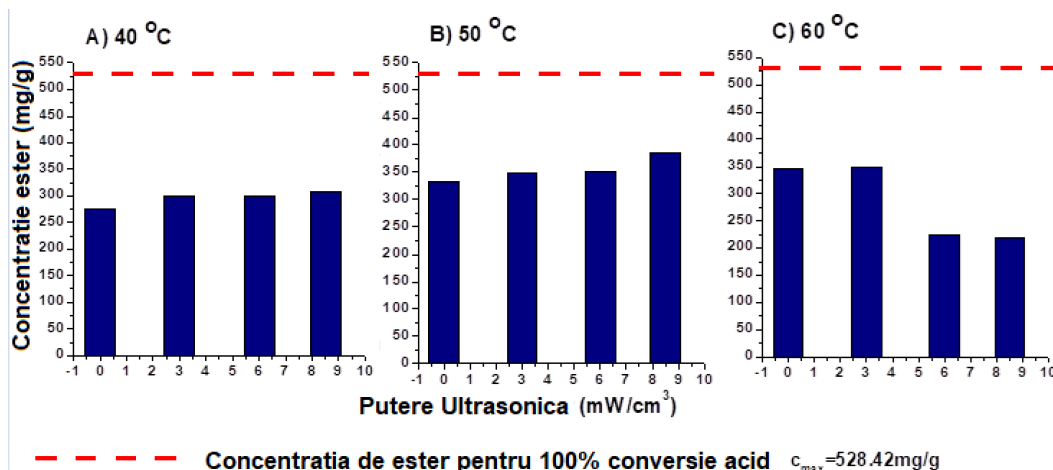


Figura A1.9: Influența puterii ultrasonice asupra concentrației de acetat de *i*-amil în procesul de esterificare enzimatică pentru diferite temperaturi (A) 40 °C, B) 50 °C și C) 60 °C) (condiții de reacție: încărcare enzimatică 50 mg / g și raportul molar alcool: acid de 2: 1).

Concluzii Parțiale

Sinteza enzimatică asistată de ultrasunete a acetatului de *i*-amil a fost efectuată folosind enzima Lipozyme 435 în sistem fără solvenți într-un reactor cu agitare. Pentru a obține o cantitate maximă de esteri, a fost studiat efectul diferiților parametri (cantitatea de enzimă, raportul molar alcool-acid, puterea ultrasunete și temperatură) asupra sintezei acetatului de *i*-amil prin cataliză enzimatică. Cel mai bun rezultat a fost obținut utilizând 50 mg/g Lipozyme 435, raport molar alcool *i*-amilic:acid acetic 2:1 și o temperatură de 50 °C. Cel mai important parametru studiat în această etapă este puterea de ultrasunete, care corelată cu temperatura de reacție a fost de 8.5 mW/cm³. S-a observat că o creștere a puterii ultrasonice la temperaturi scăzute duce la o creștere a concentrației de esteri în masa finală de reacție. La temperaturi mai ridicate (> 60 °C) creșterea puterii ultrasonice dezactivează enzima și concentrația de esteri obținută scade.

A2. Esterificare Enzimatică într-un reactor tip “Loop” Ultrasunetele Aplicate cu Baia de Ultrasunete

Materiale și Metode

Procedura de Esterificare a Acidului Acetic cu Alcool izo-Amilic

Acidul acetic, alcoolul izoamilic și enzima (Lipozyme 435) au fost încălzite la temperatura propusă. Progresul reacției a fost urmărit prin colectarea de probe la diferite intervale de timp și s-a analizat concentrația esterului prin metoda cromatografică. Intensificarea reacției de esterificare enzimatică cu ultrasunete a fost realizată cu instalația prezentată în Figura A2.1.

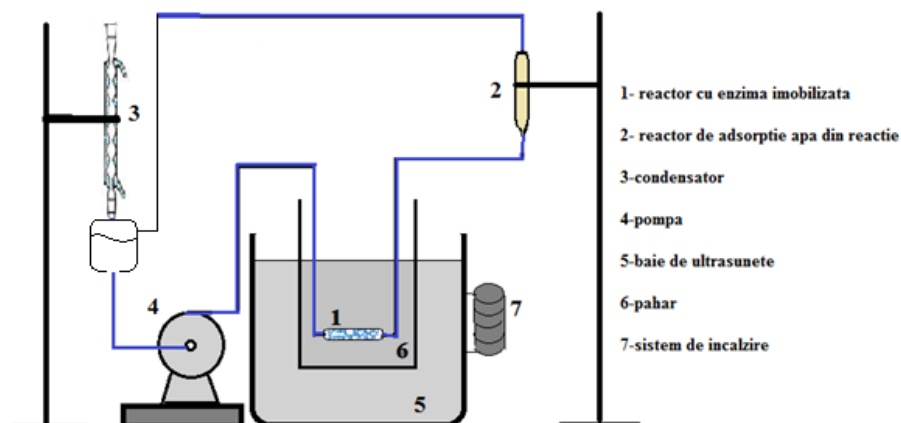


Figura A2.1: Instalația experimentală pentru intensificarea cu ultrasunete a reacțiilor enzimatiche de esterificare

Procedura de Intensificare a Reacției de Esterificare Enzimatică

Intensificarea reacției de esterificare enzimatică s-a realizat folosind instalația prezentată anterior. Deoarece baia de ultrasunete folosită nu are un sistem de ajustare al puterii ultrasonice, pentru a micșora puterea s-a folosit un autotransformator cu ajutorul căruia s-a micșorat tensiunea de alimentare a aparatului. Puterea undelor acustice a fost determinată prin metoda calorimetrică. Pentru intensificare s-au folosit puteri diferite de ultrasunete, de la 3W/kg la 13.8W/kg. Pentru fiecare experiment raportul molar acid:alcool a fost de 1:2, masa de enzima este de 0.8 g, cu un volum de reacție de 3.9 mL. Toate analizele au fost efectuate în duplicat.

Rezultate și Discuții

În această etapă s-a urmărit efectul puterii ultrasonice asupra reacției de esterificare a alcoolului *i*-amilic cu acid acetic în prezența enzimei imobilizate Lipozyme 435 în regim continuu și influența debitelor diferite de reactanți asupra concentrației de ester.

Intensificarea Esterificării Enzimatică cu Ultrasunete în Baia de Ultrasunete

Pentru a intensifica cu ultrasunete reacția enzimatică de esterificare dintre acidul acetic și alcoolul *i*-amilic s-au efectuat experimente în instalația prezentată în Figura A2.1. S-au aplicat diverse puteri ultrasonice pentru a găsi valoarea optimă pentru care enzima este activată și nu denaturată. Deoarece în literatura de specialitate [24] este menționat că rezultate mai bune pentru intensificarea reacțiilor enzimatică cu ultrasunete se obțin atunci când baia de ultrasunete este operată în pulsuri de ultrasunete, în experimentele următoare s-a folosit aceeași instalație din Figura A2.1, la care s-a adăugat un sistem de control al regimului de funcționare al băii de ultrasunete. Astfel baia de ultrasunete a funcționat în pulsuri.

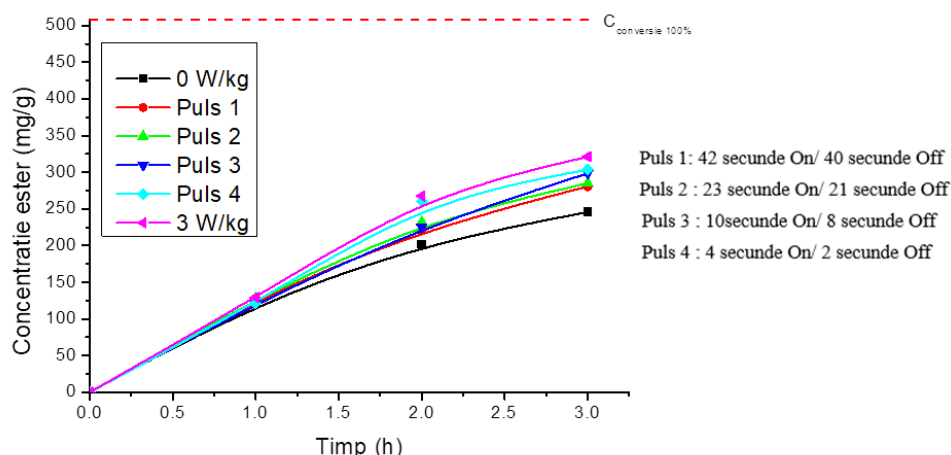


Figura A2.10: Evoluția în timp a concentrației acetatului de *i*-amil, la diverse puteri de US aplicate, cu 35% mai mult agent de îndepărtare a apei din sistem, ultrasunetele aplicate în pulsuri, la o putere de US de 3 W /kg în regim OFF

Rezultatele cele mai bune au fost obținute la utilizarea pulsurilor de 4 secunde ON/2 secunde OFF.

Concluzii Parțiale

Sinteza enzimatică asistată de ultrasunete a acetatului de *i*-amil a fost efectuată folosind enzima Lipozyme 435 în sistem fără solvenți într-un reactor tip "loop" scufundat într-o baie de ultrasunete cu folosirea unui vas intermediar. Reactorul tip "loop" permite punerea în contact a amestecului de reacție cu enzima la rapoarte mari enzima:amestec de reacție. În același timp se poate procesa un volum suficient de mare de reacție care este stocat într-un rezervor și pompat în mod continuu prin reactor. Pentru punerea în evidență a efectului puterii ultrasonice s-au utilizat mai multe configurații ale băii de ultrasunete, pentru fiecare configurație s-a determinat calorimetric puterea ultrasonica și apoi concentrația de ester. Pentru aplicarea ultrasunetelor în mod continuu a fost stabilită cea mai bună putere ultrasonica ca fiind cea de 11,3 W/kg. La aplicarea ultrasunetelor în regim ON/OFF nu s-au obținut valori mai bune decât la aplicarea ultrasunetelor în mod continuu. S-a pus în evidență și dezactivarea în timp a enzimei utilizată succesiv în reacție, fără a fi reactivată.

A3. Esterificare Enzimatică într-un reactor tip "Loop" - Ultrasunetele Aplicate cu Sonda de Ultrasunete

Utilizarea unui reactor de tip "loop" scufundat în baia de US pentru intensificarea procesului de esterificare enzimatică nu a permis obținerea unor rezultate mai bune decât cele obținute la reactorul clasic cu agitare. Din acest motiv au fost continuate cercetările prin utilizarea unui reactor de tip "loop" iar intensificarea procesului s-a realizat prin utilizarea unei sonde de US care se poate poziționa la diferite distanțe față de reactor.

S-a urmarit punerea în evidență a efectului US asupra formării de radicali liberi și ulterior asupra intensificării transferului de masă. In acest fel s-a obținut o configurație a reactorului în care să se obțină un efect favorabil asupra transferului de masă dar cu formare redusă de specii active. Odata obținută aceasta configurație s-a studiat procesul de esterificare enzimatica.

Materiale și Metode

Materiale

Acidul acetic (puritate 99.99%) a fost achiziționat de la Chemical Company CHIMOPAR SRL. Alcoolul *iso*-amilic ($\geq 98\%$) a fost furnizat de Sigma-Aldrich. Enzima utilizată, Lipozyme 435, a fost o lipază *Mucor miehei* imobilizată pe un suport anionic macroporos. Apa a fost îndepărtată folosind site moleculare (tip 3 Grace Davison SYLOBEAD MS 564 C). *p*-Nitrofenol achiziționat de la Sigma-Aldrich, pentru uz în spectrofotometrie, hidroxid de sodiu de la Sigma-Aldrich, puritate absolută, acid clorhidric de la Chimopar de concentrație 1 N. Sonda de ultrasunete folosită a fost o sondă de tipul Procesor Ultrasonic de 750 W, produsă de SONICS. Aparatura utilizată permite aplicarea de ultrasunete cu amplitudini reglabile, utilizatorul putând programa fie cantitatea de energie, fie perioada de expunere la ultrasunete. Controlul asupra parametrilor de lucru permite o mai bună urmărire și reproductibilitate a procesului de degradare prin cavitație acustică a *p*-nitrofenolului.

Metoda

Reacția de esterificare a fost efectuată într-o configurație de tip „loop” (debit de 0,16 mL/min și volume diferite de soluție stoc) la diferite temperaturi de reacție (30 până la 50 °C) cu un raport molar acid-alcool 1:2 molar (Figura A3.1) [32]. Cantitatea de enzima folosită a fost de 0.2 g. Ultrasunetele au fost introduse printr-un sistem de tip sondă de ultrasunete (Vibracell VCX-750), utilizând diferite pulsuri și amplitudini de ultrasunete. Apa a fost îndepărtată din sistem trecând amestecul de reacție printr-o coloană, care conține site moleculare (2,3 g site moleculare, cu o capacitate de reținere a apei de 22% wt., suficientă pentru a reține întreaga apă formată în timpul esterificării). Reacția a fost efectuată timp de două ore, într-un sistem de tip buclă, probele au fost prelevate și analizate în duplicat. Concentrația de acetat de izoamil format din amestecul de reacție a fost determinată prin cromatografie gazoasă.

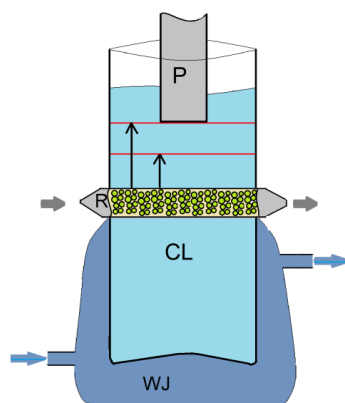


Figura A3.2: Proiectarea celulei reactorului. În care: P—Sondă ultrasunete; R—Reactor enzimatic (1 mL volum, conținând 0.2 g de enzimă imobilizată); CL—lichid de cuplare (apă 120 mL volum); WJ—manta de încălzire/răcire a apei conectată la un sistem de termostatare; T—sistem de termostatare

Pentru a depăși faptul că reacțiile de esterificare sunt reversibile s-a folosit un exces de alcool iar apa din sistem a fost îndepărtată continuu folosind site moleculare, schema prezentată în Figura A3.3

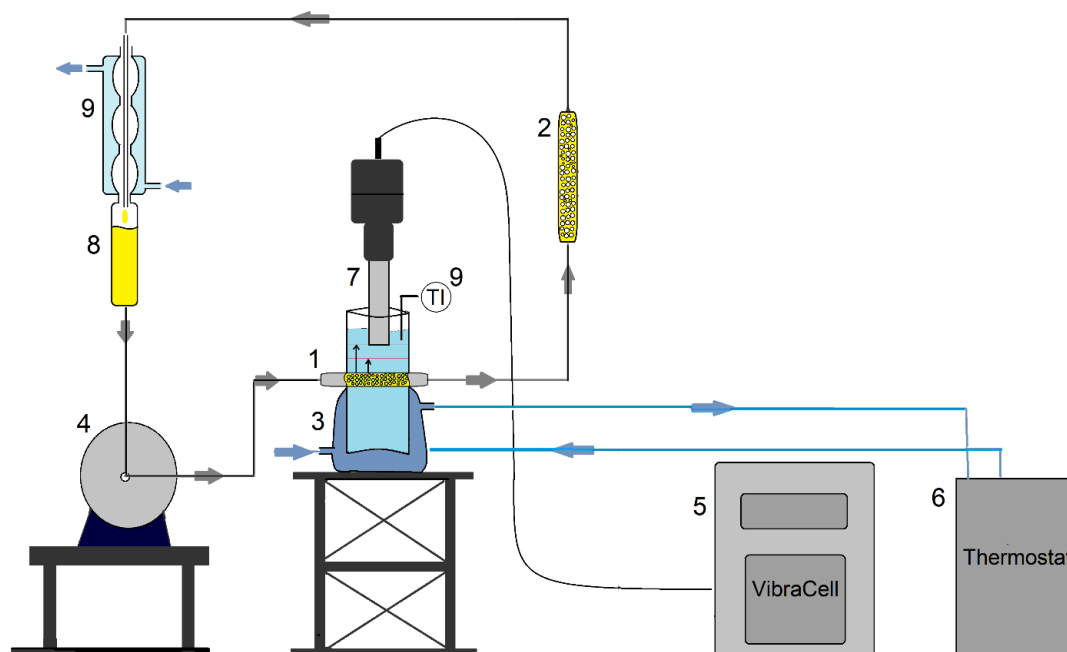


Figura A3.3: Reprezentarea schematică a sistemului complet de esterificare enzimatică a acidului acetic cu alcool izoamilic în prezența ultrasunetelor. 1-Reactor cu enzima Lipozyme 435; 2-Reactor cu site moleculare; 3- Manta de încălzire răcire; 4- Pompă; 5- Panou control US; 6- Termostat; 7- Dispozitiv generator de ultrasunete (tip sondă); 8- Soluție stoc; 9- Termocuplu

Rezultate și Discuții

În acest studiu sunt descrise efectele ultrasunetelor asupra reacției de esterificare catalizată de enzime pentru obținerea acetatului de izoamil. Reactorul a fost caracterizat în termeni de temperatură, putere ultrasonică, ciclu de funcționare, distanța sondei față de reactorul enzimatic și cantitatea specifică de enzimă imobilizată folosită. Am reprezentat grafic, în Figura A3.10, concentrația de PNP în funcție de energia emisă de sonda de sonicare, pe unitatea de volum, obținând astfel eficiența ultrasunetelor, în cele două reactoare, la diferite temperaturi de reacție. La temperaturi mai mici, de 30 °C, eficiența ultrasunetelor este mai bună decât la temperaturi mai mari.

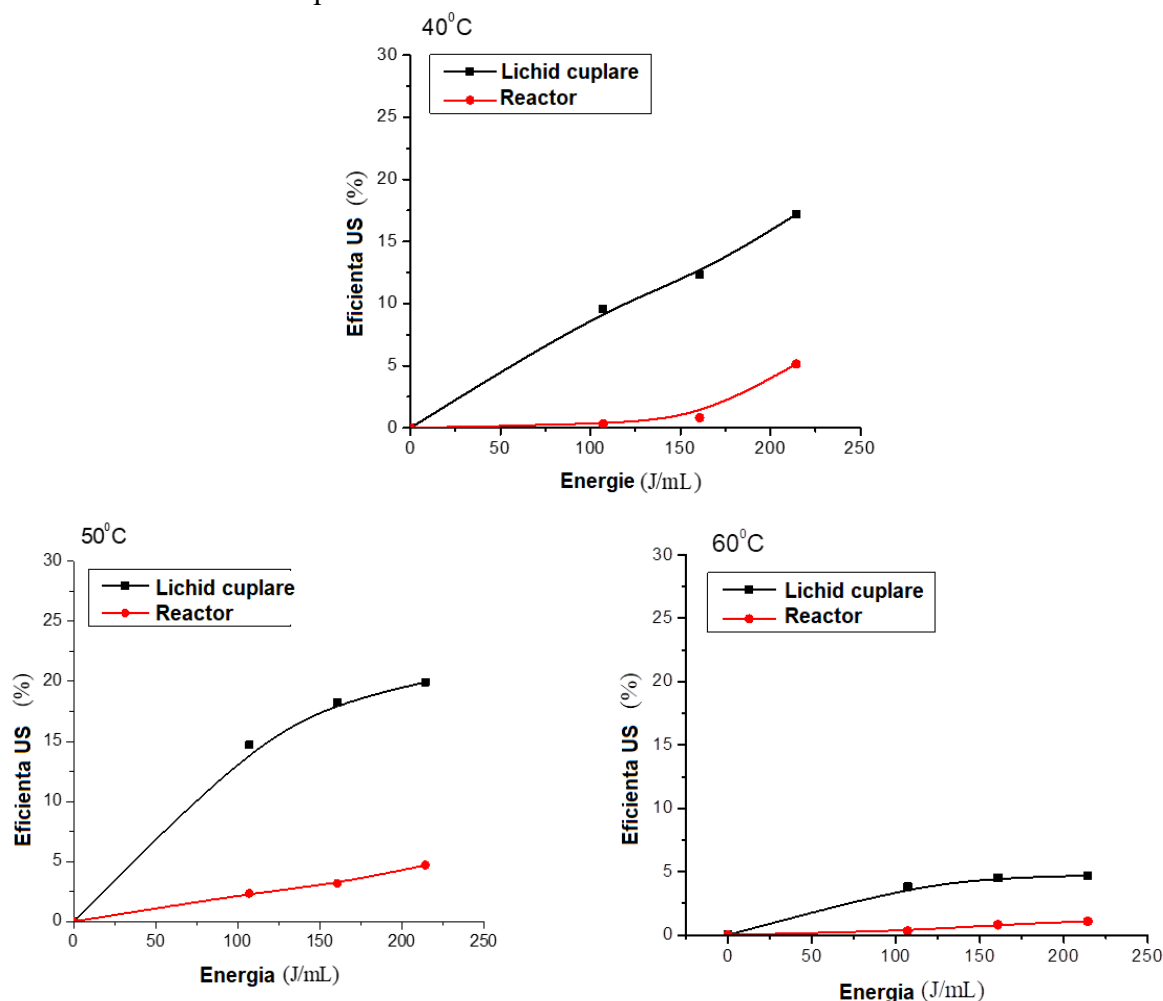


Figura A3.10: Eficiența ultrasunetelor la diferite temperaturi (20% Ampl, 3on/3off) atât în reactorul R (1mL), cât și în lichidul de cuplare CL (120mL). Distanța sondei-reactor cu ultrasunete = 4.5 cm

Expunerea prelungită a catalizatorului enzimatic la ultrasunete continue poate provoca dezactivarea, dar aceasta poate fi ameliorată cu aplicarea unui ciclu de funcționare la sursa cu ultrasunete, adică perioade consecutive de pornire și oprire [24]. Pentru această reacție, ultrasunetele au fost aplicate cu un ciclu de funcționare de 3 secunde pornit și 3 secunde oprit.

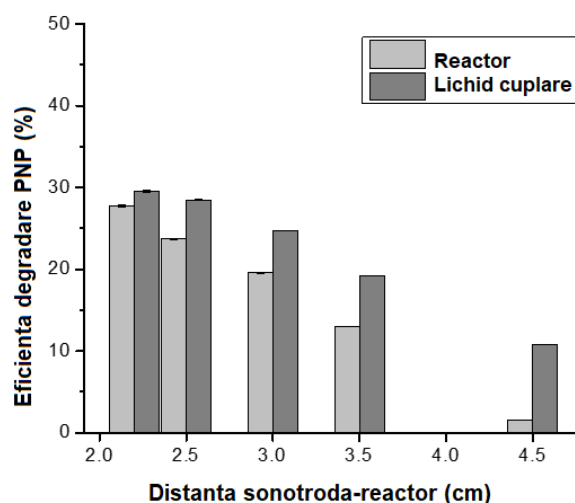


Figura A3.11: Eficiența degradării *p*-nitrofenolului în funcție de distanța dintre sonda de ultrasunete și reactor; în reactor și în lichidul de cuplare la 50 °C la o energie ultrasunete de 107 J (20% ampl, 3on/3off).

Datele prezentate în Figura A3.11 arată că cea mai mică degradare a *p*-nitrobenzenului se obține la o distanță de 4.5 cm a sondei de la reactorul enzimatic. Aceasta sugerează că 4.5 cm este distanța care generează un număr minim de evenimente de prăbușire a bulelor de cavitație, care ar oferi aranjamentul geometric optim al reactorului pentru degradarea minimă a enzimei. Efectul distanței dintre sonda de ultrasunete și reactor este aproape sigur legat de lungimea de undă a ultrasunetelor din apă la o frecvență de 20 kHz care este în jur de 7.42 cm [25]. Deși distanța de 4.5 cm nu este tocmai jumătatea lungimii de undă, aceasta este distanța optimă pentru a realiza activarea enzimei.

Efecte de transfer de masă

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.

Rezultatele din Figura A3.11 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 [26].

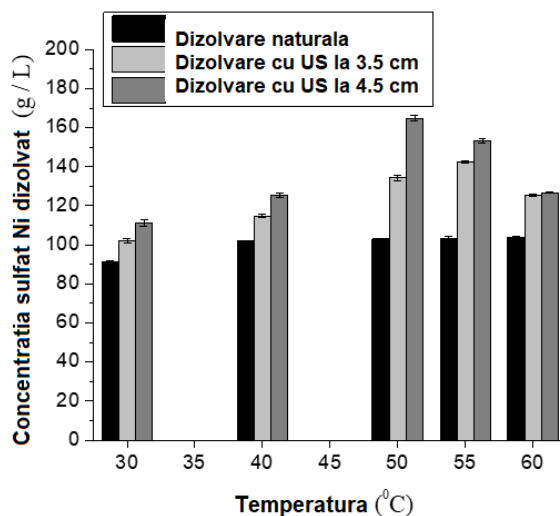


Figure A3.11: Concentrația sulfatului de Ni dizolvat la diverse temperaturi: dizolvare naturală (convențională) și cu ultrasunete (sonda de sonicare la 3.5 cm respectiv 4.5 cm distanță de reactor), 20% amplitudine, putere de US de 7W, 3 on/3 off, timp de 30 min.

Rezultatele indică faptul că la toate temperaturile utilizate ultrasunetele îmbunătățesc transferul de masă, dar transferul de masă optim are loc la 50 °C pentru distanța de 4,5 cm a sondei de peretele reactorului. În absența ultrasunetelor, modificările concentrației de sulfat de nichel dizolvat sunt foarte scăzute, indiferent de temperatură ceea ce, indică un nivel scăzut de transfer de masă. La 50 °C, dizolvarea sulfatului de nichel crește odată cu creșterea distanței sondei cu ultrasunete față de reactor (vezi Figura A3.11). Pe măsură ce distanța crește, presiunea acustică scade și va exista o competiție între un transfer de masă în creștere din cauza lungimii reactorului expus ultrasunetelor și o scădere a transferului de masă datorită unei reduceri a puterii ultrasonice cu distanța. Ca rezultat, efectul ultrasunetelor asupra transferului de masă atinge valoarea optima la o distanță de aproximativ 4,5 cm.

Studiul reacției de esterificare

Din datele obținute anterior în ceea ce privește intensitatea cavitației și transferul de masă, au fost aleși parametrii optimi pentru reactor: 4,5 cm distanță sondă-reactor la o temperatură de 50 °C. Reactorul a fost instalat într-un sistem de tip buclă pentru esterificare cu un debit constant de 0,16 mL/min și raport molar alcool:acid (2:1).

Efectul Puterii US

Ultrasunetele au fost aplicate la trei amplitudini diferite de vibrație de 20%, 25% și 30% (Figura A3.13). După o oră, concentrația maximă de ester a fost obținută la cea mai mică amplitudine (20%). Scăderea generală a randamentului esterului cu creșterea puterii ultrasonice este rezultatul concurenței dintre efectul negativ al cavitației, care stresează

enzima și orice efect pozitiv rezultat din transferul de masă îmbunătățit datorita US. Linia roșie din grafice reprezintă concentrația esterului pentru conversia de 100%.

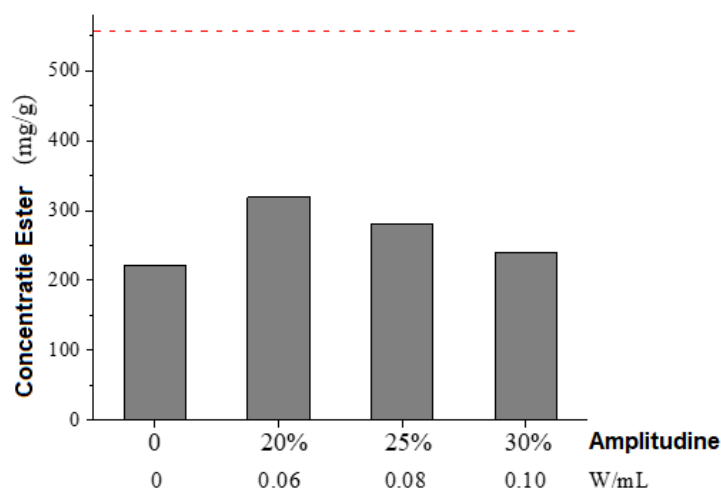


Figura A3.13:Efectul puterii US asupra esterificării. Timp de reacție 1 h, temperatura de reacție 50 °C, 0.047 g_{enzimă}/g_{amestec}. Valorile mai mici sunt pentru densitatea puterii ultrasonice din lichidul de cuplare.

Efectul Temperaturii

Este cunoscut faptul că efectul ultrasunetelor este mai bun la temperaturi mai scăzute [27]. La temperaturi mai ridicate, se formează bule în cantitate mai mare, dar prăbușirea lor este mai puțin violentă (datorită efectului de amortizare a vaporilor care intră în bulă), prin urmare, îmbunătățirea transferului de masă cauzată de cavitație este redusă. Pe de altă parte, efectul temperaturii asupra reacțiilor enzimatică este pozitiv în intervalul 30–50 °C. La temperaturi mai scăzute, viteza de reacție este prea mică, iar la temperaturi mai ridicate există o scădere importantă a vitezei de reacție în a doua oră comparativ cu viteza de reacție din prima oră (Figura A3.15). Intervalul de temperatură preferat este între 40 și 50 °C.

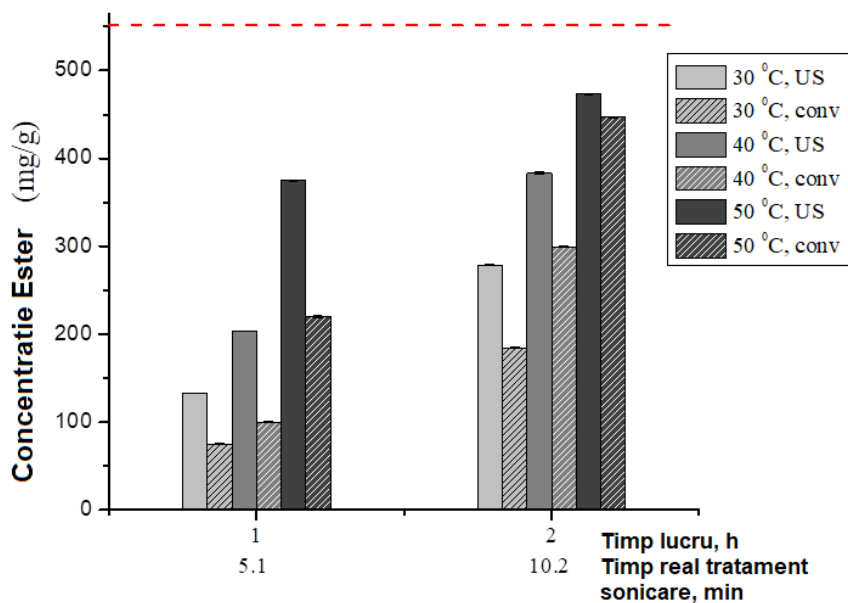


Figure A3.15: Concentrația de ester în timp pentru reacția convențională și de esterificare intensificată US la diferite temperaturi de reacție: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 0.047 g amestec enzimă/g, impuls: 3on/3off

Concluzii Parțiale

A fost proiectat, construit și realizat un reactor de tip “loop” adecvat pentru studierea intensificării reacțiilor enzimatiche, utilizând ca model esterificarea acidului acetic cu alcool izoamilic. Configurația reactorului a fost optimizată pentru a se obține o intensificare maximă a transferului de masă în condițiile unei formări minime de specii active. În configurația optimă s-a realizat programul experimental pentru studierea influenței ultrasunetelor (amplitudine, ciclul de funcționare și timpul de sonicare) și temperaturii asupra procesului de esterificare enzimatică. S-au obținut valori mult mai bune (450 mg ester/g amestec reacție) decât în cazul reactorului tip “loop” operat în baia de ultrasunete (321 mg ester/g amestec reacție) sau în cazul reactorului discontinuu cu agitare (386 mg ester/g amestec reacție) deși timpul real de sonicare a fost de ordinul minutelor.

B. Esterificarea cu Rașini Acide—Metode de Intensificare a Procesului

Obiectivele Cercetării

Obiectivul principal al acestei cercetări este intensificarea reacției de esterificare a acidului acetic cu alcoolul izoamilic utilizând drept catalizatori rășini schimbătoare de ioni. Obiectivele detaliate sunt:

- Studiul influenței ultrasunetelor asupra procesului de esterificare în faza heterogenă comparativ cu esterificarea convențională

- Studiul influenței ultrasunetelor asupra procesului de esterificare în faza heterogenă într-un reactor de tip „loop”, se vor pune în evidență efectul amplitudinii și al aplicării US în pulsuri

B.1. Esterificarea cu Rașini Acide- Intensificarea cu US

Materiale și Metode

Materiale

Toate substanțele chimice utilizate pentru esterificare: alcoolul *izoamilic* (Merck), acidul acetic (Merck), acetatul de *izoamil* - standard pentru analiza GC (Aldrich) au fost de calitate analitică și au fost utilizate în forma în care au fost furnizate. Rășina utilizată drept catalizator au fost achiziționate de la Aldrich. Dowex 50W (X8) 50–100 mesh este o rășină cationică stiren-divinilbenzen puternic acidă (Tabelul B1.1). Catalizatorul a fost utilizat după ce a fost uscat la o temperatură de 100 °C timp de 2 ore. Uscarea la temperaturi mult mai ridicate poate duce la pierderea centrilor activi ai catalizatorului.

Metode de Esterificarea Acidului Acetic cu Alcoolul Izoamilic

Procedura de esterificare

Reacțiile convenționale de esterificare a acidului acetic cu alcool *izoamilic* au fost efectuate folosind un reactor tip “loop” de 1 mL localizat într-un vas termostatat și supus efectului de US. Reacția de esterificare asistată de ultrasunete a fost realizată într-un reactor tip “loop” (bucă) [25] descris în lucrările noastre anterioare [28] la 50 °C cu un debit de 0, 16 mL/min și un raport molar acid-alcool de 1:2. Reactivii sunt amestecați, încălziți la temperatura de lucru și trec prin stratul fix de rășină din reactor. Sonicarea a fost efectuată folosind un sistem de sondă de US (Vibracell VCX-750), cu o setare de funcționare la diferite amplitudini, continuu sau în pulsuri. Reacția a fost efectuată timp de două ore și probele au fost prelevate la anumite perioade de timp în duplicat. Concentrația de acetat de *izoamil* a fost determinată prin analiza gaz-cromatografică (analiza GC).

Rezultate și Discuții

Reacții de Esterificare Convenționale vs Ultrasunete

Rășina acidă schimbătoare de ioni, Dowex 50 (X8) a fost selectată drept catalizator solid. Compoziția și structura unei rășini schimbătoare de ioni sunt factori importanți în stabilirea eficienței sale catalitice. Activitatea catalitică pentru acest catalizator a fost testată în reacțiile convenționale și cu ultrasunete între acidul acetic și alcoolul *izoamilic*, iar variația concentrației de acetat de *izoamil* în timp este prezentată în Figura B1.3. S-a observat că aplicarea ultrasunetelor conduce la obținerea esterului la o concentrație de aproximativ 30% în 2 ore. Prin urmare, utilizarea ultrasunetelor pentru creșterea conversiei și reducerea

timpului procesului pentru esterul acetat de izoamil este o metodă destul de eficientă așa cum se arată în Figura B1.3.

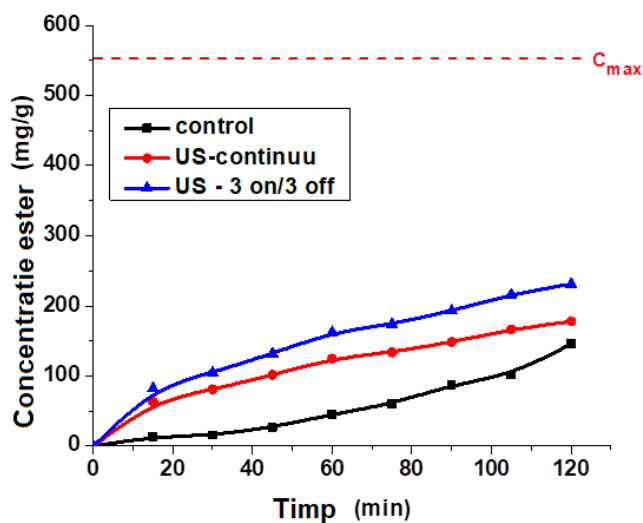


Figura B1.3: Comparație între esterificarea convențională și cea cu ultrasunete (50 °C, sondă de sonicare la 4.5 cm de reactor, 20% amplitudine, încărcare catalizator 0.067 g/mL

Cel mai important fenomen atunci când se utilizează ultrasunete este cavitația. Formarea microjeturilor și efectul de creștere a transferului de masă duc la creșterea vitezei procesului. Cavitația provoacă creșterea locală a temperaturii și a presiunii generând unde de șoc și turbulențe microscopice. În consecință, datorită cavitației generate în sistemul de ultrasunete, aceste efecte sporesc transferul de masă și difuzia moleculelor reactante pe siturile catalitice active. În plus, microjeturile formate atunci când are loc explozia bulelor ajută la reînnoirea interfeței. Toate aceste efecte sunt responsabile pentru îmbunătățirea concentrației esterului [29].

Influența Puterii Ultrasonice

Un factor important care influențează proprietățile cavitației este cantitatea de energie care este transmisă în lichidul de reacție. Studiile dinamicii bulelor arată că distribuția lor în funcție de dimensiune, durata maximă de viață, numărul de bule și presiunea de colaps sunt funcții complexe, care afectează rata disipării puterii. De asemenea, creșterea temperaturii în volumul lichidului este dependentă de rata de disipare a puterii, ceea ce duce la modificări ale solubilității gazelor și ale presiunii vaporilor care afectează ușurința generării fenomenului de cavitație, precum și intensitatea finală a colapsului [30]. Pentru a studia efectul puterii de ultrasunete, s-au efectuat experimente variind amplitudinea de la 20 la 35% pentru a găsi cea mai bună putere necesară pentru a realiza cavitația eficientă pentru esterificare. În Figura B1.4 sunt prezentate rezultatele experimentelor catalizate de rășina Dowex 50 (X8)

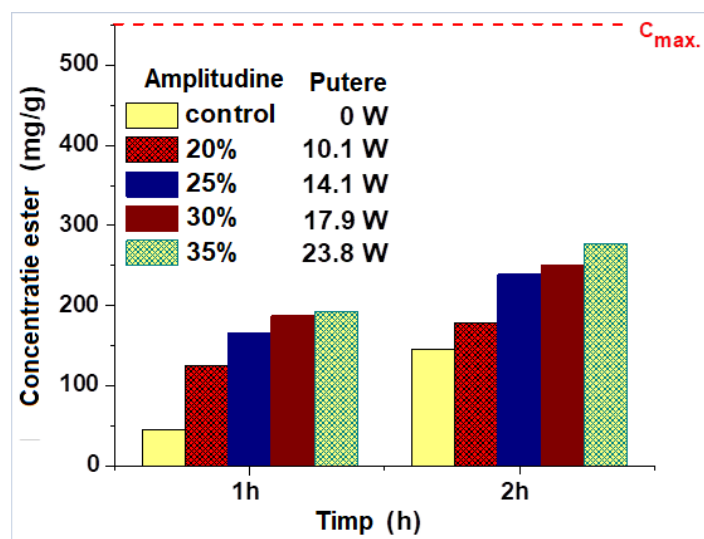


Figura B1.4: Efectul amplitudinii ultrasunetelor asupra concentrației esterului (50 °C, sondă de sonicare la 4.5 cm de reactor, încărcare catalizator 0.067 g / ml, impuls 3s on/3 off).

Concluzii Parțiale

Sinteza cu ultrasunete a acetatului de izoamil prin reacția dintre acidul acetic și alcoolul izoamilic folosind drept catalizator o rășină schimbătoare de ioni în formă acidă în prezența iradierii cu ultrasunete a fost realizată cu succes într-un reactor de tip “loop”. Cea mai mare concentrație de ester (300 mg_{ester}/g amestec de reacție) a fost atinsă la o amplitudine cu ultrasunete de 35% și la un ciclu de lucru de 50%. Rezultatele arată o perspectivă favorabilă a tehnicii cu ultrasunete pentru a îmbunătăți eficiența procesului și a reduce timpul de reacție atunci când se utilizează Dowex 50 (X8) – viteza procesului intensificat cu US este de aprox. 2 ori mai mare decât a procedurii convențional.

C. Transesterificarea Enzimatică—Metode de intensificare a procesului

Obiectivele Cercetării

Principalul obiectiv al acestei cercetări este caracterizarea reactorului de sinteză enzimatică a biodiselului în prezența ultrasunetelor – cu utilizarea diferitelor echipamente de aplicare a ultrasunetelor. Aceste echipamente au fost: Vibracell, MMM clamp-on, baia Rheus. În cadrul acestui obiectiv au fost efectuate următoarele activități:

- determinarea calorimetrică a puterii absorbite,
- determinarea radicalilor liberi formați prin urmărirea eficienței de degradare a PNP și
- vizualizarea efectului de cavitație prin metoda foliei de Aluminu pentru diferite echipamente de ultrasunete.

Ulterior a fost studiată sinteza esterilor etilici ai acizilor grași pe catalizatori enzimatici depuși pe suport în prezența ultrasunetelor utilizând diferite echipamente de generare a US

Materiale și Metode

Materiale utilizate

Uleiul rafinat de floarea soarelui a fost procurat de la CARREFOUR România SA București. Alcoolul etilic absolut, de puritate 99.5% a fost achiziționat de la CHIMREACTIV SRL, iar lipaza imobilizată folosită ca biocatalizator, Lipozyme 435 de la Novozyme, Denmark. Standardul pentru analiza GC a biodieselului format este compus din metil-heptadecanoat și heptan, heptan 99% puritate de la Honeywell, iar heptadecanoat de metil, 99% (GC) procurat de la Sigma-Aldrich.

Metode

M1. Transesterificare convențională

Uleiul de floarea soarelui (52.5 mL), împreună cu alcool etilic anhidru (17.5 mL) și enzima Lipozyme 435 (imobilizată pe suport) au fost introduse în reactorul termostatat la 50 °C. Raportul molar ulei de floarea soarelui: alcool etilic a fost de 1:6. Reacția a avut loc într-un reactor de 100 mL, prevăzut cu agitare mecanică.

Progresul reacției a fost urmărit prin colectarea de probe la diferite intervale de timp și s-a analizat la GC concentrația de esteri de acizi grași formați.

C1. Transesterificarea enzimatică—Procedeu Discontinuu-MMM Clamp-On

Materiale și Metode

Pentru utilizarea MMM clamp-on s-a utilizat uleiul de floarea soarelui (15 mL), împreună cu alcoolul etilic anhidru (5 mL) și enzima Lipozyme 435 (0.4 g, imobilizată pe suport). Reactorul a fost termostatat la 50 °C (în interiorul tevii metalice s-a introdus o teavă de sticlă – care este reactorul propriu-zis; iar în spațiul dintre țeava de sticlă și cea metalică circula lichidul de termostatare. Reactorul are un volum de 20 mL și este prevăzut cu agitare mecanică. S-au testat diferite tipuri de agitatoare mecanice pentru a determina agitarea optimă pentru obținerea unei potrivite concentrații procentuale de FAEE. Progresul reacției a fost urmărit prin colectarea de probe la diferite intervale de timp și s-a analizat la GC concentrația de esteri de acizi grași formați. S-au efectuat experimente cu încălzire convențională, dar și cu ultrasunete.

Rezultate și Discuții

Figura C1.8 însumează rezultatele obținute pentru fiecare fluid în parte atât în reactorul de sticlă, cât și în absența lui. A fost înregistrată și puterea consumată de la rețeaua de curent electric și comparată cu puterea de ultrasunete absorbită. Se observă pierderea de energie, pe

măsură ce aceasta este transferată de la țeava metalică la lichidul din interiorul reactorului de sticlă. Apa este cea care absoarbe cea mai mare cantitate de energie, pe când uleiul absoarbe cel mai puțin energia vibrațională.

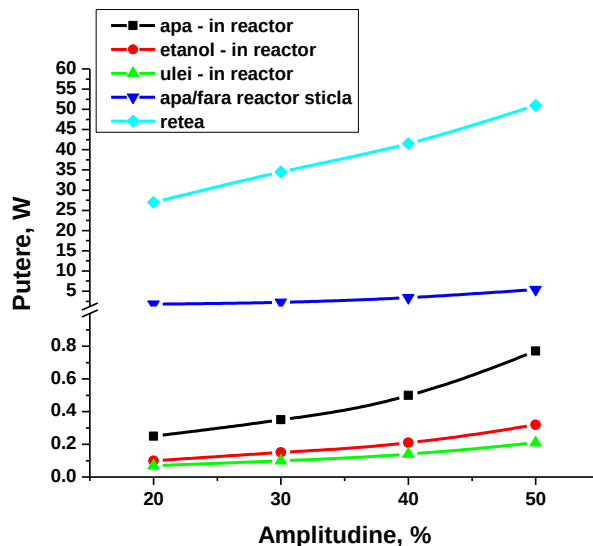


Figura C1.8: Puterea de ultrasunete în funcție de amplitudine pentru diferite fluide

Cuantificarea Speciilor Active Generate de Ultrasunete prin Metoda de Conversie a p-Nitro Fenolului la p-Nitro Catehol

Fenomenul de cavitație duce la generarea de specii active. Prezența acestora conduce la conversia *p*-nitrofenolului la *p*-nitro-catehol. Pentru a confirma formarea radicalilor liberi, și a putea cuantifica efectul acestora, s-au realizat experimente în câmp acustic, urmărind concentrația de *p*-nitrofenol în timp, la diferite amplitudini ale undelor acustice. În Figura C1.10 observăm că eficiența de conversie a *p*-nitrofenolului crește în timp și este mai mare la amplitudine mare, 40%, rezultate coerente cu datele din literatura de specialitate.

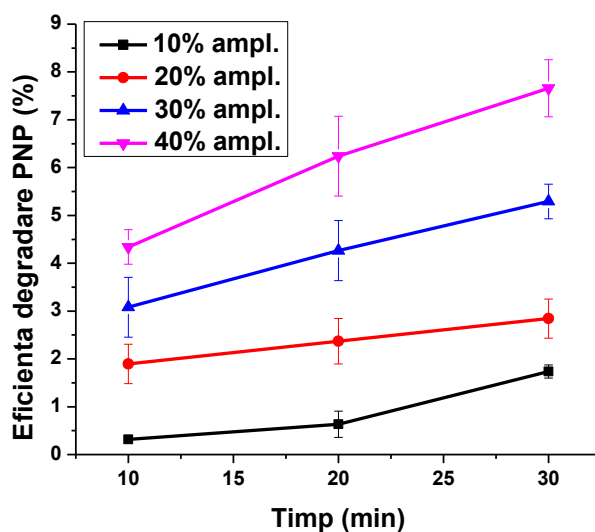


Figura C1.10: Eficiența de conversie a PNP în timp în funcție de amplitudinea undelor acustice aplicate

Influența aplicării ultrasunetelor timp de 20 min (activarea enzimei) asupra transesterificării enzimatică a uleiului de floarea soarelui cu alcoolul etilic

Pentru a reuși o mai bună activare a enzimei cu scopul de a ajunge la conversii de transesterificare mai mari, am realizat experimente, cu ajutorul echipamentului MMM clamp-on, aplicând ultrasunetele de 10% amplitudine, timp de 20 minute. După cele 20 minute de sonicare, experimentul a continuat la convențional pentru încă 100 de minute.

Din Figura C1.13 reiese că un tratament cu ultrasunete de doar 20 de minute duce la activarea enzimei Lipozyme 435. Astfel observăm o creștere semnificativă în concentrația de FAEE obținută cu ultrasunete versus metoda convențională.

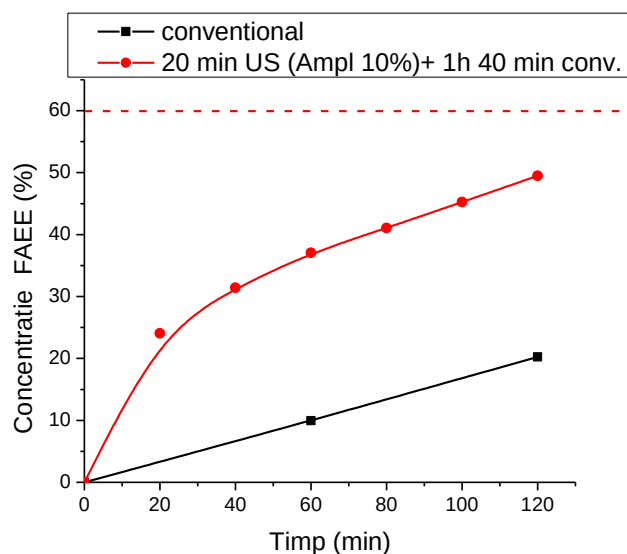


Figura C1.13: Concentrația de FAEE în timp, temperatura de reacție de 50 °C, raport molar 1:6, 0.4g enzima, la încălzire convențională și cu ultrasunete (10% Ampl)

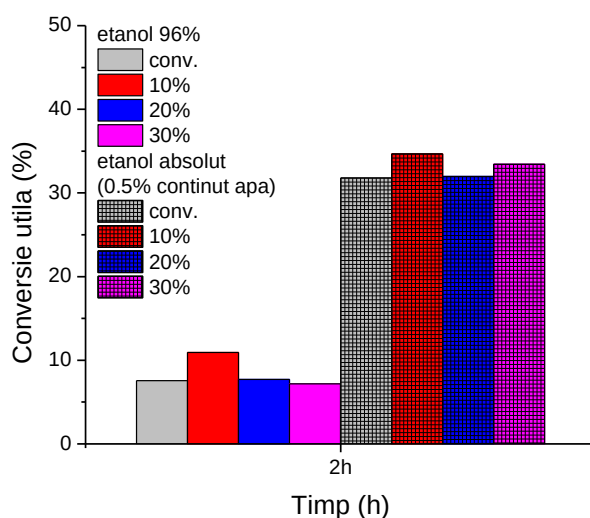


Figura C1.14: Conversia utilă după două ore de reacție, folosind instalația MMM clamp-on, la diferite amplitudini, folosind ca reactant fie etanol 96%, fie etanol absolut (0.5%conținut apă); (densitate de putere acustica: pentru 20% ampl. 0.0125 W/mL; pentru 30% ampl. 0.0175 W/mL)

În figura C1.15 se evidențiază cum conversia utilă de FAEE a crescut de la 10% la 35% cu scăderea conținutului de apă de la 4% la 0.5% la 2 ore. Situsul activ al lipazei *Candida antarctica* este acoperit de o buclă peptidică amfifilă (precum un capac sau clapeta), care împiedică substraturile să se apropie de site-ul activ. Reacția are loc, de obicei, la interfața ulei-apă și o cantitate esențială de apă contribuie nu numai la formarea zonei interfațiale, dar ajută capacul pentru a deschide conformația și crește polaritatea și flexibilitatea structurală a situsului activ al lipazei *Candida antarctica*, ajutând la activarea lipazei [31]. Cu toate acestea, când conținutul de apă a crescut până la 4%, conversia de FAEE scade, deoarece prea multă apă dăunează lipazei facilitând agregarea acesteia, diminuând difuzia substratului și, în cele din urmă, scăzând eficiența lipazei.

Concluzii Parțiale

În această etapă s-a determinat puterea de ultrasunete prin metoda calorimetrică pentru reactorul cu ultrasunete MMM Clampon în care undele acustice generate sunt transmise de-a lungul unei țevi metalice. Toate determinările s-au efectuat de minim 5 ori. Determinările s-au realizat pentru diferite amplitudini: 20%, 30%, 40% și 50%. S-au propus diferite configurații de instalație de transesterificare enzimatică cu funcționare continuă (cu și fără serpentină de răcire și cu diferite moduri de alimentare cu reactanți înainte și după sistemul de pompare). Puterea de ultrasunete absorbite este mai mare pentru apă distilată și mai mică pentru etanol, și mult mai mică pentru ulei. Puterea generată de ultrasunete este dependentă de presiunea de vapori a fluidului folosit, acesta fiind motivul pentru care puterea absorbită de etanol este mai mică decât în cazul apei. Modul în care undele acustice sunt propagate în fluid este funcție și de vâscozitatea fluidului utilizat, uleiul fiind un fluid cu o vâscozitate ridicată, absoarbe o putere ultrasonică mult mai mică. În ceea ce privește reacția de transesterificare catalizată enzimatic, s-a pus în evidență influența apei în etanol. La o concentrație scăzută a apei (0,5%) se obțin rezultate mult mai bune decât în cazul utilizării etanolului cu 4% apă. Efectul de intensificare a procesului cu ultrasunete a fost foarte vizibil atunci când ultrasunetele s-au aplicat pentru o perioadă limitată (20 minute) urmate de o perioadă de reacție convențională de 100 minute. În acest fel s-a obținut o creștere semnificativă a vitezei de reacție și a conversiei uleiului în esteri etilici. Astfel conversia uleiului a crescut la 60,19% – activare cu US 20 minute, față de 31,2% – convențional.

C2. Transesterificare Enzimatică -reactorul de tip "Loop"

Cele mai bune rezultate au fost obținute aplicând ultrasunetele la o amplitudine de 25%, concentrația de FAEE crescând de la 5% la aproape 25%. O concentrație de FAEE de 40% s-a obținut prin aplicarea ultrasunetelor la amplitudinea de 25% timp de 20 de minute, folosind alcool etilic cu conținut scăzut de apă (0,5%). Aceste rezultate demonstrează activarea enzimei în urma aplicării ultrasunetelor pe perioade scurte de timp.

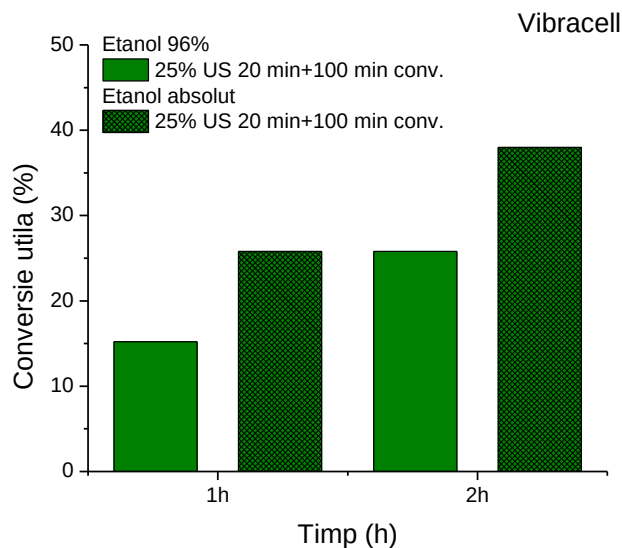


Figura C2.4: Conversia utila în timp, folosind instalația în regim continuu, aplicând ultrasunete cu sonda Vibracell, la diferite amplitudini, folosind ca reactant fie etanol 96%, fie etanol absolut, aplicând ultrasunete cu o amplitudine de 25% timp de 20 de minute, apoi reacția a mers la convențional timp de 100 minute (densitate de putere acustica pentru 25% ampl. 0.1 W/mL)

Concluzii Parțiale

La utilizarea ultrasunetelor creșterea amplitudinii US a condus la creșterea cantității de ester formată, însă peste anumite valori se poate dezactiva enzima.

Utilizarea alcoolului etilic cu conținut scăzut de apă (0,5%) conduce la rezultate mai bune (conversie 37%) față de utilizarea alcoolului etilic cu 4% apă (conversie 25%).

Cele mai bune rezultate s-au obținut în procesul de transesterificare enzimatică prin combinarea celor două metode, și anume se realizează o activare a enzimei cu ultrasunete un timp de 20 minute, urmată de transesterificarea convențională timp de 100 minute. În acest fel se obține o conversie de 37%, față de doar 19,8% la aplicarea US în mod continuu sau doar 6% la metoda convențională.

C3. Transesterificare Enzimatică-Baia Rheus

Materiale și Metode

Metode

Uleiul de floarea soarelui (22.5 mL), împreună cu alcool etilic anhidru (7.5 mL) și enzima Lipozyme 435 (imobilizată pe suport 0.02g/mL) au fost introduse în reactorul termostatat la 50°C. Progresul reacției a fost urmărit prin colectarea de probe la diferite intervale de timp și s-a analizat la GC concentrația de esteri de acizi grași formați. Reacția a avut loc într-un reactor de 30 mL, prevăzut cu agitare mecanică. Intensificarea reacției de

transesterificare enzimatică s-a realizat utilizând echipamentul generator de ultrasunete Sars Rheus. Echipamentul de ultrasunete este prevăzut cu o baie de ultrasunete, cu sistem de răcire; un sistem de control al intensității de ultrasunete (echipament cu tensiune reglabilă/ prin reglarea tensiunii de la rețea putem controla puterea acustică aplicată) și un sistem de aplicare a ultrasunetelor în pulsuri (20 on/10 off). Tensiunea de la rețeaua electrică a variat între 80V, 100V și 120V. Condițiile de reacție constante au fost: raportul molar ulei de floarea soarelui: alcool etilic de 1:6, temperatura de 50 °C.

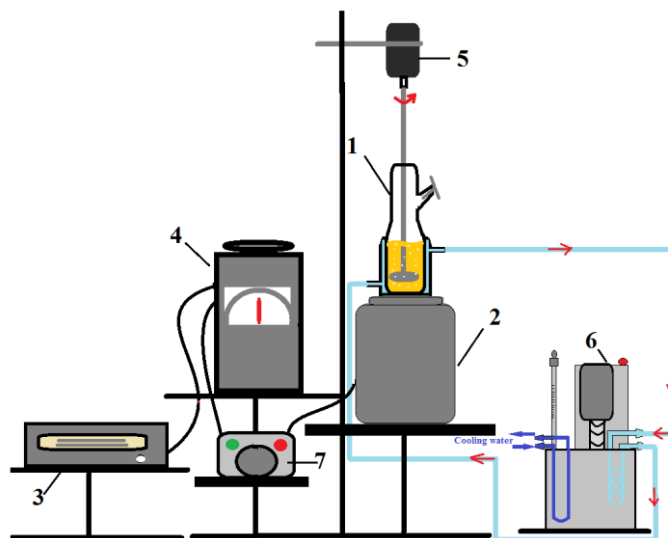


Figura C3.2: Instalația de transesterificare cu funcționare discontinuă (1 - Reactor transesterificare; 2- Baia de ultrasunete RHEUS; 3 - Sistem de control pentru baia de ultrasunete; 4 - Sistem de control al energiei de alimentare de la rețea; 5 - Sistem de agitare; 6 – Termostat; 7 - Sistem de control pentru ciclul de sonicare)

Rezultate și Discuții

Influența tipului de sonicare (continuu sau în pulsuri) asupra concentrației de biodiesel obținut pentru baia RHEUS

În reacțiile de transesterificare enzimatică asistate de ultrasunete, un factor important este puterea ultrasonică. Pentru baia cu ultrasunete RHEUS, puterea ultrasonică a fost determinată anterior pentru fluidul de cuplaj *n*-alcani prin metoda calorimetrică și prin metoda degradării cu *p*-nitrofenol. Astfel s-a urmărit influența tipului de sonicare (continuu sau în pulsuri 20 sec on/10 sec off) asupra conversiei în biodiesel la aplicarea diferitelor puteri ultrasonice. La un interval de 1 oră s-au prelevat probe și s-au analizat. Rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în Figura C3.14.

În urma reacțiilor de transesterificare enzimatică la diferite puteri ultrasonice s-a determinat ca puterea optimă pentru reacțiile de transesterificare enzimatică pentru obținerea esterilor etilici ai acizilor grași corespunde aplicării ultrasunetelor în pulsuri, adică la puteri scăzute. În procesele cu sonicare continuă puterile ultrasonice sunt mai mari și are loc probabil dezactivarea enzimei conducând astfel la conversii mai mici. O conversie a uleiului

de 60% s-a obtinut atunci cand s-a folosit etanol cu conținut scăzut de apa (0,5%) si ultrasunetele au fost aplicate timp de 30 min, reactia continuand timp de alte 100 de min fara a aplica ultrasunete (Figura C3.15).

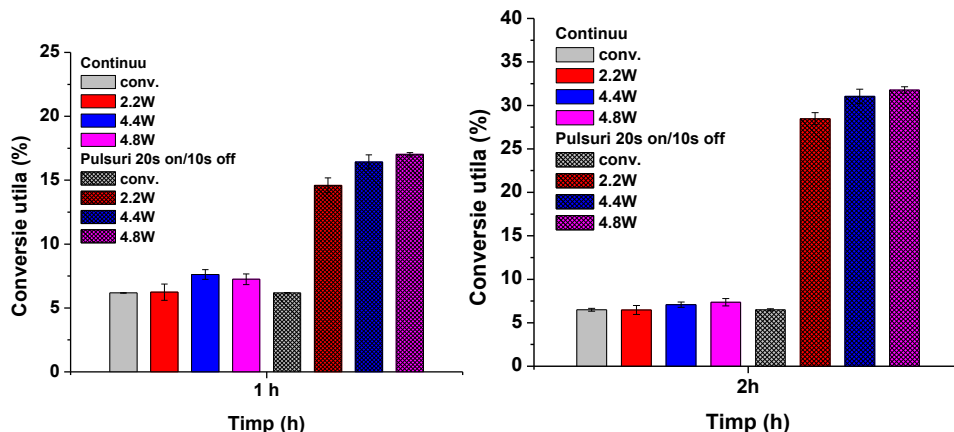


Figura C3.14: Conversia utila după 1 oră și 2 ore de reacție, ultrasunetele au fost aplicate cu baia Rheus, la diferite puteri acustice, folosind ca reactant etanol 96%, ultrasunetele au fost aplicate în mod continuu sau în pulsuri de 20s on/10s off

Concluzii Parțiale

În această etapă s-a studiat determinarea puterii ultrasonice pentru echipamentul cu baia RHEUS. Puterea ultrasonică s-a determinat prin două metode: metoda calorimetrică și metoda de degradare a *p*-nitrofenolului în prezența ultrasunetelor. Măsurătorile s-au efectuat atât în baia cu ultrasunete (pentru trei lichide de cuplaj: apă distilată, *n*-alcani și polietilenglicol PEG 200), cât și în reactorul din sticla de transesterificare enzimatică (pentru etanol, 96%). S-a observat că la aplicarea ultrasunetelor în baia RHEUS cea mai mare putere ultrasonică se obține pentru fluidul de cuplaj polietilenglicol PEG 200, iar cea mai mică pentru *n*-alcani. PEG 200 absoarbe cea mai mare cantitate de energie, pe când *n*-alcanii absorb cel mai puțin energia vibrațională. Pentru a confirma formarea radicalilor liberi, și a putea cuantifica efectul acestora, s-au realizat experimente în câmp acustic, urmărind concentrația de *p*-nitrofenol în timp, la diferite amplitudini ale undelor acustice. Se poate observa comportamentul diferit al celor trei solvenți utilizați drept lichid de cuplaj în transferul energiei ultrasonice care poate determina degradarea *p*-nitrofenolului. Cea mai mare scădere a concentrației de *p*-nitrofenol s-a obținut pentru apă, iar cea mai mică scădere pentru polietilenglicol.

Dupa calibrarea reactorului si alegerea celui mai buna lichid de cuplaj s-au efectuat experimentari pentru transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu etanol. Au fost puse in evidenta influenta concentratiei de apa in etanol (cele mai bune rezultate au fost obtinute la o concentratie scazuta de apa de doar 0,5%); a puterii ultrasonice aplicate si pulsurilor aplicate (rezultate mai bune au fost obtinute la aplicarea in pulsuri 20s ON si 10 s Off, in comparatie cu aplicare in mod continuu) și a modului de aplicare a ultrasunetelor – rezultatele cele mai bune fiind obținute la o aplicare continua timp de 20 minute urmata de desafsurarea

reacției încă 100 minute în mod convențional. În cele mai bune condiții conversia uleiului a fost de 59%.

D. Concluzii Generale

În cadrul cercetării despre intensificarea reacțiilor enzimatică cu ajutorul US s-au studiat două procese generale:

I. *Procesul de esterificare pentru obținerea acetatului de izoamil.*

Reacțiile heterogene de esterificare s-au realizat utilizând două tipuri de catalizatori solizi: enzimele depuse pe suport și rășinile schimbătoare de ioni puternic acide.

II. *Procesul de transesterificare pentru obținerea esterilor etilici ai acizilor grași (FAEE).*

Reacțiile heterogene de transesterificare s-au realizat utilizând catalizatori solizi: enzimele depuse pe suport.

I. Procesul de esterificare pentru obținerea acetatului de izoamil

a) Esterificarea enzimatică

S-a urmărit intensificarea procesului de esterificare a acidului acetic cu alcool izoamilic catalizat de enzima depusă pe suport - Lipozyme 435. Studiul s-a efectuat utilizând diferite condiții pentru a determina efectul unor parametri operaționali asupra producției de acetat de izoamil. Au fost determinate cele mai bune condiții de ultrasonicare pentru îmbunătățirea activității, stabilității și reutilizării enzimei.

Au fost utilizate două tipuri de reactoare distincte: un reactor discontinuu cu agitare și un reactor de tip "Loop".

Pentru reactorul discontinuu intensificarea procesului s-a realizat cu ajutorul unor băi de ultrasunete. Pentru a obține o cantitate maximă de ester, a fost studiat efectul diferiților parametri (cantitatea de enzimă, raportul molar alcool-acid, puterea ultrasunete și temperatură) asupra sintezei acetatului de *i*-amil prin cataliză enzimatică. Cel mai bun rezultat a fost obținut utilizând 50 mg/g Lipozyme 435, raport molar alcool *i*-amilic:acid acetic 2:1 și o temperatură de 50 °C. Cel mai important parametru studiat în această etapă este puterea de ultrasunete, care corelată cu temperatura de reacție a fost de 8.5 mW/cm³. S-a observat că o creștere a puterii ultrasonice la temperaturi scăzute duce la o creștere a concentrației de esteri în masa finală de reacție. La temperaturi mai ridicate (> 60 °C) creșterea puterii ultrasonice dezactivează enzima și concentrația de esteri obținută scade.

Pentru a crește eficiența de utilizare a enzimei s-a utilizat un reactor de tip "loop". În reactor se afla 0,8 g de enzima iar volumul liber al reactorului este de 0,8 mL, în acest fel se asigură un raport foarte bun între cantitatea de enzima raportată la volumul de reactant. Pentru a putea trata un volum mai mare de reacție, amestecul de reacție se stochează într-un vas de unde este pompat în mod continuu prin reactor. În acest fel cantitatea de enzimă este redusă față de cea utilizată în reactorul cu agitare discontinuu. Reactorul de tip "loop" a fost utilizat într-o baie de ultrasunete sau într-o construcție specială unde ultrasunetele sunt furnizate de o sonda de tip Vibracell. Pentru fiecare configurație a reactorului de tip "loop" utilizat în baia

de ultrasunete s-au determinat calorimetric densitatea de putere ultrasonica. Au fost studiată influența diverșilor parametri asupra vitezei procesului de esterificare: debitul de lichid, densitatea de putere, ciclul de aplicare On/Off a ultrasunetelor. Pentru aplicarea ultrasunetelor în mod continuu a fost stabilită cea mai bună putere ultrasonica ca fiind cea de 11,3 W/kg. La aplicarea ultrasunetelor în regim ON/OFF nu s-au obținut valori mai bune decât la aplicarea ultrasunetelor în mod continuu. S-a pus în evidență și dezactivarea în timp a enzimei utilizată succesiv în reacție, fără a fi reactivată.

Utilizarea unui reactor de tip "loop" scufundat în baia de US pentru intensificarea procesului de esterificare enzimatică nu a permis obținerea unor rezultate mai bune decât cele obținute la reactorul clasic cu agitare. Din acest motiv au fost continuate cercetările prin utilizarea unui reactor de tip "loop" iar intensificarea procesului s-a realizat prin utilizarea unei sonde de US care se poate poziționa la diferite distanțe de reactor.

S-a urmărit punerea în evidență a efectului US asupra formării de radicali liberi și ulterior asupra intensificării transferului de masă. În acest fel s-a obținut o configurație a reactorului în care să se obțină un efect favorabil asupra transferului de masă dar cu formare redusă de specii active. Odata obținută aceasta configurație s-a studiat procesul de esterificare enzimatică.

În configurația optimă s-a realizat programul experimental pentru studierea influenței ultrasunetelor (amplitudine, ciclul de funcționare și timpul de sonicare) și temperaturii asupra procesului de esterificare enzimatică. S-au obținut valori mult mai bune (450 mg ester/g amestec reacție) decât în cazul reactorului tip "loop" operat în baia de ultrasunete (321 mg ester/g amestec reacție) sau în cazul reactorului discontinuu cu agitare (386 mg ester/g amestec reacție) deși timpul real de sonicare a fost de ordinul minutelor.

În următoarea etapă a cercetării experimentale s-a studiat esterificarea acidului acetic cu alcoolul izoamilic utilizând drept catalizatori rășini schimbătoare de ioni și s-a urmărit influența diferiților parametri asupra procesului continuu de esterificare asistată de ultrasunete. Procesul de esterificare în cataliză heterogenă în prezența rășinilor schimbătoare de ioni, asistat de ultrasunete a acidului acetic cu alcoolul izoamilic a fost efectuat utilizând diferite condiții pentru a determina cei mai buni parametri pentru a obține cele mai mari concentrații de ester. Pentru aceasta s-a studiat influența amplitudinii ultrasunetelor și a tipului de sonicare continuu sau în pulsuri asupra concentrației de ester obținută în procesul de esterificare prin metoda convențională sau asistată de ultrasunete.

Cea mai mare concentrație de ester (300 mg ester/g amestec de reacție) a fost atinsă la o amplitudine cu ultrasunete de 35% și la un ciclu de lucru de 50%. Rezultatele arată o perspectivă favorabilă a tehnicii cu ultrasunete pentru a îmbunătăți eficiența procesului și a reduce timpul de reacție atunci când se utilizează Dowex 50 (X8) – viteza procesului intensificat cu US este de aprox. 2 ori mai mare decât a procedeului convențional

II. Procesul de transesterificare pentru obținerea esterilor etilici ai acizilor grași (FAEE)

În această etapă s-a studiat reacția de transesterificare enzimatică a uleiului vegetal de floarea soarelui cu alcool etilic folosind enzima imobilizată pe suport Lipozyme 435. Au fost

efectuate experimente prin două metode: metoda convențională și metode asistate de ultrasunete. Prin metoda convențională s-a studiat influența cantității de enzimă și utilizarea diferitelor tipuri de sisteme de agitare. De remarcat este faptul că la o cantitate de 0.4 g enzimă se obține o cantitate destul de mare de esteri (foarte apropiată de cea obținută după 6 ore). Scurtarea timpului de transesterificare poate să compenseze creșterea cantității de enzimă din punctul de vedere al costurilor procesului.

Reacțiile asistate de ultrasunete au avut loc folosind trei echipamente diferite de generare a undelor acustice: o baie de ultrasunete Rheus, un echipament tip sondă- Vibracell și un echipament în care undele acustice generate sunt transmise de-a lungul unei țevi- MMM clamp-on. Creșterea cantității de enzimă a condus la creșterea concentrației esterilor obținuți. La utilizarea ultrasunetelor creșterea amplitudinii US a condus la creșterea cantității de ester formată, însă peste anumite valori se poate dezactiva enzima.

Puterea ultrasonica este mai mare pentru apă distilată și mai mică pentru etanol, și mult mai mică pentru ulei. Puterea generată de ultrasunete este dependentă de presiunea de vapori a fluidului folosit, acesta fiind motivul pentru care puterea absorbită de etanol este mai mică decât în cazul apei. Modul în care undele acustice sunt propagate în fluid este funcție și de vâscozitatea fluidului utilizat, uleiul fiind un fluid cu o vâscozitate ridicată, absoarbe o putere ultrasonică mult mai mică.

Efectul de intensificare a procesului cu ultrasunete a fost foarte vizibil atunci când ultrasunetele s-au aplicat pentru o perioadă limitată (20 minute) urmate de o perioadă de reacție convențională de 100 minute. În acest fel s-a obținut o creștere semnificativă a vitezei de reacție și a conversiei uleiului în esteri etilici. Astfel conversia uleiului a crescut la 60,19% – activare cu US 20 minute, față de 31,2% – convențional.

Dupa calibrarea reactorului și alegerea celui mai bun lichid de cuplaj s-au efectuat experimentari pentru transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu etanol. Au fost puse în evidență influența concentrației de apă în etanol (cele mai bune rezultate au fost obținute la o concentrație scăzută de apă de doar 0,5%); a puterii ultrasonice aplicate și pulsurilor aplicate (rezultate mai bune au fost obținute la aplicarea în pulsuri 20s ON și 10 s Off, în comparație cu aplicare în mod continuu) și a modului de aplicare a ultrasunetelor – rezultatele cele mai bune fiind obținute la o aplicare continuă timp de 20 minute urmată de desfășurarea reacției încă 100 minute în mod convențional. În cele mai bune condiții conversia utilă a uleiului a fost de 59%.

E. Contribuții Proprii

Elementele de originalitate care se disting în urma acestei cercetări sunt:

- ✓ S-au determinat condițiile optime pentru intensificarea proceselor de esterificare enzimatică cu ajutorul ultrasunetelor
- ✓ S-au determinat condițiile optime pentru intensificarea proceselor de esterificare catalizate de rășini acide cu ajutorul ultrasunetelor
- ✓ S-au determinat condițiile optime pentru intensificarea proceselor de transesterificare enzimatică cu ajutorul ultrasunetelor

- ✓ S-a realizat și brevetat o instalație cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatic

F. Direcții Viitoare de Cercetare

Având în vedere cele prezentate mai sus se poate concluziona că lucrarea de față și-a atins obiectivele propuse.

Studiul experimental poate fi continuat în special în direcția ridicării la scară industrială a instalației ce permite intensificarea reacțiilor de esterificare și transesterificare catalizate de ultrasunete sau răsini acide cu ultrasunete și/sau microunde.

În continuare se pot realiza studii pentru activarea enzimelor cu ajutorul ultrasunetelor în etapa de pretratament a catalizatorului.

Se poate studia efectul ultrasunetelor asupra unui spectru mai larg de catalizatori de tip enzimă și pentru diverse tipuri de reacții.

G. Lista Publicațiilor

Articole publicate:

1. Calinescu, I., **A. Vartolomei**, I. A. Gavrilă, M. Vinătoru and T. J. Mason (2019). "A reactor designed for the ultrasonic stimulation of enzymatic esterification." *Ultrasonics Sonochemistry* 54: 32-38; WOS:000466997500004. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.018>; (**IF = 6.75**)
2. **Vartolomei, A.**, I. Calinescu, M. Vinătoru and A. Gavrilă (2019). "Intensification of the Enzymatic Esterification Process by Ultrasounds." *Revista De Chimie* 70(1): 41-44; WOS:000460428100009. (**IF = 1.755**)
3. **Vartolomei, A.**, Calinescu, I., Gavrilă, A. I., & Vinătoru, M. Ultrasound Assisted Synthesis of Isoamyl Acetate Catalysed By Acidic Ion Exchange Resin, *Bull.UPB.*, vol.83, (1), pp113-124, WOS:000627764100010
4. **Vartolomei, A.**, Calinescu, I., Vinătoru, M. et al. A parameter study of ultrasound assisted enzymatic esterification. *Sci Rep* 12, 1421 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05551-x> (**IF = 4.379**)

Brevete:

1. I. Calinescu, M. Vinătoru, A. Gavrilă, **A. Vartolomei**, N. Ignat, INSTALAȚIE CU ULTRASUNETE DESTINATĂ STUDIULUI REACȚIILOR ENZIMATICE brevet nr. 133341; 30 Decembrie 2021.

Participari la conferinte:

- 1: **A., Vartolomei**, I., Calinescu, I-A., Gavrilă, M., Vinatoru, T. J., Mason, A reactor designed for the ultrasonic stimulation of enzymatic esterification, *4th International Caparica Conference on Ultrasonic-based Applications: from analysis to synthesis 2020, 01–04 iunie, 2020, Costa de Caparica, Portugalia*
- 2: Adina Ionuta Gavrilă, **Anamaria Vartolomei**, Mircea Vinatoru, Ioan Calinescu, The effect of ultrasounds on enzymatic transesterification, *4th International Caparica Conference on Ultrasonic-based Applications: from analysis to synthesis 2020, 01–04 iunie, 2020, Costa de Caparica, Portugalia*
- 3: **A. Vartolomei**, I. Calinescu, A.I. Gavrilă, M. Vinatoru, Activation with ultrasounds of Lipozyme 435 for esterification and transesterification reactions, *Chemistry Conference for Young Scientists - ChemCYS 2020, 19–21 februarie, 2020, Blankenberge, Belgia*
- 4: Adina Ionuta Gavrilă, **Anamaria Vartolomei**, Ioan Calinescu, Mircea Vinatoru, Biodiesel Synthesis by Ultrasound Assisted Enzymatic Transesterification, *International Chemical Engineering & Catalysis Conference (Chemical Engineering & Catalysis-2019), 12 - 13 decembrie 2019, Londra, Marea Britanie*
- 5: **Anamaria Vartolomei**, Ioan Calinescu, Mircea Vinatoru, Adina I. Gavrilă, Lipozyme 435 esterification activity improvement using short term treatments with ultrasounds, *21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE), 4 - 7 septembrie 2019, Constanta-Mamaia, ROMANIA*
- 6: **Anamaria Vartolomei**, Ioan Calinescu, Adina-Ionuta Gavrilă, Mircea Vinatoru, Optimisation of the ultrasonic assisted lipase catalysed reaction of acetic acid with isoamyl alcohol, *International Symposium of Chemical Engineering and Materials SICHEM 2018, 6 – 7 September, Bucharest, Romania*
- 7: **Anamaria Vartolomei**, Ioan Calinescu, Adina I. Gavrilă, Mircea Vinatoru, Ultrasound Assisted Enzymatic Synthesis Of Iso-Amil Acetate, *"Young Researchers" International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE II), Budapest, Hungary, May 03–05, 2018*
- 8: Vinatoru M., Calinescu I. ,**Vartolomei A-M**, Gavrilă I-A, Effects of Ultrasound on Enzymatic Esterification, *16th Meeting of the European Society of Sonochemistry, Universite Bourgogne Franche-Comte, Besancon, April 15 -19, 2018*
- 9: **Anamaria Vartolomei**, Adina Ionuta Gavrilă, Ioan Calinescu, Intensification of Enzymatic Synthesis of Esters in Ultrasound Assisted System, *20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering Poiana Brasov, ROMANIA - September 6-9, 2017*

Bibliografie

1. Monot, F., et al., *Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis*. Appl Microbiol Biotechnol, 1991. **35**(759-765).
2. Güvenç, A., et al., *Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(4): p. 778-785.
3. Torres, S., A. Pandey, and G.R. Castro, *Banana flavor: Insights into isoamyl acetate production*. 2010.
4. Khan, N.R. and V.K. Rathod, *Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review*. Process Biochemistry, 2015. **2015**.
5. Rajendran, A., A. Palanisamy, and V. Thangavelu, *Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries*. Braz. Arch. Biol. Technol. , 2009. **52**(1): p. 207-219.
6. Zare, M., M.-T. Golmakani, and M. Niakousari, *Lipase synthesis of isoamyl acetate using different acyl donors: Comparison of novel esterification techniques*. Lwt, 2019. **101**: p. 214-219.
7. Aravindan, R., P. Anbumathi, and T. Viruthagiri, *Lipase applications in food industry*. Indian Journal of Biotechnology, 2007. **6**: p. 141-158.
8. Khan, N.R. and V.K. Rathod, *Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters: A mini - review*. Process Biochemistry, 2018. **75**: p. 89-98.
9. Burdock, G.A., *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients* Vol. 6th edition. 2010: CRC Press. 2159
10. Pal, P., F. Banat, and A. AlShoaibi, *Adsorptive removal of heat stable salt anions from industrial lean amine solvent using anion exchange resins from gas sweetening unit*. Journal of Natural Gas Science and Engineering, 2013. **15**: p. 14-21.
11. Delgado-Povedano, M.M. and M.D. Luque de Castro, *A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship*. Anal Chim Acta, 2015. **889**: p. 1-21.
12. Duque-Bernal, M., et al., *Kinetic study on the homogeneous esterification of acetic acid with isoamyl alcohol*. International Journal of Chemical Kinetics, 2013. **45**(1): p. 10-18.
13. Teo, H. and B. Saha, *Heterogeneous catalysed esterification of acetic acid with isoamyl alcohol: kinetic studies*. Journal of Catalysis, 2004. **228**(1): p. 174-182.
14. Singh, N., R. Kumar, and P.K. Sachan, *Kinetic Study of Catalytic Esterification of Butyric Acid and Ethanol over Amberlyst 15*. International Scholarly Research Notices, 2013. **2013**.
15. Toor, A.P., et al., *Ion-exchange Resin Catalyzed Esterification of Lactic Acid with Isopropanol: a Kinetic Study*. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis, 2011. **6**(1): p. 39-45.
16. Patterson, M.A. and R.D. Reitz, *Modeling the Effects of Fuel Spray Characteristics on Diesel Engine Combustion and Emission*, in SAE Technical Paper 980131. 1998: USA.
17. Pearl, G.G., *Animal fat potential for bioenergy use*, in The Tenth Biennial Bioenergy Conference. 2002, Bioenergy 2002: Boise, ID, USA.
18. Ma, F. and M.A. Hanna, *Biodiesel production: A review*. Bioresour Technol., 1999. **70**: p. 1-15.
19. Fukuda, H., A. Kondo, and H. Noda, *Biodiesel fuel production by transesterification of oils*. J. Biosci. Bioeng. , 2001. **92**(5): p. 405-416.
20. Ranganathan, S.V., S.L. Narasimhan, and K. Muthukumar, *An overview of enzymatic production of biodiesel*. Bioresour Technol, 2008. **99**(10): p. 3975-81.

21. Freedman, B., E.H. Pryde, and T.L. Mounts, *Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils*. JAOCS, 1984. **61**: p. 1638-1643.
22. Nelson, L.A., T.A. Foglia, and W.N. Marmer, *Lipase-catalyzed production of biodiesel*. Journal of the American Oil Chemists' Society 1996. **73**: p. 1191–1195.
23. Vazquez Lima, F., D.L. Pyle, and J.A. Asenjo, *Factors Affecting the Esterification of Lauric Acid Using an Immobilized Biocatalyst : Enzyme Characterization and Studies in a Well-Mixed Reactor*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **46**: p. 69-79.
24. Hoyos, M. and A. Castro, *Controlling the acoustic streaming by pulsed ultrasounds*. Ultrasonics, 2013. **53**(1): p. 70-6.
25. Vinatoru, M. and T. Mason, *Comments on the use of loop reactors in sonochemical processes*. Ultrason Sonochem, 2017. **39**: p. 240-242.
26. Mason, T.J., J.P. Lorimer, and D.M. Bates, *Quantifying sonochemistry: Casting some light on a 'black art'*. Ultrasonics, 1992. **30**(1): p. 40-42.
27. Mason, T.J. and A. Tiehm, *Advances in Sonochemistry*. Vol. 6. 2001: JAI Press 284.
28. Calinescu, I., et al., *A reactor designed for the ultrasonic stimulation of enzymatic esterification*. Ultrasonics - Sonochemistry, 2019. **54**: p. 32-38.
29. Ozbek, B. and K.O. ülgün, *The stability of enzymes after sonication*. Process Biochemistry, 2000. **35**: p. 1037-1043.
30. Brotchie, A., F. Grieser, and M. Ashokkumar, *Effect of power and frequency on bubble-size distributions in acoustic cavitation*. Phys Rev Lett, 2009. **102**(8): p. 084302.
31. Yu, D., et al., *Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435*. Process Biochemistry, 2010. **45**(4): p. 519-525.