

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului
„Cristofor Simionescu”



STUDIUL PERFORMANTELOR UNOR BIOREACTOARE ȘI BIOPROCESE CU BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

- REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT -

Ing. Ramona-Mihaela Matran (Găbăruță)

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. ing. Dan Cașcaval

IAȘI, 2019

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 06.12.2019 la ora 10:30, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu” din Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“ STUDIUL PERFORMANȚELOR UNOR BIOREACTOARE ȘI BIOPROCESE CU
BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI”

elaborate de doamna Ramona-Mihaela Matran (Găbăruța), în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof.dr.ing. Teodor Măluțan - Univ. Tehnică „Gh.Asachi” din Iași | președinte |
| 2. Prof.dr.ing. Dan Cașcaval - Univ. Tehnică „Gh.Asachi” din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof.dr.ing. Anca-Irina Galaction - Univ. de Medicina și Farmacie „Gr.T. Popa” din Iași | referent oficial |
| 4. Prof.dr.ing. Horia Iovu - Univ. Politehnică din București | referent oficial |
| 5. Prof.dr.ing. Ioan Mamaligă - Univ. Tehnică „Gh.Asachi” din Iași | referent oficial |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. DAN CAȘCAVAL

Secretar universitate,

Ing.Cristina Nagîț

CUPRINS

I.	INTRODUCERE	5
II.	STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRIILOR ÎN DOMENIUL BIOREACTOARELOR CU BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI	7
	II.1. Bioreactoare cu celule / enzime imobilizate	7
	II.2. Bioreactoare cu strat mobil de biocatalizatori imobilizați	10
	II.3. Bioreactoare cu strat fix tip “basket” de biocatalizatori imobilizați	10
	II.4. Bioreactoare pneumatice cu biocatalizatori imobilizați	11
	II.5. Amestecarea în bioreactoarele cu biocatalizatori imobilizați	13
	II.5.1. Bioreactoare cu strat mobil de biocatalizatori imobilizați	13
	II.5.2. Bioreactoare cu strat fix tip “basket” de biocatalizatori imobilizați	16
	II.5.3. Bioreactoare pneumatice cu biocatalizatori imobilizați	19
	II.6. Transferul de masă în bioreactoarele cu biocatalizatori imobilizați	30
	II.6.1. Aspecte generale privind transferul de masă în cataliză eterogenă	30
	II.6.2. Studii privind transferul de masă în granule libere sau imobilizate de biocatalizatori	41
III.	ECHIPAMENTE ȘI TEHNICA EXPERIMENTALĂ	55
	III.1. Bioreactoare și echipamente de laborator	55
	III.2. Procese analizate	59
	III.3. Metode de analiză	61
	III.4. Metode de determinare (timpul de amestecare)	62
IV.	BIOREACTOARE CU STRAT MOBIL DE BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI	64
	IV.1. Studiul eficienței hidrolizei enzimatice a Penicilinei G la acid 6-aminopenicilanic	64
	IV.2. Studiul transferului de masă al Penicilinei G	69
V.	BIOREACTOARE CU STRAT „BASKET” DE BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI	81
	V.1. Obținerea acidului 6-aminopenicilanic prin scindarea enzimatică a Penicilinei G	81

V.2. Biosinteza acidului succinic cu celule de <i>Actinobacillus succinogenes</i> imobilizate	88
VI. BIOREACTOARE GAZ-LIFT CU BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI	101
VI.1. Studiul eficienței și distribuției amestecării	101
VI.1.1. Lichide de fermentație simulate	103
VI.1.2. Suspensii de celule libere <i>Yarrowia lipolytica</i>	112
VI.2. Degradarea lipidelor cu celule de <i>Bacillus sp.</i> imobilizate	123
VI.2.1. Cinetica degradării aerobe a lipidelor cu <i>Bacillus sp.</i>	125
VII. CONCLUZII GENERALE	139
VIII. ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ DIN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT	140
IX. BIBLIOGRAFIE	142

Rezumatul tezei prezintă, într-o formă succintă, rezultatele originale obținute în cadrul studiilor de doctorat și concluziile generale. Cuprinsul rezumatului păstrează aceeași numerotare/paginație cu teza extinsă, iar la redactarea rezumatului au fost utilizate aceleași notații pentru capitole, figuri și tabele din cadrul tezei de doctorat.

Mulțumiri

Doresc să mulțumesc în primul rând domnului Profesor dr. ing. Dan Cașcaval pentru susținerea și îndrumarea pe parcursul studiilor de licență, masterat și mai ales doctorat, pentru răbdarea, sprijinul și încurajarea acordate pe întreaga perioadă de desfășurare a doctoratului.

De asemenea, mulțumesc doamnei Profesor dr. ing. Anca-Irina Galaction pentru îndrumarea oferită pe parcursul anilor de doctorat.

Mulțumesc în special membrilor comisiei de îndrumare (Șef lucr.dr.ing. Alexandra Cristina Blaga și Șef lucr.dr.bioing. Lenuța Kloetzer), precum și doamnei Șef lucr.dr.ing. Alexandra Tucaliuc pentru îndrumările și sfaturile din timpul activității de cercetare, pentru susținerea și încurajările permanente, pentru sprijinul necondiționat oferit pe parcursul timpului.

De asemenea, mulțumesc membrilor comisiei pentru acceptarea evaluării tezei mele de doctorat (D-nul Prof.dr.ing. Teodor Măluțan - Univ. Tehnică „Gh.Asachi” din Iași, D-na Prof.dr.ing. Anca-Irina Galaction - Univ. de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” din Iași, D-nul Prof.dr.ing. Horia Iovu - Univ. Politehnică din București, D-nul Prof.dr.ing. Ioan Mamaligă - Univ. Tehnică „Gh.Asachi” din Iași).

Nu în ultimul rând, doresc să adresez mulțumiri fiecărui cadru didactic/membru din personalul auxiliar care a contribuit la formarea mea personală și profesională.

Cu respect,

Ing. Ramona-Mihaela Matran (Găbăruță)

I. INTRODUCERE

Una dintre direcțiile principale ale biotehnologiei o reprezintă caracterizarea și optimizarea bioprocесelor realizate în bioreactoare cu diverse configurații ale straturilor de biocatalizatori. În funcție de particularitățile și necesitățile proceselor biotehnologice, biocatalizatorii pot fi utilizați în formă liberă sau imobilizată, iar pentru realizarea experimentelor din cadrul tezei de doctorat s-a ales varianta imobilizată a acestora. În acest context, pe baza rezultatelor experimentale referitoare la influența factorilor de mediu (pH, temperatură, caracteristicile biomasei (concentrație celulară, viscozitate, diametrul de imobilizare) și prezența fenomenelor de inhibiție) și a parametrilor de operare ai bioreactoarelor, au fost formulate modele matematice pentru caracterizarea și optimizarea bioprocесelor analizate.

Teza de doctorat cuprinde două părți principale (A și B) și se extinde pe 153 de pagini, care conțin 72 figuri, 14 tabele, 96 ecuații matematice și 171 indicații bibliografice, dintre care 9 indicații proprii.

Prima parte a tezei face referire la stadiul actual al cercetărilor din domeniul bioreactoarelor cu biocatalizatori imobilizați și este alcătuită din 6 subcapitole. Astfel, în cele 6 subcapitole ale părții introductive, sunt sintetizate rezultatele anterioare referitoare la diverse aspecte ale proceselor biotehnologice cu biocatalizatori imobilizați, precum:

- ✓ performanțele comparative ale bioreactoarelor cu configurații diferite ale straturilor de biocatalizatori imobilizați (mobilă, strat fix și strat fix tip "basket");
- ✓ amestecarea din bioreactoarele cu agitare mecanică și pneumatică (sisteme de amestecare mecanică și pneumatică, caracterizarea și îmbunătățirea amestecării etc.);
- ✓ transferul de masă din bioreactoarele cu biocatalizatori imobilizați (difuzia internă și externă a substratului, cinetica enzimelor libere și imobilizate, caracterizarea și optimizarea transferului de masă, studii de caz privind transferul de masă în granule libere sau imobilizate de biocatalizatori etc.).

Cea de-a doua parte a tezei de doctorat reprezintă rezultatele cercetărilor proprii efectuate în domeniul bioreactoarelor cu biocatalizatori imobilizați. Contribuțiile originale la domeniul abordat sunt grupate în 4 capitole, respectiv 10 subcapitole. Primul capitol face referire la tehnica experimentală utilizată în procesele biotehnologice studiate (bioreactoarele și echipamentele de laborator, metodele de analiză și de determinare etc.).

Următoarele 3 capitole din partea experimentală abordează separat tipuri distincte de bioreactoare cu biocatalizatori imobilizați, în funcție de configurația stratului de biocatalizatori (mobilă, fixă și fixă de tip "basket") și de sistemul de amestecare al mediului (mecanică sau pneumatică). Astfel, capitolul IV cuprinde rezultatele experimentale referitoare la bioreactoarele cu amestecare mecanică și strat mobil de biocatalizatori imobilizați (*penicilinamidază* imobilizată), prin determinarea prealabilă a condițiilor optime de operare și caracterizarea ulterioară a transferului de masă al penicilinei G în procesul de scindare enzimatică la acidul 6-aminopenicilanic, în condiții de inhibiție de substrat și de produs.

Ulterior, în capitolul V au fost realizate studii comparative privind influența

configurației stratului de biocatalizatori (mobilă și fixă, de tip basket “staționar”) asupra performanțelor bioreactoarelor cu amestecare mecanică.

Astfel, în prima parte a fost analizată performanța procesului de scindare enzimatică a penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic, sub aspectul transferului de masă (intern și extern) al substratului. Particulele imobilizate de *penicilinamidază* au fost dispuse comparativ sub forma configurațiilor considerate, iar determinarea variantei optime de operare s-a realizat prin raportarea parametrilor caracteristici (coeficienților de transfer de masă ai substratului, fluxurilor masice externe, concentrațiilor penicilinei G de la suprafața particulelor de biocatalizatori și a factorilor de eficacitate). De asemenea, fermentația acidului succinic a fost concepută într-o manieră similară, iar rezultatele comparative referitoare la operarea cu strat fix sau mobil de celule imobilizate de *A. succinogenes* sunt prezentate în subcapitolul V.2 al tezei de doctorat.

Ultimul capitol din partea experimentală a tezei de doctorat prezintă rezultatele proprii referitoare la performanțele bioreactoarelor air-lift cu amestecare pneumatică, sub aspectul caracterizării hidrodinamicii mediului, dar și al stabilirii influenței barbotării aerului asupra vitezelor proceselor biochimice. În acest context, a fost analizată eficiența și distribuția intensității amestecării lichidelor de fermentație simulate (apă și soluții vâscoase de carboximetilceluloză sodică) și reale (suspensii de drojdii *Yarrowia lipolytica*), prin stabilirea influenței cumulate a parametrilor considerați (viscozitatea aparentă a mediului, viteza superficială a aerului, poziția pe înălțimea bioreactorului) asupra timpului de amestecare, pentru fiecare din cele două regiuni de circulație a mediului (ascendentă și descendentă).

De asemenea, în ultimul capitol din partea experimentală se regasesc rezultatele proprii referitoare la caracterizarea procesului de epurare biologică a apelor reziduale provenite din industria uleiului de măsline. În acest sens, a fost realizată analiza comparativă a proceselor de biodegradare aerobă și anaerobă a lipidelor cu amestec microbial de *Bacillus sp.*, în scopul stabilirii influenței prezenței și concentrației oxigenului dizolvat în mediu asupra vitezei de consum a substratului. Astfel, a fost stabilit un nou model matematic privind cinetica de consum a lipidelor în procesul de epurare biologică aerobă, care a fost comparat cu modelul anterior privitor la performanța procesului anaerob.

Rezultatele cercetărilor proprii s-au concretizat în elaborarea și publicarea a 9 lucrări științifice, participarea la 7 sesiuni științifice naționale și internaționale, precum și prin participarea la derularea unui grant de cercetare.

B. CONTRIBUȚII ORIGINALE

III. ECHIPAMENTE ȘI TEHNICA EXPERIMENTALĂ

III.1. BIOREACTOARE ȘI ECHIPAMENTE DE LABORATOR

Experimentele cu biocatalizatori imobilizați au fost realizate în patru bioreactoare de laborator de capacități și configurații diferite, prevăzute cu amestecare mecanică sau pneumatică, în funcție de particularitățile și necesitățile proceselor biotehnogice. De asemenea, straturile de biocatalizatori imobilizați au fost dispuse în configurații diferite (mobilă, fixă și fixă de tip “basket”) și analizate comparativ, în scopul stabilirii configurației optime pentru eficientizarea proceselor studiate.

În procesele cu amestecare mecanică au fost utilizate bioreactoare de tipul Biostat A (B. Braun Biotech International) cu volumul util de 4l (figura III.1, tabelul III.1) și Fermac 320 (Electrolab) cu volume utile de 8l (figura III.2a, b; tabelul III.3) și 1l (figura III.3a, b; tabelul III.3), prevăzute cu sisteme computerizate de control și monitorizare a parametrilor de funcționare.



Figura III.1. Bioreactorul cu amestecare mecanică și strat mobil de biocatalizatori (tip Biostat A, volum total 5 l/volum util 4 l)

Tabelul III.1. Caracteristicile geometrice ale bioreactorului tip Biostat A (volum total 5l/volum util 4l) și ale sistemului de amestecare

d, mm	d/D	H/D	w/d	l/d	h/d	Nr. palete	Nr. șicane
64	0,36	2,15	0,12	0,28	1	4	3

în care: d = diametrul agitatorului, mm;

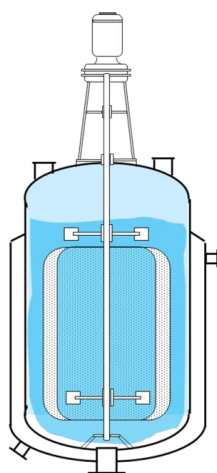
D = diametrul bioreactorului, mm;

H = înălțimea bioreactorului, mm;

w = lățimea paletei agitatorului, mm;

l = lungimea paletei agitatorului, mm;

h = distanța de la ultimul agitator la baza bioreactorului, mm;



a)

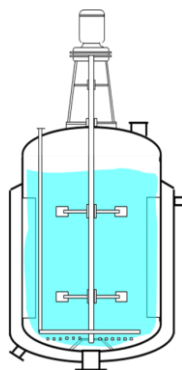


b)

Figura III.2. Bioreactorul tip „basket” (tip Fermac 310/60, volum total 10 l/volum util 8 l)
a) Reprezentarea schematică b) Modelul utilizat în studiile experimentale

Tabelul III.2. Caracteristicile geometrice ale bioreactorului Fermac 310/60
(volum util 8l) și ale sistemului de amestecare

d, mm	d/D	H/D	w/d	l/d	h/d	Nr. palete	Nr. șicane
82	0,41	1,95	0,20	0,33	0,64	6	4



a)



b)

Figura III.3. Bioreactorul cu amestecare mecanică utilizat pentru epurarea biologică a
apelor reziduale rezultate din industria uleiului de măsline
a) Reprezentarea schematică b) Modelul utilizat în studiile experimentale

Tabelul III.3. Caracteristicile geometrice ale bioreactorului Fermac 310/60
(volum util 1l) și ale sistemului de amestecare

d, mm	d/D	H/D	w/d	l/d	h/d	Nr. palete	Nr. șicane
55	0,46	1,46	0,27	0,31	0,64	6	3

Studiile experimentale privind amestecarea pneumatică au fost realizate într-un bioreactor gaz-lift cu circulație interioară cu volumul de 6 l (5 l volum util) FerMac 310/60 (Electrolab), echipat de asemenea cu sistem computerizat de monitorizare, control și înregistrare a parametrilor de funcționare (figura III.4a, b). Bioreactorul constă dintr-un cilindru de sticlă cu înălțimea de 0,49 m și diametrul de 0,125 m, iar divizarea traseului de curgere în cele două regiuni de aceeași arie transversală a fost realizată prin introducerea în poziție diametrală a unei șicane dreptunghiulare. Șicana cu dimensiunile de 0,285 m lungime, 0,125 m lățime și, respectiv, $2 \cdot 10^{-3}$ m grosime a fost amplasată la o distanță de 0,04 m față de baza bioreactorului.

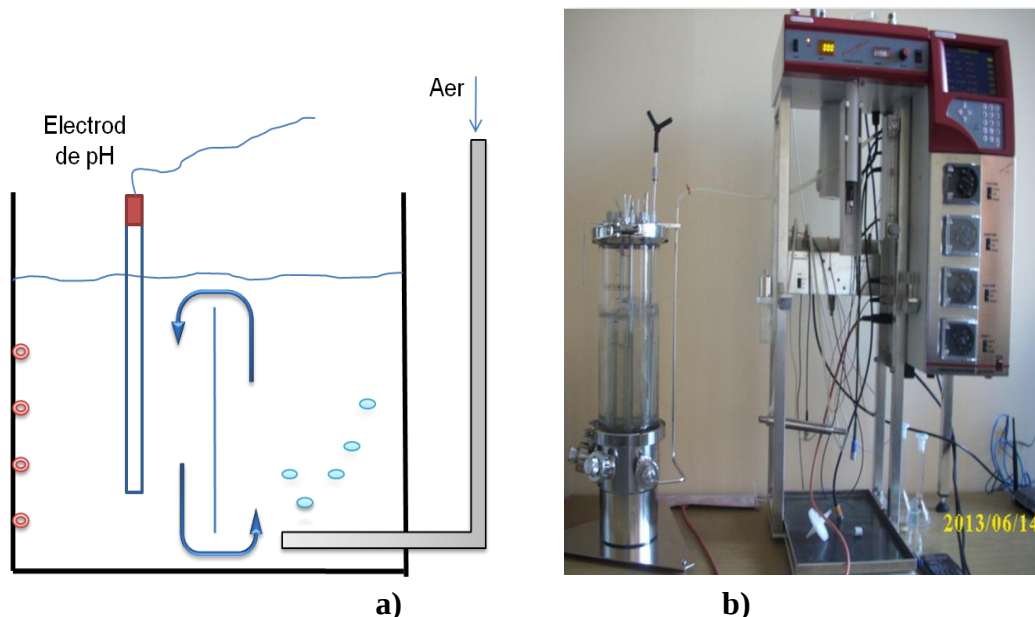


Figura III.4. Bioreactorul air-lift cu circulație interioară utilizat pentru studiul hidrodinamicii mediilor simulate și reale

a) Reprezentarea schematică b) Modelul utilizat în studiile experimentale

Sistemele de amestecare utilizate în bioreactoarele cu amestecare mecanică au constat din 3/4 șicane și agitatoare duble tip elice cu 4 palete înclinate și diametrul de 64 mm, sau tip turbină cu 6 palete drepte (fig. III.5). Agitatorul inferior a fost amplasat la o distanță de 64 mm de baza bioreactorului, iar agitatorul superior a fost montat la o distanță de 32 mm față de cel inferior. Viteza de rotație a fost menținută la 250 rpm, evitându-se formarea unor “cavități” la suprafața mediului, depunerea fazei solide la baza bioreactorului și liza mecanică a biocatalizatorilor imobilizați. Conform rezultatelor anterioare [2], această combinație a agitatoarelor și a vitezei lor de rotație este optimă pentru sistemul de fermentație studiat. De asemenea, în timpul experimentelor a fost monitorizată liza mecanică a biocatalizatorilor datorită forțelor de forfecare. Amestecarea pneumatică a fost realizată prin intermediul aerului, iar sistemul de barbotare a constat dintr-un tub perforat cu diametrul de $5 \cdot 10^{-3}$ m și lungimea de 0,05 m, amplasat la o distanță de 0,08 m față de baza bioreactorului. Debitul de aer barbotat a variat între 20 și 100 l/h (corespunzător unor viteze superficiale ale aerului barbotat de $0,45\text{--}2,25 \cdot 10^{-3}$ m/s), domeniu ce permite evitarea depunerii biomasei, precum și antrenarea mediului din bioreactor.

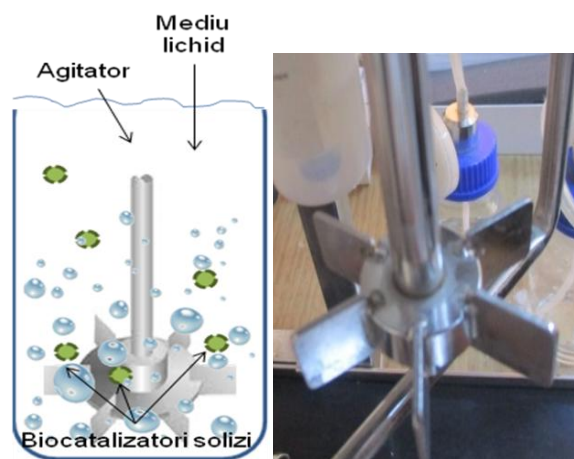


Figura III.5. Agitator tip turbină cu 6 palete

Pentru procesul anaerob de biodegradare, cantitatea de oxigen dizolvat din mediu nu a fost controlată în timpul procesului, variind liberă de la valoarea inițială de 1,6 mg/l. În cazul procesului aerob, sistemul de barbotare a constat dintr-un tub perforat cu diametrul de 7 mm, prevăzut cu patru orificii cu diametrul de 1 mm, fiind amplasat la o distanță de 15 mm față de baza bioreactorului. Debitul volumetric de aer a variat între 5 și 30 l/h, în scopul menținerii concentrației oxigenului dizolvat la o valoare constantă, prestabilită în domeniul 1,6-5,9 mg/l. Turația agitatorului a fost menținută la 150 rpm.

Operarea bioreactorului a fost realizată cu 1l emulsie apă-ulei (cu o concentrație de 10 mg/l a uleiului de măsline). Conform studiilor anterioare privind biodegradarea uleiului de măsline cu celule de *Bacillus sp.*[83], pH-ul și temperatura au fost setate și menținute la valorile optime (valoarea 8 a pH-ului și de 40 °C a temperaturii). În experimente a fost utilizat amestecul microbial de *Bacillus sp.* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* și *Bacillus ortoliquefaciens* în proporții diferite). Concentrația celulelor libere a fost de 1 g s.u./100 ml mediu.

III.2. PROCESE ANALIZATE

Studiile preliminare au vizat **optimizarea procesului de hidroliză enzimatică a Penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic**, prin determinarea parametrilor optimi de operare (valorile pH-ului și ale temperaturii, dimensiunea biocatalizatorilor și concentrația substratului) într-un bioreactor cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată (figura III.1).

Ulterior, pe baza rezultatelor obținute referitoare la condițiile optime de operare, a fost investigat **transferul de masă intern și extern al Penicilinei G în timpul conversiei enzimatice la acidul 6-aminopenicilanic**, în condiții de inhibiție de substrat și de produs. Pe baza rezultatelor experimentale au fost stabilite modele matematice ce cuantifică influența difuziei interne asupra vitezei de hidroliză enzimatică și asupra profilului concentrației Penicilinei G la exteriorul și în interiorul particulei de biocatalizator. De

asemenea, în timpul experimentelor a fost monitorizată distrugerea mecanică a biocatalizatorilor datorită forțelor de forfecare.

Penicilinamidaza din *Escherichia coli* (Fluka, de 180 UI) a fost imobilizată în Eupergit C conform metodei de legare covalentă descrisă de Torres-Bacete și colab. [84]. Indiferent de diametrul biocatalizatorilor (1, 1,5 sau 2 mm), fracția volumică a particulelor imobilizate a fost de 0,28. Substratul a fost constituit de o soluție penicilină G sare de potasiu (Merck) cu concentrația de 80-300 mol/m³. pH-ul soluției analizate a variat între 7 și 9, fiind menținut la valorile prestabilite cu ajutorul unor soluții tampon, iar temperatura la care s-a desfășurat procesul enzimatic a variat între 20 și 40 °C.

Efectul configurației stratului de biocatalizatori imobilizați asupra eficienței procesului de hidroliză enzimatică a penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic a fost stabilit în urma analizei comparative a difuziei interne și externe a substratului (penicilină G), în condiții de inhibiție competitivă și necompetitivă, prin dispunerea alternativă, în strat mobil, respectiv în strat fix, de tip „basket”, a stratului de *penicilinamidază* imobilizată (în Eupergit C) în bioreactorul cu amestecare mecanică descris anterior (figura III.2a,b).

Experimentele comparative au fost realizate în sistem discontinuu, prin modificarea configurației stratului de enzime imobilizate, de la cea liberă (mobilă) către cea fixă (staționară, de tip „basket”). Bioreactorul cu strat fix de biocatalizatori a fost prevăzut cu un strat cilindric de tip „basket” cu grosimea de 10 mm și înălțimea și diametrul interior de 100 mm. Stratul de tip „basket” a constatat dintr-o plasă de plastic, amplasată centrat în jurul agitatorului, la o distanță de 100 mm față de baza bioreactorului. Cilindrul a fost umplut cu *penicilinamidază* imobilizată în Eupergit C, conform metodelor descrise în literatură. Combinația optimă a agitatoarelor a fost de două turbine Rushton, cea superioară fiind amplasată în exteriorul stratului cilindric de tip „basket”, iar cealaltă în interiorul stratului, la extremitatea inferioară a acestuia [2].

Fermentația acidului succinic a fost concepută într-o manieră similară, prin analiza comparativă a transferului de masă intern și extern al glucozei la acidul succinic în condiții de inhibiție competitivă și necompetitivă, în bioreactorul cu amestecare mecanică descris anterior, prin dispunerea în strat mobil, respectiv în strat fix, de tip „basket”, a celulelor imobilizate de *A. Succinogenes* (figura III.2a, b).

Studiul procesului de epurare biologică aerobă a apelor reziduale rezultate din industria uleiului de măsline a fost realizat cu amestec microbial de *Bacillus sp.* și a permis stabilirea cineticii de degradare aerobă a lipidelor, prin formularea unui model matematic specific care ține cont și de influența concentrației oxigenului asupra vitezei de biodegradare a acestora. Experimentele au fost realizate în bioreactorul cu amestecare mecanică tip Fermac 310/60 cu capacitatea de 2l (figura III.3a,b), iar fermentația s-a considerat încheiată în momentul consumului total al uleiului sau al menținerii unei concentrații constante a acestuia timp de 12 h. Evoluția procesului a fost monitorizată prin intermediul variației concentrației lipidelor totale, determinată conform metodei spectrofotometrice cu trioleină [85].

Caracterizarea procesului de amestecare a mediilor simulate și reale (suspensii de celule) a fost realizată în bioreactorul gaz-lift cu circulație interioară și volumul total de

6l (figura III.4a, b), prin determinarea timpului de amestecare necesar omogenizării acestora.

Experimentele au fost realizate inițial pentru lichide de fermentație simulate de viscozitate ridicată, în absența biomasei, și, ulterior, pentru medii de cultură reale, în scopul determinării influenței prezenței masei celulare asupra eficienței amestecării. Datele experimentale obținute au fost incluse în corelații matematice dintre timpul de amestecare și parametrii considerați, pentru fiecare din cele două regiuni principale de circulație ale bioreactorului gaz-lift.

În experimente au fost utilizate următoarele medii:

- 1) Lichide de fermentație simulate, fără biomasă (apă și soluții de carboximetilceluloză sodică, cu viscozitatea aparentă cuprinsă între 5 și 26 cP);
- 2) Lichide de fermentație reale (suspensii de drojdii *Yarrowia lipolytica*, cu o concentrație a biomasei cuprinsă între 10 și 50 g/l s.u., corespunzătoare unor viscozități aparente de 2,7 - 9,5 cP).

Datorită dificultății determinării *in-situ* a viscozității în timpul experimentelor, aceasta a fost măsurată înainte și după fiecare experiment cu ajutorul unui viscosimetru de tip Viscotester 6 Plus type (Haake). Experimentele și determinarea viscozității au fost realizate la temperatura de 30°C.

III.3. METODE DE ANALIZĂ

Analiza conversiei enzimatice a penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic (A6AP) în bioreactorul cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată a fost cuantificată prin intermediul variației concentrației Penicilinei G și a acidului 6-aminopenicilanic în timpul conversiei enzimatice. Concentrația acestor componenți a fost determinată cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC), prin utilizarea unui sistem Ultimate 3000 Dionex echipat cu o coloană C18 Acclaim 120 (cu lungimea de 150 mm și diametrul de 4,6 mm) și un detector UV care operează la lungimea de undă de 220 nm. Faza mobilă a fost reprezentată de un amestec constituit din 28% acetonitril și 72% soluție de 0,64 g/l KH_2PO_4 , cu o variație a debitului de 0,7 ml/min, iar temperatura de lucru a fost de 30 °C [83].

Sfârșitul procesului enzimatic a fost considerat în momentul în care gradul de conversie enzimatică a penicilinei G a atins proporția minimă de 90-95%. Fiecare experiment a fost repetat de 2 ori în aceleași condiții de operare, iar în calcule s-au utilizat valorile medii ale valorilor considerate. Abaterea medie experimentală a fost de $\pm 6,08$ %.

Valorile experimentale ale transferului masic extern au fost calculate și analizate prin intermediul variației concentrației Penicilinei G în volumul de lichid și la suprafața particulelor de biocatalizatori în timpul conversiei enzimatice, iar determinarea concentrației Penicilinei G a fost realizată folosind tehnica HPLC menționată anterior [83]. Valorile concentrațiilor interne ale Penicilinei G sau ale transferului de masă au fost calculate exclusiv pe baza modelelor matematice propuse.

Sfârșitul hidrolizei enzimatice a fost considerat în momentul atingerii unei conversii de 90-95% a Penicilinei G. În cazul ambelor sisteme de operare a bioreactorului, probele au fost prelevate la intervale de 10, 20, 45 și 60 de minute de la debutul procesului.

Fiecare experiment a fost reluat de două ori în aceleași condițiile experimentale, iar în calcule s-a utilizat valoarea medie a rezultatelor obținute. Abaterea medie experimentală a fost de $\pm 4,11\%$ în cazul configurației cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată, respectiv de $\pm 5,03\%$ în cazul celei de tip „basket”.

Studiul privind influența configurației stratului de biocatalizatori imobilizați asupra performanței de hidroliză enzimatică a PG la A6AP a permis cuantificarea eficienței transferului de masă și a impactului său asupra performanței globale a procesului enzimatic, prin analizarea valorilor rapoartelor dintre coeficienții de transfer de masă ai PG, factorilor de eficacitate, fluxurilor masice externe și concentrațiilor Penicilinei G la suprafața particulelor de biocatalizatori. În mod similar, valorile experimentale ale transferului de masă al glucozei au fost calculate și analizate prin intermediul variației concentrațiilor substratului în volumul de lichid și la suprafața particulelor de biocatalizatori în timpul fermentației succinice. Concentrația glucozei a fost determinată utilizând un sistem HPLC prevăzut cu o coloană de tip Phenomenex Rezex ROA (cu diametrul de 7,8 mm și lungimea de 300 mm) și detector cu indice de refracție RID-10A. Faza mobilă a fost reprezentată de o soluție 0,005 N acid sulfuric, alimentată la o valoare a debitului de 0,6 ml/min, iar analizele au fost realizate la temperatura de 65°C. Sfârșitul procesului a fost considerat în momentul consumului total al glucozei sau al menținerii timp de 12 h a unei concentrații constante a acesteia.

III.4. METODE DE DETERMINARE (TIMPUL DE AMESTECARE)

Intensitatea amestecării a fost evaluată prin intermediul valorilor timpului de amestecare, determinate prin metoda trasorilor (fig. III.6). În acest scop, s-a utilizat ca trasor o soluție de KOH 2 N, măsurându-se timpul necesar atingerii pH-ului corespunzător unei intensități dorite a amestecării. În acest context, a fost adoptat nivelul de omogenitate calculat cu relația următoare:

$$I = \frac{pH_{\infty} \pm 0,5 \cdot \Delta pH}{pH_{\infty}} \cdot 100 = 99\% \quad (III.1)$$

în care I = nivelul admis de omogenitate

pH_{∞} = valoarea pH-ului corespunzătoare amestecării perfecte

$\Delta pH = 0,02$.

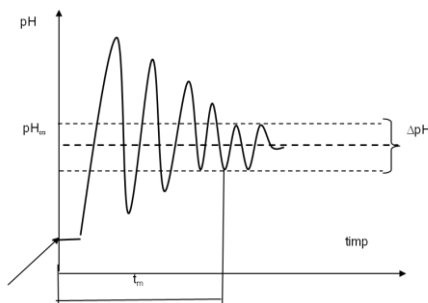


Figura III.6. Determinarea experimentală a timpului de amestecare

Volumul trasorului a fost de 0,5 ml și a fost introdus în regiunea ascendentă, la o adâncime de 10 mm sub nivelul lichidului și la o distanță de 60 mm față de axul agitatorului. Datorită densității apropiate a soluției de KOH de cea a mediului, curgerea soluției-trasor a urmărit traseul descris de lichidul de fermentație.

Variațiile valorilor de pH ale mediului, înregistrate de sistemul computerizat al bioreactorului, au fost utilizate pentru calcularea timpului de amestecare corespunzător.

Electrodul de pH (HA 405 Mettler Toledo) a fost introdus inițial în regiunea ascendentă și, ulterior, în regiunea descendentă a bioreactorului. În ambele situații, valoarea pH-ului a fost determinată pentru patru poziții diferite ale senzorului, localizate la diferite distanțe față de baza bioreactorului (figura III.7):

- poziția 1: la 0,06 m; poziția 2: la 0,16 m; poziția 3: la 0,26 m ; poziția 4: la 0,36 m.

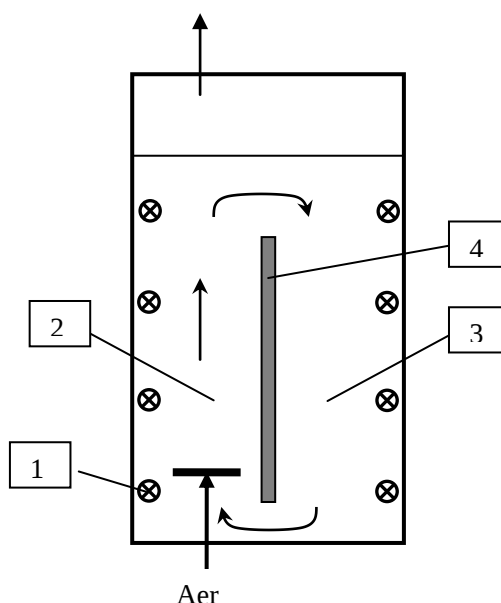


Figura III.7. Reprezentarea schematică a studiului hidrodinamicii din bioreactorul air-lift cu circulație interioară

IV. BIOREACTOARE CU STRAT MOBIL DE BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

IV.1. STUDIUL EFICIENȚEI HIDROLIZEI ENZIMATICE A PENICILINEI G LA ACID 6-AMINOPENICILANIC

Influența pH-ului mediului asupra vitezei de conversie enzimatică a penicilinei G a fost analizată pentru fiecare dintre cele 3 valori ale diametrului granulelor de *penicilinamidază* imobilizată (d_p), sub influența și în absența proceselor limitative de inhibiție de substrat. În toate cazurile, datele experimentale prezentate în figurile IV.1 și IV.2 indică o valoare optimă a pH-ului de 8, cantitatea minimă de acid 6-aminopenicilanic fiind obținută în domeniul neutru sau acid.

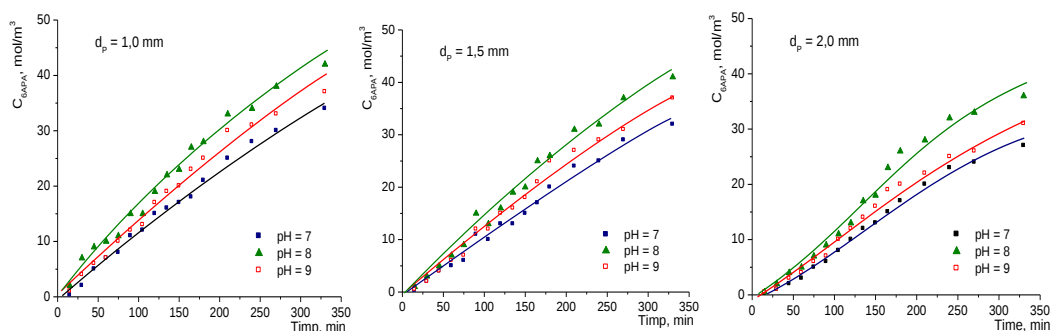


Figura IV.1. Influența valorii pH-ului și a mărimii biocatalizatorilor asupra vitezei de formare a acidului 6-aminopenicilanic ($C_{PG} = 80 \text{ mol/m}^3$, $t = 30^\circ\text{C}$)

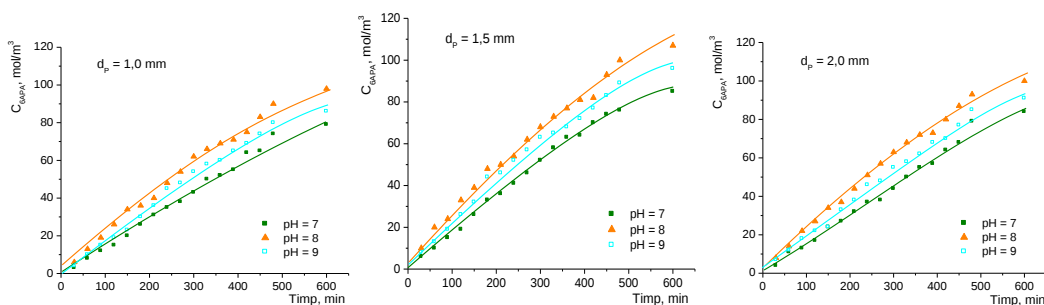


Figura IV.2. Influența valorii pH-ului și a mărimii biocatalizatorilor asupra vitezei de formare a acidului 6-aminopenicilanic ($C_{PG} = 200 \text{ mol/m}^3$, $t = 30^\circ\text{C}$)

Acest rezultat este susținut și de reprezentarea grafică din figura IV.3, prin intermediul corelației dintre randamentul hidrolizei enzimatic și valoarea pH-ului. Mai mult decât atât, rezultatele grafice prezentate în figura IV.3 sugerează faptul că, în ceea ce privește randamentul transformării enzimatic, efectul negativ al creșterii pH-ului peste 8 este mai atenuat decât cel asociat descreșterii pH-ului sub valoarea optimă.

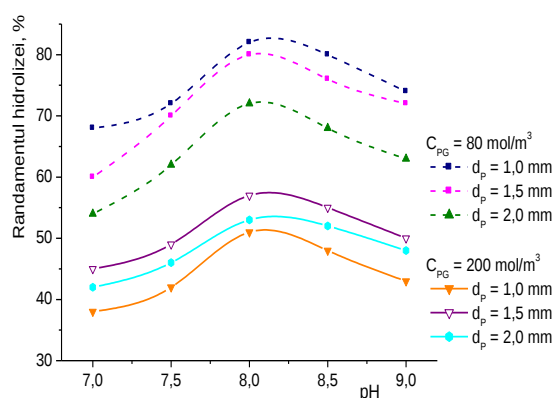


Figura IV.3. Influența valorii pH-ului și a mărimii biocatalizatorilor asupra randamentului hidrolizei, pentru o durată de 5h a procesului enzimatic ($t = 30^\circ\text{C}$)

Efectele cumulate ale concentrației penicilinei G și ale dimensiunii biocatalizatorilor imobilizați asupra productivității hidrolizei sunt redată în figura IV.7 și pot fi cuantificate prin următorul model matematic, stabilit pe baza datelor experimentale:

$$P = 1,17 \cdot \frac{C_{PG}^{0,37}}{d_p^{3,21 \cdot 10^{-3}}}, \text{ mol/m}^3\text{h} \quad (\text{IV.1})$$

unde P reprezintă productivitatea procesului, C_{PG} reprezintă concentrația antibioticului [mol/m^3], iar d_p este diametrul particulelor de biocatalizatori [m].

Cu ajutorul corelației matematice propuse IV.1, valorile calculate ale productivității hidrolizei enzimatică a penicilinei G la acid 6-aminopenicilanic sunt în concordanță cu cele experimentale, abaterea maximă fiind de +9,15% și cea medie de $\pm 4,53\%$ (Figura IV.8).

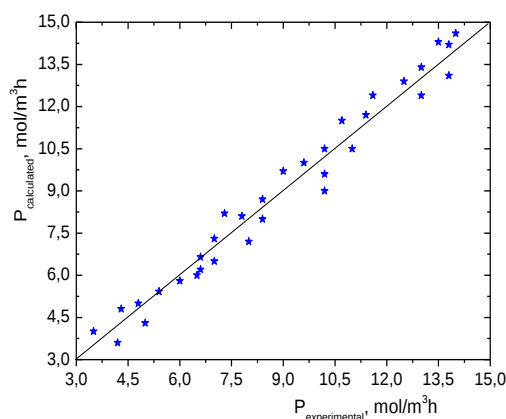


Figura IV.8. Comparație între valorile calculate și cele experimentale ale productivității ($\text{pH} = 8$, $t = 30^\circ\text{C}$)

IV.2. STUDIUL TRANSFERULUI DE MASĂ AL PENICILINEI G

În figura IV.9 este reprezentată influența diametrului particulei de biocatalizator asupra coeficientului de transfer de masă al penicilinei G în filmul de lichid de la suprafața particulei. Din reprezentarea schematică se poate observa descreșterea valorii k_L pe măsura creșterii diametrului particulei de biocatalizator, ca urmare a creșterii grosimii stratului limită.

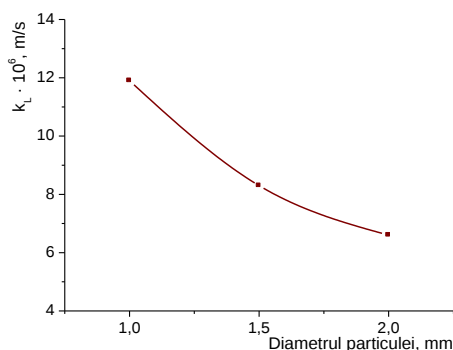


Figura IV.9. Influența dimensiunii particulei de biocatalizator asupra k_L

Prin combinarea legii lui Fick cu ecuația IV.5 pentru C_{SP} , a fost obținută următoarea expresie pentru caracterizarea procesului de conversie enzimatică a penicilinei G la acid 6-aminopenicilanic în condițiile celor trei efecte de inhibiție manifestate (competitivă și necompetitivă):

$$n_p = \frac{Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_p] + 18 \cdot D_{Se} - (C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_p^3 \cdot K_{IF} \cdot C_{SL}^2}{B_i \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh\left(\frac{D_{Se}}{R_p \cdot K_{IP} \cdot K_{IF} \cdot C_{SL}^2}\right) \cdot e^{\frac{18 \cdot D_{Se} \cdot (2 \cdot R_p - r)}{R_p^2 \cdot K_{IP} \cdot K_{IF} \cdot C_{SL}^2}}}$$

$$- \frac{\frac{D_{Se} \cdot (K_{IF} - K_{IP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{IP} \cdot K_{IF} \cdot C_{SL}^2}}{\frac{36 \cdot D_{Se}^2}{R_p^4 \cdot K_{IP}^2 \cdot K_{IF}^2 \cdot C_{SL}^4}} \cdot \left\{ 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_p] \right\} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se} \cdot r}{R_p^2 \cdot K_{IP} \cdot K_{IF} \cdot C_{SL}^2}}$$
(IV.12)

În aceste circumstanțe, în funcție de concentrația superficială a penicilinei G, concentrația acesteia în centrul particulei ar putea atinge o valoare foarte mică, comparativ cu cea din faza lichidă, cu efecte negative asupra evoluției normale a procesului de hidroliză. Datorită creșterii magnitudinii rezistenței la difuzie pentru particulele mai mari, concentrația penicilinei G din centrul particulei cu diametrul de 1 mm este de circa 1,4 ori mai mare decât cea asociată particulelor cu diametru intermediar și de circa 1,9 ori mai mare decât cea corespunzătoare particulelor cu diametrul de 2 mm.

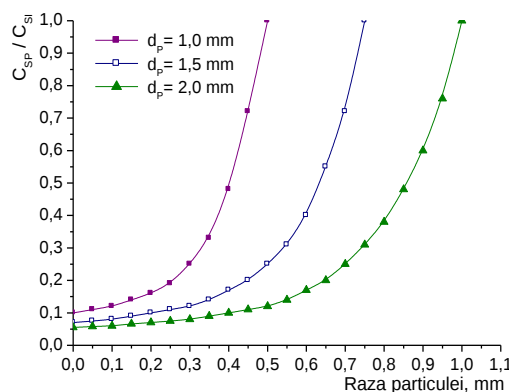


Figura IV.12. Variația raportului C_{sp}/C_{si} pe direcție radială

Valorile fluxului masic intern al penicilinei G au fost calculate cu ajutorul ecuației IV.12, iar dependența dintre aceste valori și dimensiunea particulelor de biocatalizatori este reprezentată grafic în figura IV.13.

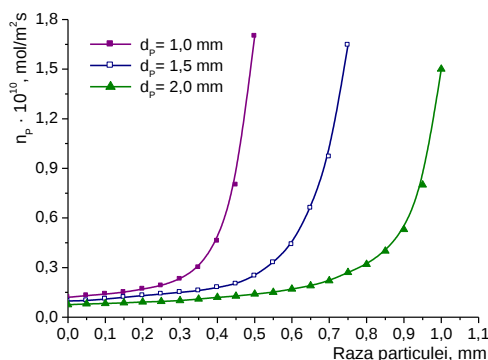


Figura IV.13. Variația fluxurilor masice interne ale penicilinei G cu distanța de la centrul particulei

În scopul cuantificării cu precizie a influenței difuziei interne asupra vitezei de conversie a penicilinei G în timpul procesului enzimatic poate fi utilizat factorul de eficacitate λ , definit ca raportul dintre viteza procesului enzimatic în sistemul eterogen și

viteza sa în sistemul omogen [79]. Prin combinarea ecuațiilor IV.5 și IV.13, se obține următoarea relație de calcul a factorului λ :

$$\lambda = \frac{D_{Se}}{R_p \cdot V \cdot C_{SP}} \cdot \left\{ \begin{aligned} & \left[\frac{(C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_p^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2 - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_p] - 18 \cdot D_{Se}}{18 \cdot D_{Se}} \right. \\ & \quad \left. B_i \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh \left(\frac{D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \right) \cdot e^{\frac{18 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right. \\ & \quad \left. + \frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \cdot \left\{ 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_p] \right\} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right. \\ & \quad \left. \left[K_M \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iF}} \right) \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} \right) + C_{SL} \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} + \frac{C_{SL}}{K_{iS}} \right) \right] \right] \end{aligned} \right. \quad (IV.14)$$

Variația factorului λ cu raza particulei este redată grafic în figura IV.16. Cu excepția celor mai mici particule, analiza acestor dependențe indică o variație lentă a factorului λ în apropierea centrului sau a suprafeței particulei. Pentru toate dimensiunile considerate ale biocatalizatorilor, în regiunea adiacentă suprafeței acestora, creșterea concentrației penicilinei G la valori cât mai apropiate de valoarea concentrației superficiale conduce la valori apropiate de 1 ale factorului λ .

În cazul biocatalizatorilor cu diametrul de 1,5 și 2 mm, variația lentă a factorului λ în regiunea centrală este datorată nivelului constant redus al concentrațiilor penicilinei G în vecinătatea centrului particulei (figura IV.16). Astfel, în corelație directă cu variația concentrației substratului din interiorul particulei, grosimea regiunii intermediare corespunzătoare reducerii semnificative a factorului λ de la valoarea superficială la cea centrală se mărește pe măsura creșterii dimensiunii particulelor.

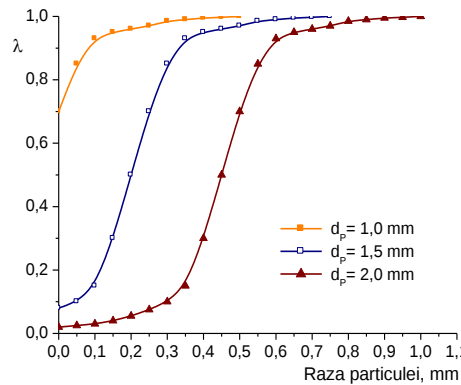


Figura IV.16. Variația factorului de eficacitate λ pe direcție radială

Aceste rezultate sugerează o reducere de $1/\lambda$ a vitezei de obținere pe cale enzimatică a A6AP prin dispunerea în strat mobil a *penicilinamidazei* imobilizate, comparativ cu valoarea sa obținută în cazul enzimelor libere. Magnitudinea acestui efect trebuie corelată cu dimensiunea particulelor de biocatalizatori. Astfel, valoarea raportului $1/\lambda$ asociată centrului particulelor crește de 1,4 ori pentru cele mai mici particule, de 12 ori pentru particulele intermediare, respectiv de 34 ori în cazul celor mai mari particule, comparativ cu valorile superficiale. Astfel se reconfirmă influența minimă a difuziei interne a penicilinei G asupra performanței globale a procesului enzimatic în cazul celor mai mici particule.

V. BIOREACTOARE CU STRAT TIP „BASKET” DE BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

V.1. OBȚINEREA ACIDULUI 6-AMINOPENICILANIC PRIN SCINDAREA ENZIMATICĂ A PENICILINEI G

Acest studiu abordează o analiză comparativă a transferului masic intern și extern al penicilinei G în procesul de hidroliză enzimatică la acid 6-aminopenicilanic, în condiții de inhibiție competitivă și necompetitivă, într-un bioreactor cu strat fix, de tip „basket”, cu *penicilinamidază* imobilizată în Eupergit C. Vitezele transferului de masă al penicilinei G și ale reacției enzimatică au fost analizate prin intermediul valorilor rapoartelor dintre coeficienții de transfer de masă ai substratului, fluxurilor masice externe, concentrațiilor penicilinei G de la suprafața particulelor de biocatalizatori și a factorilor de eficacitate [100].

În cazul ambelor configurații analizate ale bioreactoarelor, variația fluxurilor masice externe prin filmul limită de lichid de la suprafața particulei este contrară variației coeficienților de transfer de masă, datorită mai ales amplificării gradientului de concentrație al substratului dintre faza lichidă și suprafața particulei pe măsura creșterii dimensiunii biocatalizatorilor imobilizați [90, 86].

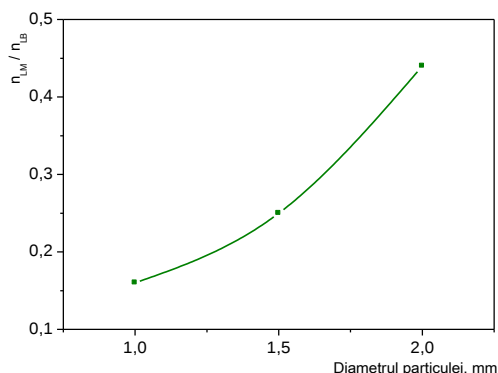


Figura V.3. Variația raportului dintre fluxurile masice externe pentru straturile mobil și „basket” cu diametrul particulei de biocatalizator

Acest rezultat indică efectul pozitiv al dispunerii în strat fix a particulelor de *penicilinamidază* imobilizată asupra fluxului masic extern al penicilinei G. În acest caz, creșterea grosimii stratului de tip „basket” determină creșterea vitezei de hidroliză a substratului, care favorizează amplificarea gradientului de concentrație al penicilinei G, și, implicit, intensificarea fluxului masic extern.

Conform figurii V.4, extinderea regiunii inactive crește odată cu dimensiunea particulei de biocatalizator. Astfel, o pondere mai redusă a acesteia a fost înregistrată în cazul bioreactorului cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată, proporția sa fiind mai mică de 9,8% din volumul total al fiecărei particule de biocatalizator. În cazul bioreactorului cu strat de tip „basket”, extinderea regiunii inactive variază între 4,4 și 17,4%, datorită valorilor mai reduse ale fluxurilor masice ale penicilinei G din particula de biocatalizator.

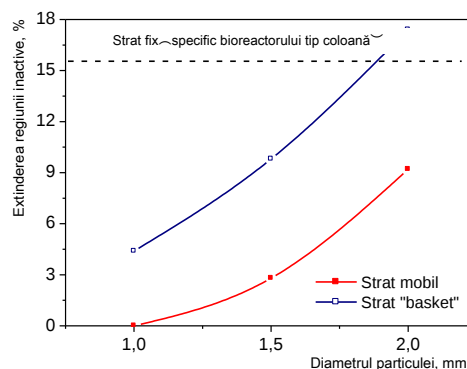


Figura V.4. Extinderea regiunii inactive a biocatalizatorilor în funcție de raza acestora

În cazul ambelor tipuri de bioreactoare considerate, factorul λ variază lent în vecinătatea centrului sau a suprafeței particulei. În regiunea adiacentă suprafeței biocatalizatorului, creșterea concentrației antibioticului până la o valoare apropiată de cea de la suprafața particulei determină valori apropiate de 1 ale factorului de eficacitate λ . Variația lentă a factorului de eficacitate λ în regiunea centrală apare ca rezultat al concentrației constant reduse a penicilinei G în apropierea centrului particulei [90, 87].

Efectul difuziei interne asupra vitezei de hidroliză enzimatică este mai pronunțat în cazul bioreactorului de tip „basket”. Prin urmare, variația raportului factorilor de eficacitate λ_M / λ_B cu raza particulei de biocatalizator, ilustrată în figura V.6, sugerează că descreșterea vitezei de conversie a penicilinei G este mai pronunțată în cazul sistemului cu strat fix de tip „basket” comparativ cu sistemul conținând *penicilinamidază* liberă, ca urmare a concentrației reduse a substratului în interiorul particulei de biocatalizator.

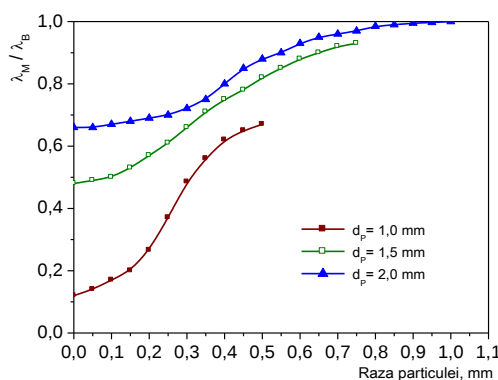


Figura V.6. Variația raportului dintre factorii de eficacitate pentru straturile mobil și „basket” cu diametrul particulei de biocatalizator

Disponerea *penicilinamidazei* imobilizate sub forma configurațiilor considerate determină diminuarea considerabilă a vitezei de producere pe cale enzimatică a acidului 6-aminopenicilanic comparativ cu utilizarea sistemului cu enzimele libere, această reducere fiind de până la 1,5–8,3 ori mai mare în cazul bioreactorului de tip „basket” [100].

V.2. BIOSINTEZA ACIDULUI SUCCINIC CU CELULE DE *Actinobacillus succinogenes* IMOBILIZATE

Acest studiu prezintă analiza comparativă a influenței configurației stratului de biocatalizatori asupra performanței fermentației acidului succinic cu celule imobilizate de *A. Succinogenes*. Studiul vizează cuantificarea influenței difuziei interne și externe a substratului asupra vitezelor de transfer și conversie enzimatică a glucozei, în condiții de inhibiție de substrat și de produs, în două tipuri diferite de bioreactoare, cu straturi de tip mobil și „basket” de biocatalizatori imobilizați.

În scopul cuantificării influenței configurației stratului de biocatalizatori și a fenomenelor de difuzie asociate asupra transferului de masă al glucozei în stratul limită de lichid de la suprafața particulei, în figura V.7 a fost reprezentată variația raportului dintre coeficienții de transfer de masă ai substratului k_{LM}/k_{LB} cu raza particulei imobilizate. Indiferent de configurația stratului de biocatalizatori, rezultatele au indicat diminuarea k_L pe măsura creșterii dimensiunii particulelor, ca rezultat al creșterii grosimii stratului limită de la suprafața acestora [5, 79]. Pe de altă parte, raportul k_{LM}/k_{LB} crește pe măsura creșterii dimensiunii particulelor de biocatalizatori, datorită turbulenței mai intense din bioreactorul cu strat mobil de celule imobilizate. Variația raportului dintre coeficienții de transfer de masă ai glucozei (k_{LM}/k_{LB}) trebuie corelată cu poziția în stratul fix de tip “basket”. Astfel, în cazul biocatalizatorilor cu dimensiunea minimă, valorile acestui raport sunt subunitare, indiferent de poziția din interiorul stratului cilindric.

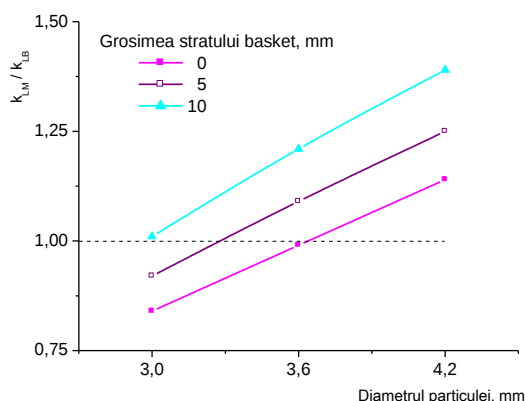


Figura V.7. Variația raportului dintre coeficienții de transfer de masă ai glucozei pentru straturile mobil și „basket” în funcție de diametrul particulei de biocatalizator

Valorile rapoartelor k_{LM} / k_{LB} rămân subunitare și în cazul particulelor cu dimensiune intermediară, însă doar la suprafața interioară a „basket”-ului, fiind mai mari decât 1 în celelalte cazuri studiate. Aceste variații reprezintă consecința influențelor cumulate ale grosimii filmului de lichid de la suprafața particulei și a vitezei fazei lichide asupra vitezei de difuzie a substratului către centrul particulei.

Pe baza rezultatelor obținute, în figura V.9 este prezentată influența diametrului particulei de biocatalizator asupra raportului dintre fluxurile masice externe ale glucozei corespunzătoare bioreactorului cu strat mobil (n_{LM}) și celui de tip „basket” (n_{LB}), la diferite poziții din interiorul stratului de biocatalizatori.

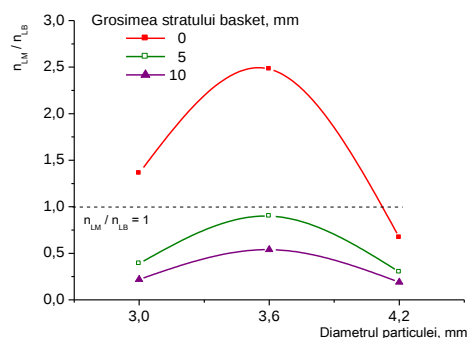


Figura V.9. Variația raportului fluxurilor masice externe ale glucozei pentru straturile mobil și „basket” cu diametrul particulei de biocatalizator

Pe baza celor observate, figura V.11 sugerează evoluții similare ale rapoartelor concentrațiilor interne ale substratului și a fluxurilor masice interne corespunzătoare (η_{PM}/η_{PB}). Astfel, raportul fluxurilor masice interne (η_{PM}/η_{PB}) crește de la valoarea 1,02 obținută la suprafața biocatalizatorului, la valori cuprinse între 2,2–3,8 asociate centrului biocatalitic. Conform celor discutate anterior, reducerea fluxului masic intern al substratului către centrul biocatalizatorilor imobilizați este mai pronunțată în cazul configurației fixe, de tip „basket”, a stratului de biocatalizatori.

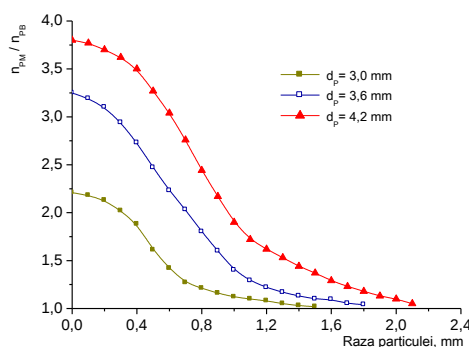


Figura V.11. Variația raportului fluxurilor masice interne ale glucozei pentru straturile mobil și „basket” cu raza particulei de biocatalizator

În același timp, valorile raportului dintre proporțiile regiunilor inactive corespunzătoare configurațiilor „basket” și fix tip coloană (*packed bed*) (E_B / E_P) de celule imobilizate sunt subunitare, indiferent de localizarea în interiorul „basket”-ului (raportul a fost calculat pentru particulele de biocatalizatori cu diametrul de 3 mm (figura V.12) [99]). Prin urmare, analiza comparativă a bioreactoarelor cu strat mobil, tip „basket” sau fix tip coloană (*packed bed*) subliniază eficiența superioară a primelor două tipuri de bioreactoare [113].

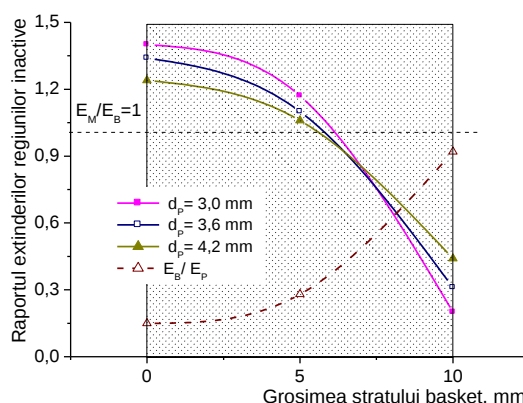


Figura V.12. Variația raportului dintre extinderea regiunilor inactive cu raza biocatalizatorului

VI. BIOREACTOARE GAZ-LIFT CU BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

VI.1. STUDIUL EFICIENȚEI ȘI DISTRIBUȚIEI AMESTECĂRII

În acest capitol a fost analizată eficiența amestecării și distribuția acesteia într-un bioreactor gaz-lift cu circulație interioară, pentru diferite medii, simulate și reale, cu microorganisme libere sau imobilizate.. Astfel, s-a urmărit stabilirea distribuției eficienței amestecării într-un bioreactor gaz-lift cu amestecare interioară, prin intermediul valorilor timpilor de amestecare înregistrate la diferite poziții ale electrodului de pH, precum și al influențelor caracteristicilor mediului și al parametrilor de operare ai bioreactorului asupra alternanței localizării regiunilor active și stagnante.

VI.1.1. Lichide de fermentație simulate

Experimentele au fost realizate cu apă și medii de cultură simulate de vâscozitate ridicată, respectiv soluții de carboximetilceluloză sodică cu vâscozitatea aparentă cuprinsă între 5 și 26 cP.

Regiunea ascendentă este asociată celei mai mari viteze de circulație a fazei lichide și celei mai intense amestecări, ceea ce permite atingerea unor viteze ridicate ale transferurilor de masă și de căldură, însă și generarea celor mai intense forțe de forfecare. După cum se poate observa din figura VI.1, creșterea debitului de aer barbotat determină reducerea timpului de amestecare, indiferent de vâscozitatea mediului și poziția în regiunea ascendentă. În general, efectul pozitiv asupra intensității amestecării este mai pronunțat pentru viteze superficiale ale aerului barbotat cuprinse între $1,05\text{--}1,95 \cdot 10^{-3}$ m/s. În afara domeniului menționat, creșterea vâscozității aparente a mediului determină diminuarea influenței pozitive a vitezei de aeriație asupra intensității amestecării.

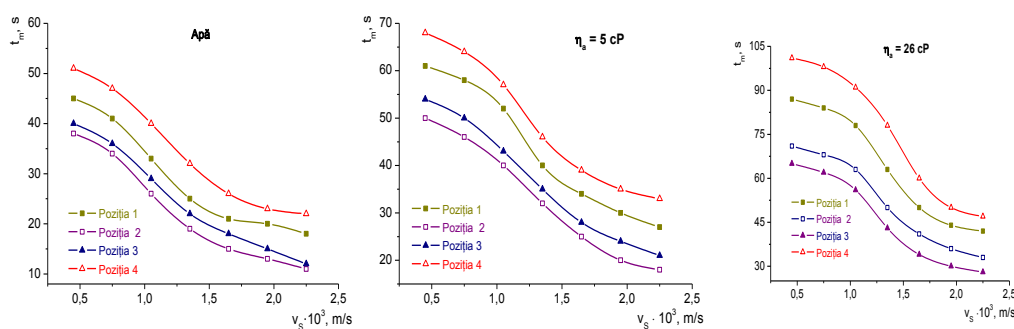


Figura VI.1. Influența vitezei superficiale a aerului asupra timpului de amestecare, pentru apă și lichide de fermentație simulate, la diferite poziții ale senzorului de pH în regiunea ascendentă

Hidrodinamica mediului este mai complexă în regiunea descendentă, fiind controlată de numărul și comportarea bulelor din fluxul de fluid corespunzător acestei regiuni. Viteza de circulație a fluidului din regiunea ascendentă este superioară celei corespunzătoare regiunii descendente, indiferent de poziția electrodului de pH (figura VI.4). În plus, contrar variațiilor redată în figura VI.1, creșterea vitezei superficiale a aerului barbotat determină descreșterea până la o valoare minimă a timpului de amestecare corespunzător regiunii descendente, urmată de creșterea acestuia. Bulele descendente ar putea atinge baza bioreactorului, fiind recirculate în fluxul ascendent, ceea ce contribuie la amplificarea turbulenței din această regiune. Acest efect a fost observat pentru poziția 1 a regiunii descendente pentru mediile de cultură simulate cu viscozitatea aparentă de până la 12 cP (figura VI.4).

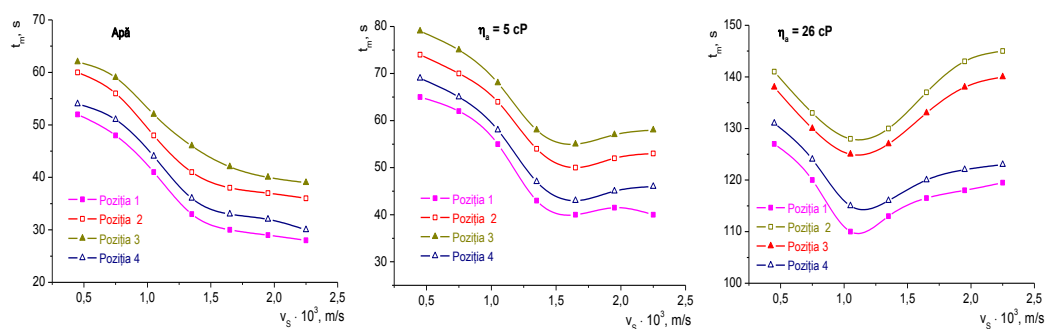


Figura VI.4. Influența vitezei superficiale a aerului asupra timpului de amestecare, pentru apă și lichide de fermentație simulate, la diferite poziții ale senzorului de pH în regiunea descendentă

Datorită dificultății asigurării unei circulații uniforme a mediilor viscoase în regiunea descendentă, efectul cumulat al acumulării bulelor și al creșterii viscozității aparente în domeniul considerat reduce turbulența creată în regiunile 2 și 3 (figura VI.6).

Prin intermediul datelor experimentale obținute pentru lichide de fermentație simulate, au fost propuse corelații matematice care descriu influențele cumulate ale factorilor analizați asupra timpului de amestecare. Astfel au fost stabilite relații pentru cele două regiuni ale bioreactorului, iar modelele propuse sunt în concordanță cu rezultatele experimentale, oferind o abatere medie de $\pm 6,6\%$ pentru regiunea ascendentă și, respectiv, de $\pm 3,3\%$ pentru cea descendentă [133].

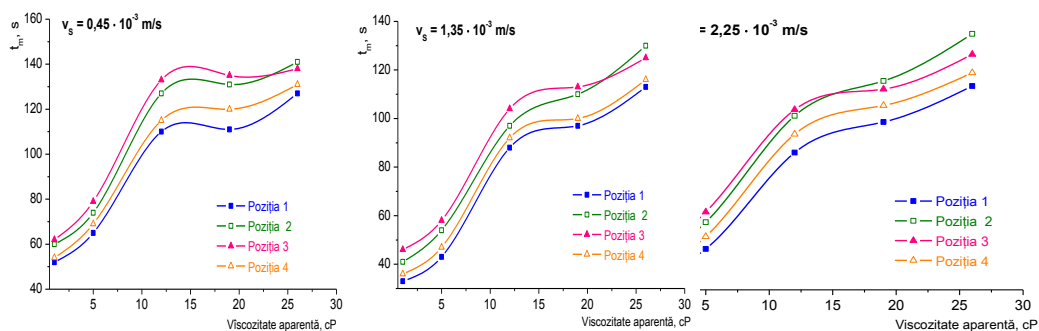


Figura VI.6. Influența viscozității aparente asupra timpului de amestecare pentru diferite viteze superficiale ale aerului barbotat și poziții ale senzorului de pH în regiunea descendentă, pentru apă și lichide de fermentație simulate

VI.1.2. Suspensii de celule libere *Yarrowia lipolytica*

Studiile privind intensitatea și distribuția amestecării într-un bioreactor gaz-lift cu circulație interioară au fost realizate și cu lichide de fermentație reale, reprezentate de suspensii de drojdii *Yarrowia lipolytica*, cu o concentrație a biomasei cuprinsă între 10 și 50 g/l s.u., corespunzătoare unor viscozități aparente de 2,7 - 9,5 cP [134].

Spre deosebire de variația timpului de amestecare pentru medii simulate, figura VI.7 indică o intensificare permanentă a amestecării pe măsura creșterii vitezei de aerație numai pentru pozițiile 2, 3, și 4 ale amplasării electrodului de pH.

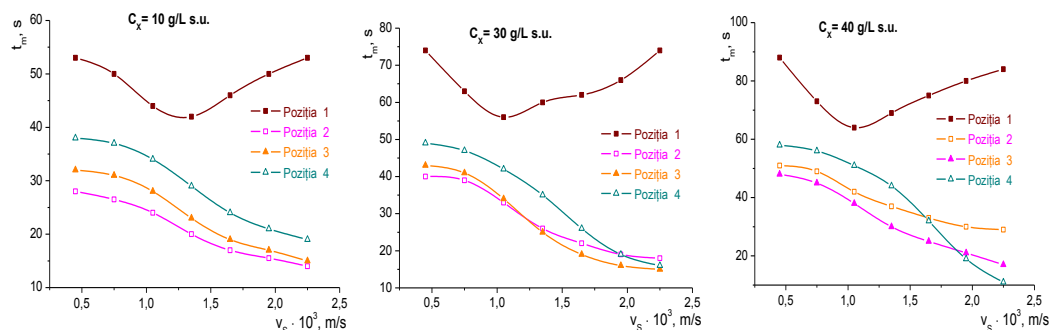


Figura VI.7. Influența vitezei superficiale a aerului asupra timpului de amestecare pentru suspensii de celule de *Y. lipolytica*, la diferite poziții ale senzorului de pH în regiunea ascendentă

Variația particulară a intensității amestecării în regiunea 1 reprezintă rezultatul a două fenomene contrare induse de acumularea biomasei. Pe de o parte, datorită tendinței de depunere a acestora la partea inferioară, interacțiunile de tip frecare dintre celule sunt mai intense comparativ cu cele existente în pozițiile superioare, iar aceasta conduce la diminuarea vitezei circulației ascendente a suspensiei. De asemenea, tendința de plutire a bulelor din fluxul descendent contribuie suplimentar la reducerea vitezei de circulație a suspensiei în această regiune [132, 133].

Variația timpului de amestecare de-a lungul înălțimii regiunii ascendente pentru suspensiile de *Y. lipolytica* este diferită de cea obținută în cazul mediilor simulate în absența biomasei [133]. Conform celor observate anterior, vitezele de circulație ale mediului în regiunile superioară de degazare și cea inferioară, respectiv în pozițiile 1 și 4, sunt influențate în principal de concentrația celulelor din aceste regiuni, și mai puțin de suprafața secțiunii de curgere, precum în cazul mediilor simulate [123, 21, 133].

Aceste fenomene sunt ilustrate prin dependența dintre timpul de amestecare și concentrația celulelor, evidențiată în figura VI.9.

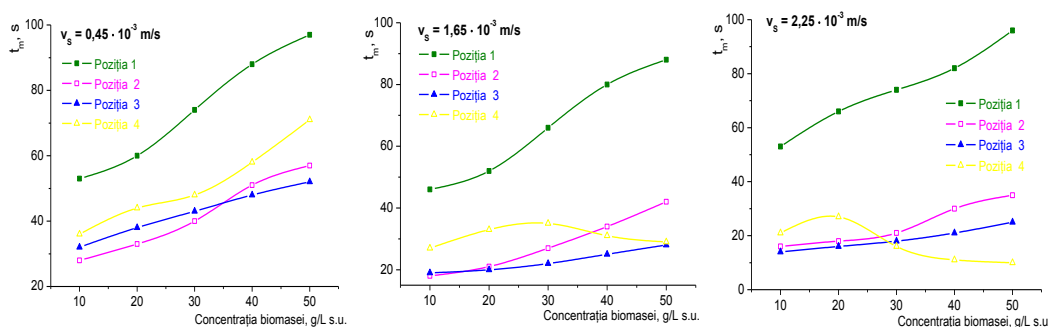


Figura VI.9. Influența concentrației celulelor de *Y. lipolytica* asupra timpului de amestecare pentru diferite viteze superficiale ale aerului și poziții ale senzorului de pH în regiunea ascendentă

Hidrodinamica mediului din regiunea descendentă este mai complexă și este dependentă de numărul și comportarea bulelor incluse în fluxul de fluid. Pentru toate pozițiile considerate, variațiile din figura VI.10 sugerează valori inferioare ale vitezelor de circulație ale suspensiei de celule comparativ cu cele înregistrate pentru regiunea ascendentă. Mai mult, contrar variațiilor ilustrate în figura VI.7 pentru pozițiile 2-4, creșterea vitezei de aerație determină scăderea până la o valoare minimă a valorilor timpului de amestecare, urmată de creșterea acestora.

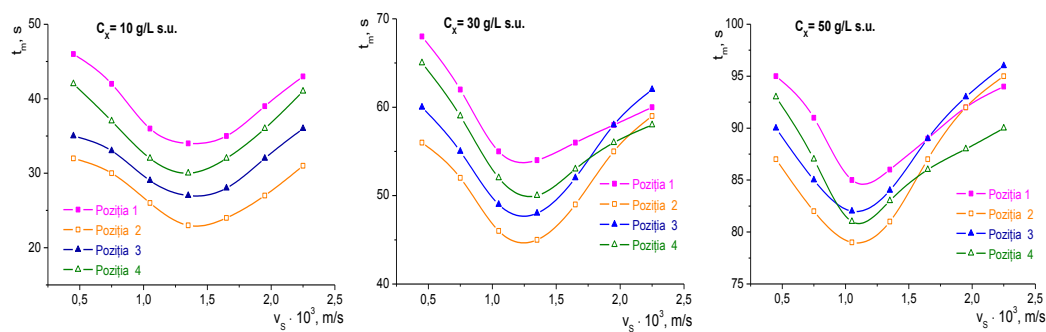


Figura VI.10. Influența vitezei superficiale a aerului asupra timpului de amestecare pentru suspensii de celule de *Y. lipolytica* și diferite poziții ale senzorului de pH în regiunea descendentă

Acumularea bulelor în regiunea descendentă și creșterea concentrației biomasei în domeniul experimental determină reducerea turbulenței pe toată lungimea regiunii descendente (figura VI.12). După cum a fost menționat anterior, efectul negativ al înglobării bulelor în fluxul descendent este mai pronunțat în cazul pozițiilor extreme la concentrații ale

biomasei de până la 30 g/l s.u. și devine semnificativ pentru pozițiile intermediare la concentrații mai mari ale suspensiei de drojdii.

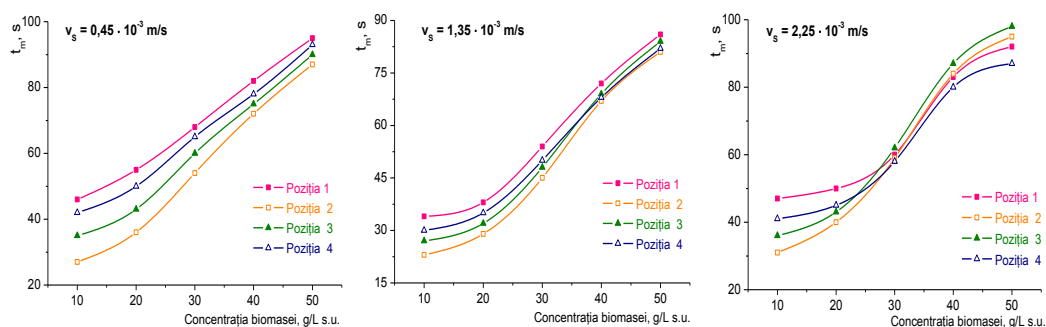


Figura VI.12. Influența concentrației celulelor de *Y. lipolytica* asupra timpului de amestecare pentru diferite viteze superficiale ale aerului și diferite poziții ale senzorului de pH în regiunea descendentă

În mod similar experimentelor realizate cu lichide de fermentație simulate, au fost propuse corelații matematice care redau influențele cumulate ale concentrației biomasei, a vitezei superficiale a aerului barbotat, precum și a poziției pe înălțimea bioreactorului asupra timpului de amestecare, pentru fiecare dintre regiunile studiate (ecuația VI.4). Modelele propuse sunt în concordanță cu rezultatele experimentale, oferind o abatere medie de $\pm 5,1\%$ pentru regiunea ascendentă și de $\pm 5,6\%$ pentru cea descendentă [134].

$$t_m = \alpha \cdot C_x^\beta \cdot v_s^\gamma \cdot h^\delta \quad (\text{VI.4})$$

VI.2. DEGRADAREA LIPIDELOR CU CELULE DE *Bacillus sp.* IMOBILIZATE

Scopul acestui studiu constă în analiza performanțelor proceselor de epurare biologică aerobă și anaerobă a apelor reziduale din industria uleiului de măsline, folosind un amestec microbial de *Bacillus sp.* Prin intermediul rezultatelor experimentale, a fost propus un model cinetic mai complex pentru bioconversia bacteriană aerobă a lipidelor, acesta fiind comparat cu cel existent în literatură.

VI.2.1. Cinetica degradării aerobe a lipidelor cu celule de *Bacillus sp.*

Variația concentrației lipidelor totale din apele reziduale în timpul procesului aerob și anaerob de biodegradare cu celule libere de *Bacillus sp.* este prezentată în figura VI.13. Conform figurii VI.3, concentrația lipidelor este diminuată mai rapid în cazul procesului aerob, viteza de consum a lipidelor fiind amplificată pe măsura creșterii concentrației oxigenului dizolvat în mediu. Prin urmare, pentru procesul anaerob de biodegradare, concentrația lipidelor totale este redusă la 1,3 g/l după 60 h, pe când în cazul procesului

aerob, aceasta poate ajunge la valoarea de 0 g/l după 40 h, în funcție de concentrația oxigenului.

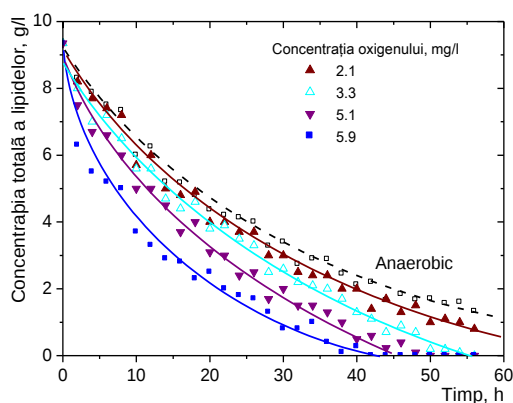


Figura VI.13. Variația concentrației lipidelor totale în timpul biodegradării bacteriene aerobe și anaerobe

Viteza medie de biodegradare a lipidelor este definită de următoarea relație:

$$\bar{r}_d = \frac{C_{TL0} - C_{TL}}{t} \quad (VI.8)$$

În cazul consumului aerob al lipidelor, modelul propus de Pavlostathis și Giraldo-Gomez a fost adaptat prin includerea unei viteze specifice modificate, k_d' , care redă influența concentrației oxigenului:

$$-\frac{dC_{TL}}{dt} = k_d' \cdot C_{TL} \quad (VI.11)$$

Întrucât concentrația oxigenului în mediu este controlată și menținută la un nivel constant în timpul procesului aerob de biodegradare, valoarea k_d' ar putea fi calculată la diferite concentrații ale oxigenului conform algoritmului prezentat anterior, prin reprezentarea grafică a dreptelor corespunzătoare (figura VI.15). Valorile vitezei specifice și ale celei modificate la diferite concentrații ale oxigenului în mediu sunt redată în tabelul VI.1 [171]

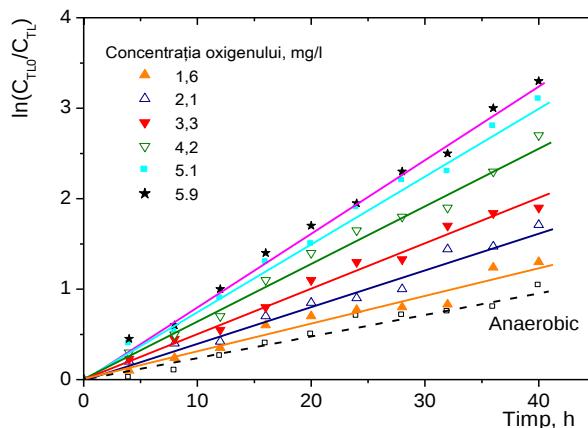


Figura VI.15. Calculul grafic al vitezei specifice de biodegradare (pentru procesul anaerob) și al vitezei aparente specifice de biodegradare (pentru procesul aerob)[171]

În aceste condiții, degradarea aerobă a lipidelor din uleiul de măsline cu *Bacillus* sp. poate fi descrisă de următorul model cinetic:

$$\frac{-dC_{TL}}{dt} = k_d \cdot C_{O_2}^{0,62} \cdot C_{TL} \quad (VI.14)$$

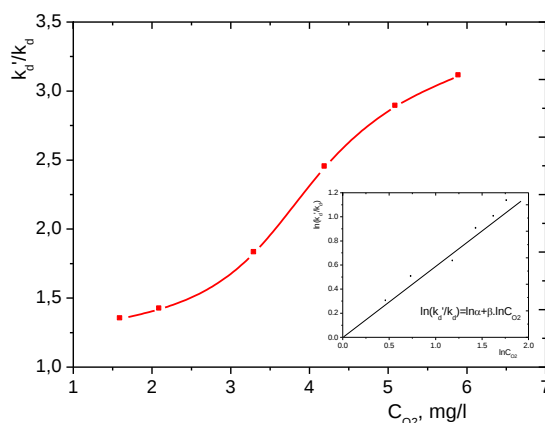


Figura VI.16. Influența concentrației oxigenului asupra raportului k_d'/k_d

Comparația dintre valorile experimentale ale vitezei de biodegradare a lipidelor și cele calculate conform modelului propus de Pavlostathis și Giraldo-Gomez sau ecuației VI.14 este reprezentată în figura VI.17. Figura VI.17 sugerează faptul că modelul propus de Pavlostathis și Giraldo-Gomez este adecvat sistemului anaerob, caracterizat de o viteză lentă a procesului de biodegradare. Pentru biodegradarea aerobă, care se desfășoară cu viteze superioare, utilizarea acestui model cinetic implică abateri semnificative de la valorile experimentale, valorile calculate fiind cu mult mai mici comparativ cu cele reale.

Modelul cinetic care ține cont și de influența concentrației oxigenului dizolvat descrie într-un mod adecvat biodegradarea aerobă a lipidelor. Astfel, din figura VI.17 poate fi observată corelația strânsă între valorile experimentale ale vitezei procesului aerob și cele calculate prin intermediul ecuației VI.14, abaterea medie fiind de $\pm 6.84\%$ [171].

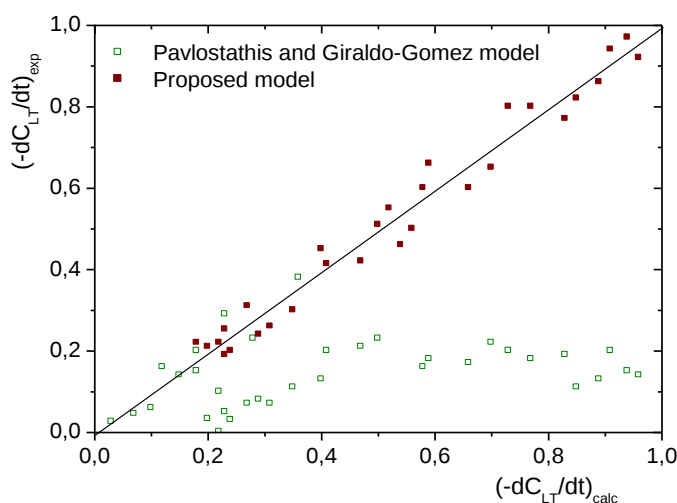


Figura VI.17. Comparație între valorile experimentale și cele calculate ale vitezei de biodegradare a lipidelor cu *Bacillus* sp.

VII. CONCLUZII GENERALE

Studiile experimentale realizate în cadrul tezei de doctorat au vizat caracterizarea performanțelor bioreactoarelor cu biocatalizatori imobilizați (dispuși comparativ sub forma configurațiilor fixă și mobilă), prin stabilirea parametrilor optimi de operare, caracterizarea eficienței și distribuției intensității amestecării, cuantificarea influenței difuziei interne asupra eficienței proceselor de transfer de masă.

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat pot fi sintetizate conform următoarelor concluzii generale:

1. Partea introductivă identifică principalele studii de literatură referitoare la performanțele bioreactoarelor cu biocatalizatori imobilizați, respectiv: rezultatele comparative privind modificarea configurației stratului de biocatalizatori (mobilă și fixă, de tip “basket”), amestecarea din bioreactoarele cu agitare mecanică și pneumatică, eficiența proceselor de transfer de masă etc.

2. Studiile experimentale au fost realizate în echipamente adecvate ce au permis obținerea de rezultate precise, modelate ulterior prin intermediul unor programe specifice, în scopul stabilirii influenței parametrilor considerați asupra performanțelor proceselor analizate. În acest sens, au fost utilizate 3 bioreactoare cu amestecare mecanică (Biostat cu volumul util de 4l, Electrolab cu volume utile de 1 și 8l) și un bioreactor cu amestecare pneumatică (Electrolab cu volumul util de 5l), echipate cu sisteme computerizate de monitorizare, control și înregistrare a parametrilor de funcționare (figurile III.1, 2, 3, 4 și tabelele III.1, 2, 3, 4).

3. Amestecarea mediilor din bioreactoare a fost realizată cu ajutorul șicanelor și agitatoarelor (individuale sau multiple) sau prin intermediul barbotării aerului printr-un tub perforat, la debite ce asigură evitarea antrenării mediului din bioreactor sau depunerea biomasei la partea inferioară a acestuia. Concentrațiile inițiale și finale ale componentelor analizați au fost determinate pe baza tehnologiei HPLC, iar în calcule a fost utilizată valoarea medie a rezultatelor obținute (prin repetarea de 2 ori a experimentelor realizate). Caracterizarea eficienței și a distribuției intensității amestecării a fost evaluată prin intermediul valorilor timpilor de amestecare (necesari atingerii unui nivel predefinit acceptat de omogenitate), determinate prin metoda trasorilor.

4. Analiza influenței parametrilor de mediu asupra performanței hidrolizei enzimatice a penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic într-un bioreactor cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată (cu diametre de 1, 1,5 și 2 mm) confirmă eficiența maximă a procesului la valorile de 8 a pH-ului și de 30°C a temperaturii de operare, precum în cazul hidrolizei omogene cu enzime libere. De asemenea, utilizarea granulelor cu diametru intermediar favorizează performanța maximă a hidrolizei enzimatice, prin evitarea efectelor negative (inhibiția de substrat și creșterea rezistenței la difuzia internă) asociate biocatalizatorilor cu diametre extreme (1 și 2 mm). Efectele cumulate ale concentrației penicilinei G și a dimensiunii biocatalizatorilor asupra performanței procesului au fost incluse într-un model matematic valabil în condițiile optime de operare, pentru concentrații

ale substratului cuprinse între 80 și 300 moli/m³:

$$P = 1,17 \cdot \frac{C_{PG}^{0.37}}{d_p^{3,21 \cdot 10^{-3}}}, \text{ moli/m}^3\text{h} \quad (\text{IV.1})$$

5. Studiul transferului de masă al penicilinei G în procesul de scindare enzimatică la acidul 6-aminopenicilanic a fost realizat pe baza rezultatelor anterioare referitoare la condițiile optime de operare, iar descrierea profilelor concentrațiilor interne și superficiale ale antibioticului a fost realizată pe baza bilanțului de masă al substratului pentru o singură particulă de biocatalizator (ecuația Bird; ecuația IV.3) și a modelului cinetic adaptat pentru inhibiția competitivă și necompetitivă (modelul Warburton; ecuația IV.2):

$$\frac{dC_S}{dt} = D_{Se} \left[\frac{1}{r^2} \cdot \frac{d}{dr} \left(r^2 \cdot \frac{dC_S}{dr} \right) \right] - \quad (\text{IV.3})$$

$$v_p = \frac{v \cdot C_S}{\left[K_M \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_S}{k_{iF}} \right) \left(1 + \frac{C_{S0} - C_S}{k_{iP}} \right) + C_S \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_S}{k_{iP}} + \frac{C_S}{k_{iS}} \right) \right]}, \text{ mol/m}^3\text{h} \quad (\text{IV.2})$$

6. Fluxurile masice interne și externe ale Penicilinei G (ecuația IV.12) au fost calculate prin intermediul concentrațiilor interne și superficiale ale antibioticului, iar rezultatele obținute confirmă performanța maximă a procesului cu diametru intermediar de imobilizare, datorată echilibrului stabilit între efectele opuse ale difuziei interne și al inhibiției de substrat. De asemenea, influența difuziei interne a fost cuantificată pe baza factorului de eficacitate λ , determinat ca raport între viteza procesului enzimatic în sistemul eterogen și viteza sa în sistemul omogen cu enzime libere (ecuația IV.14).

$$n_p = \frac{Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_p] + 18 \cdot D_{Se} - (C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_p^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}{Bi \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh \left(\frac{D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \right) \cdot e^{\frac{18 \cdot D_{Se} \cdot (2 \cdot R_p - r)}{R_p^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} - \frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \cdot \frac{36 \cdot D_{Se} \cdot r}{R_p^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} - \frac{36 \cdot D_{Se}^2 \cdot e^{\frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{R_p^4 \cdot K_{iP}^2 \cdot K_{iF}^2 \cdot C_{SL}^4} \cdot \{ 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_p] \} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se} \cdot r}{R_p^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \quad (\text{IV.12})$$

$$\lambda = \frac{D_{Se}}{R_p \cdot V \cdot C_{SP}} \cdot \left\{ \left[\frac{(C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_p^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2 - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_p] - 18 \cdot D_{Se}}{18 \cdot D_{Se}} \right. \right. \\ \left. \left. + \frac{Bi \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh\left(\frac{D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}\right) \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{\frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right] \cdot \left\{ 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_p] \right\} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right. \\ \left. + \frac{36 \cdot D_{Se}^2 \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{R_p^4 \cdot K_{iP}^2 \cdot K_{iF}^2 \cdot C_{SL}^4} \cdot \left[K_M \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iF}}\right) \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}}\right) + C_{SL} \cdot \left(1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} + \frac{C_{SL}}{K_{iS}}\right) \right] \right\} \quad (IV.14)$$

7. Imobilizarea enzimelor determină reducerea de $1/\lambda$ ori a performanței procesului comparativ cu sistemul liber de biocatalizatori, iar magnitudinea efectului de imobilizare trebuie corelată cu dimensiunea biocatalizatorilor, dar și cu localizarea pe direcție radială. Astfel, utilizarea enzimelor imobilizate cu diametrul minim de imobilizare (1 mm) oferă performanțe comparative cu ale procesului cu enzime libere, concentrația internă a penicilinei G fiind similară concentrației sale din faza lichidă de la suprafața particulei ($1/\lambda=1,4$), însă creșterea diametrului de imobilizare afectează semnificativ performanța procesului de scindare enzimatică (valorile centrale ale factorului de eficacitate λ descresc de 12 ori în cazul granulelor intermediare și de 34 ori în cazul biocatalizatorilor imobilizați cu diametrul de 2 mm). De asemenea, rezultatele indică obținerea unor valori minime ale fluxului masic central al Penicilinei G, care sunt asociate unui transfer masic nesemnificativ. Acesta corespunde unei regiuni ”inactive din punct de vedere enzimatic”, a cărei extindere crește odată cu diametrul de imobilizare, de la 0 la 9,2% din volumul total al particulei de biocatalizator.

8. Stabilirea configurației optime a stratului de biocatalizatori imobilizați pentru maximizarea performanței transferului de masă în procesul de scindare enzimatică a penicilinei G la acidul 6-aminopenicilanic a fost realizată prin compararea concentrațiilor superficiale și a coeficienților de transfer de masă ai substratului, precum și a factorilor de eficacitate asociați configurației fixe (de tip „basket”) și mobile de biocatalizatori, în condiții de inhibiție de substrat (penicilina G) și de produs (asociată formării acizilor 6-aminopenicilanic și fenilacetic). Astfel, creșterea (de la 4 la 5,5 a) raportului k_{LM}/k_{LB} pe măsura creșterii diametrului de imobilizare (de la 1 la 2 mm) este justificată prin creșterea stratului limită la dimensiuni mai mari ale biocatalizatorilor, dar și a turbidității din sistemul cu strat mobil de *penicilinamidază* imobilizată. De asemenea, creșterea dimensiunii biocatalizatorilor imobilizați determină descreșterea raportului dintre concentrațiile superficiale ale substratului (C_{SiM}/C_{SiB}), favorizând performanța superioară a configurației de tip „basket” în cazul particulelor mari, datorită celei mai mari fracții de goluri, și, implicit, celei mai mici rezistențe întâmpinate la difuzia prin stratul fix de biocatalizatori.

9. Descreșterea raportului Bi_M/Bi_B și a factorilor de eficacitate λ_M/λ_B pe măsura creșterii diametrului de imobilizare sugerează efectul mai pronunțat al difuziei interne asupra performanței procesului biochimic cu strat fix tip „basket” de biocatalizatori, ca urmare a concentrației mai reduse a substratului din interiorul stratului cilindric. Pe de altă parte, efectul configurației stratului de biocatalizatori devine neglijabil în cazul particulelor mai mari (2 mm), iar performanțele configurațiilor mobilă și fixă de tip „basket” devin

comparabile.

10. De asemenea, a fost studiată influența geometriei bioreactorului și a condițiilor de operare asupra eficienței procesului de fermentație succinică cu celule imobilizate de *A. Succinogenes*, dispuse comparativ sub forma configurațiilor mobilă și fixă de tip „basket”, sub influența proceselor de inhibiție (de substrat și de produs) asociate. Cinetica de transfer și de consum a glucozei poate fi descrisă de modelul Corona-Gonzales adaptat pentru celulele imobilizate de *A. succinogenes* (ecuația V.1), iar determinarea concentrațiilor internă (ecuația V.2) și superficială (ecuația V.3) ale substratului s-a realizat prin considerarea condițiilor de limită din centrul ($R = 0$) și de la suprafața particulelor de biocatalizatori ($R = R_p$).

$$\frac{dC_{SP}}{dt} = D_{Se} \cdot \left[\frac{1}{r^2} \cdot \frac{d}{dr} \left(r^2 \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} \right) \right] - V \cdot C_C \cdot \left(\frac{K_{iS}}{K_{iS} + C_{SP}} \right) \cdot \left(\frac{K_{iP}}{K_{iP} + Y_{P/S} \cdot C_{SP}} \right) \quad (V.1)$$

$$C_{SP} = \frac{Bi \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cos(3\phi \cdot R_p)}{R_p^2} \cdot \left[\frac{3\phi}{R_p} - R_p \cdot \tan(3\phi \cdot R_p) \right] \cdot \frac{\sin(3\phi \cdot r)}{r} \quad (V.2)$$

$$C_{Si} = \frac{Bi \cdot C_{SL} \cdot \cos(3\phi \cdot R_p) \cdot \left[3\phi - R_p^2 \cdot \tan(3\phi \cdot R_p) \right] \cdot \sin(3\phi) - C_{SL} \cdot R_p^4}{Bi \cdot \cos(3\phi \cdot R_p) \cdot \left[3\phi - R_p^2 \cdot \tan(3\phi \cdot R_p) \right]} \quad (V.3)$$

11. Indiferent de configurația stratului de biocatalizatori, creșterea diametrului de imobilizare manifestă efect negativ asupra coeficientului de transfer de masă al substratului k_L , ca rezultat al creșterii grosimii stratului limită de la suprafața acestora. Pe de altă, raportul coeficienților de transfer de masă k_{LM}/k_{LB} crește odată cu dimensiunea biocatalizatorilor, ca urmare a amplificării turbulenței din stratul mobil de biocatalizatori.

12. Evoluția similară a rapoartelor concentrațiilor interne și a fluxurilor masice interne corespunzătoare este justificată prin dependența concentrației interne de valoarea sa superficială. Astfel, ambii parametri sunt reduși către centrul particulei, efectul fiind mai pronunțat în cazul configurației fixe tip „basket” de biocatalizatori și odată cu creșterea diametrului de imobilizare. Fluxurile masice interne asociate configurațiilor mobilă și fixă de biocatalizatori au fost determinate conform relației V.7, iar raportul acestora (n_{PM}/n_{PB}) crește de la valoarea 1,02 obținută la suprafața biocatalizatorului, la valori cuprinse între 2,2–3,8 asociate centrului biocatalitic.

$$n_p = D_{Se} \cdot \frac{Bi \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cos(3\phi \cdot R_p)}{R_p^3} \cdot \left[3\phi - R_p^2 \cdot \tan(3\phi \cdot R_p) \right] \cdot \left[\frac{3\phi \cdot \cos\left(\frac{3\phi \cdot r}{R_p}\right)}{R_p \cdot r} - \frac{\sin\left(\frac{3\phi \cdot r}{R_p}\right)}{r^2} \right] \quad (V.7)$$

13. Indiferent de configurația biocatalizatorilor, factorul de eficacitate λ (ecuația V.8) variază lent în regiunea adiacentă centrului sau suprafeței biocatalizatorilor, datorită

concentrației reduse a substratului în centrul particulelor. De asemenea, menținerea la valori cât mai apropiate de valoarea superficială a concentrației substratului în vecinătatea suprafeței biocatalizatorilor favorizează diminuarea efectului imobilizării (acestora) asupra performanței procesului biocatalitic (caz în care λ tinde către 1). Pe de altă parte, variația dintre dimensiunea biocatalizatorilor și raportul factorilor de eficacitate λ_M/λ_B sugerează o descreștere mai pronunțată a vitezei de conversie a glucozei din bioreactorul cu „basket” staționar, datorită concentrației mai reduse a substratului în interiorul particulelor de biocatalizatori localizate în stratul cilindric, efectul fiind diminuat la valori mici ale diametrului de imobilizare.

$$\lambda = 3 \cdot k_L \cdot \frac{(C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cos(3\varphi \cdot R_p) \cdot \left[\frac{3\varphi}{R_p} - R_p \cdot \operatorname{tg}(3\varphi \cdot R_p) \right]}{R_p^4 \cdot V \cdot C_C} \cdot \left[\frac{\cos(3\varphi) \cdot [3\varphi - \operatorname{tg}(3\varphi)]}{\left(\frac{K_{iS}}{K_{iS} + C_S} \right) \cdot \left(\frac{K_{iP}}{K_{iP} + Y_{P/S} \cdot C_S} \right)} \right] \quad (V.8)$$

14. De asemenea, a fost studiată distribuția eficienței amestecării într-un bioreactor gaz-lift cu amestecare interioară, prin intermediul valorilor timpilor de amestecare înregistrate la diferite poziții ale electrodului de pH, precum și al stabilirii influențelor concentrației biomasei și al parametrilor de operare ai bioreactorului asupra alternanței localizării regiunilor active și stagnante. În acest sens, experimentele au fost realizate inițial în absența biomasei pentru lichide de fermentație simulate de viscozitate ridicată (apă și soluții de carboximetilceluloză sodică, cu viscozitatea aparentă cuprinsă între 5 și 26 cP) și ulterior pentru medii de cultură reale (suspensii de drojdii *Yarrowia lipolytica*, cu o concentrație a biomasei cuprinsă între 10 și 50 g/l s.u., corespunzătoare unor viscozități aparente de 2,7 - 9,5 cP), în scopul determinării influenței prezenței masei celulare asupra eficienței amestecării.

15. Rezultatele studiilor realizate pe lichide de fermentație simulate confirmă o circulație mai intensă în regiunea ascendentă, care favorizează viteze ridicate ale transferurilor de masă și de căldură, precum și generarea celor mai intense forțe de forfecare. Indiferent de viscozitatea mediului și poziția din regiunea ascendentă, intensificarea aerăției manifestă efect pozitiv asupra circulației mediului, efectul fiind mai pronunțat la valori cuprinse între $1,05\text{--}1,95 \cdot 10^{-3}$ m/s ale vitezei superficiale a aerului barbotat. De asemenea, cea mai intensă circulație a mediului este obținută în pozițiile intermediare 2 și 3, care sunt localizate deasupra barbotorului și corespund zonelor cu cea mai intensă turbulență (în regiunea inferioară, circulația mediului este îngreunată ca urmare a efectului de “fund”, iar viteza de circulație a mediului este redusă în regiunea superioară de degazare, ca urmare a creșterii suprafeței transversale de circulație).

16. Hidrodinamica mediului din regiunea descendentă este mai complexă și este justificată de “cantitatea” și comportarea bulelor din fluxul de fluid corespunzător, iar factorii considerați manifestă influențe diferite asupra timpului de amestecare. Astfel,

creșterea vitezei superficiale a aerului barbotat manifestă efect pozitiv parțial asupra circulației mediului (urmată de o zonă de platou și de creștere ulterioară a timpului de amestecare), iar zonele 1 și 4 sunt cel mai intens amestecate, datorită efectului de recirculare a mediului asociat prezenței plăcii despărțitoare în regiunile extreme de circulație (turbulența din regiunile intermediare este redusă ca urmare a acumulării bulelor și a creșterii viscozității mediului).

17. Pe baza rezultatelor obținute au fost propuse corelații matematice care descriu influența cumulată a factorilor considerați (viscozitatea aparentă a mediului, viteza superficială a aerului, poziția pe înălțimea bioreactorului) asupra timpului de amestecare, pentru regiunile ascendentă (ecuația VI.2) și descendentă ale bioreactorului (ecuația VI.3). Modelele propuse sunt în concordanță cu rezultatele experimentale, oferind o abatere medie de $\pm 6,6\%$ pentru regiunea ascendentă și, respectiv, de $\pm 3,3\%$ pentru cea descendentă.

$$t_m = 4,186 \cdot \frac{\eta_a^{0,242} \cdot h^{0,124}}{v_s^{0,156}}, s \quad (VI.2)$$

$$t_m = 7,816 \cdot \frac{\eta_a^{0,633} \cdot h^{0,124}}{v_s^{2,602 \cdot 10^{-2} \cdot \ln h}}, s \quad (VI.3)$$

18. De asemenea, regiunea ascendentă corespunde celei mai mari intensități a amestecării și în cazul lichidelor de fermentație reale, însă prezența biomasei determină modificări ale distribuției acesteia de-a lungul regiunii ascendente, mai ales datorită tendinței de favorizare a coalescenței bulelor și de depunere a biomasei la baza bioreactorului. Astfel, creșterea vitezei de aerație manifestă efect pozitiv constant doar asupra circulației mediului din regiunile 2,3 și 4 de amplasare ale electrodului de pH, iar circulația mediului din regiunea 1 este îngreunată datorită plutirii bulelor din fluxul descendent și frecărilor dintre celulele acumulate/depuse la baza bioreactorului.

19. Vitezele de circulație ale mediului din pozițiile extreme (1 și 4) ale regiunii ascendente din bioreactorul cu *Y. lipolytica* sunt influențate în principal de concentrația celulelor din aceste regiuni, și mai puțin de suprafața secțiunii de curgere, precum în cazul mediilor simulate. Creșterea concentrației biomasei manifestă efect negativ asupra circulației mediului din regiunea ascendentă, cu excepția poziției superioare 4 și la valori mai mari de $1,35 \cdot 10^{-3}$ m/s ale vitezei de aerație. Această comportare diferită este atribuită efectului intensificării aerației peste limita de $1,35 \cdot 10^{-3}$ m/s, care determină dispersarea biomasei la partea superioară a bioreactorului, cu diminuarea turbulenței din această regiune. Însă magnitudinea relativă a efectului pozitiv indus de creșterea vitezei ascendente a bulelor mari formate prin coalescență o depășește pe cea a efectului negativ indus de intensificarea frecărilor dintre celulele acumulate în partea superioară, ceea ce favorizează intensificarea amestecării și diminuarea timpului necesar omogenizării mediului din această regiune.

20. Intensitatea amestecării din regiunea descendentă este influențată de concentrația biomasei și valoarea vitezei de aerație. Astfel, la concentrații mai reduse de 30 g/l s.u. ale biomasei, zonele intermediare corespund celei mai intense amestecări, dar creșterea suplimentară a concentrației biomasei peste pragul de 30 g/l s.u și a vitezei superficiale a aerului peste $1,5 \cdot 10^{-3}$ m/s determină reducerea turbulenței din regiunile intermediare și creșterea timpului de amestecare comparativ cu cel asociat pozițiilor extreme.

21. Influența cumulată a factorilor considerați (concentrația biomasei, viteza superficială a aerului barbotat, poziția pe înălțimea bioreactorului) asupra timpului de amestecare necesar omogenizării mediilor reale de *Y. lipolytica* a fost stabilită pentru fiecare dintre regiunile de circulație a mediului (ascendentă pozițiile 2-4 (ecuația VI.6) și descendentă pozițiile 2-4 (ecuația VI.7)), dar și pentru evoluția particulară de la baza bioreactorului (poziția 1 din ambele regiuni de circulație, ecuația VI.5). Aceste modele sunt în concordanță cu rezultatele experimentale, oferind o abatere medie de $\pm 5,1\%$ pentru regiunea ascendentă și de $\pm 5,6\%$ pentru cea descendentă.

$$t_m = 0,226 \cdot \frac{C_x^{0,298} \cdot h^{0,089}}{v_s^{0,609}}, s \quad (VI.6)$$

$$t_m = 7,494 \cdot \frac{C_x^{0,665} \cdot h^{0,089}}{v_s^{0,011 \cdot \ln h}}, s \quad (VI.7)$$

$$t_m = 11,301 \cdot \frac{C_x^{0,496}}{v_s^{0,021 \cdot \exp(h)}}, s \quad (VI.5)$$

22. Ultimul studiu a fost destinat analizei performanței proceselor de epurare biologică aerobă și anaerobă a apelor reziduale provenite din industria uleiului de măsline, folosind un amestec microbial de *Bacillus sp.* În acest sens, modelul Pavlostathis și Giraldo-Gomez propus pentru cinetica de biodegradare anaerobă a lipidelor din mediu a fost adaptat prin introducerea unui termen suplimentar, respectiv a vitezei specifice modificate (k_d'), care ține cont de concentrația oxigenului dizolvat în mediu. Valorile k_d' au fost determinate prin menținerea la valori prestabilite a concentrației oxigenului din mediu și reprezentarea grafică a dreptelor corespunzătoare. Performanța procesului aerob de biodegradare a lipidelor a fost analizată prin stabilirea influenței concentrației oxigenului dizolvat asupra raportului k_d'/k_d dintre viteza medie și specifică de consum a substratului (tabelul VI.1):

Tabelul VI.1. Valorile vitezei specifice k_d și ale vitezei modificate, k_d' , a biodegradării lipidelor cu celule de *Bacillus sp.*

C_{O_2} , mg/l	Anaerobic	1,6	2,1	3,3	4,2	5,1	5,9
$k_d, k_d' \cdot 10^2, h^{-1}$	2,61	3,53	3,7	4,76	6,4	7,55	8,12

23. Rezultatele obținute confirmă eficiența superioară a procesului aerob cu celule libere de *Bacillus sp.*, pentru care viteza de conversie a substratului este de aproape două ori mai ridicată decât în cazul procesului anaerob. Pe baza acestor rezultate a fost propus un model cinetic care ține cont de efectul pozitiv al concentrației oxigenului dizolvat din mediu (ecuația VI.14) și care oferă o bună concordanță cu valorile experimentale, abaterea medie fiind de $\pm 6.84\%$.

$$\frac{-dC_{TL}}{dt} = k_d \cdot C_{O_2}^{0.62} \cdot C_{TL} \quad (VI.14)$$

24. Rezultatele cercetărilor proprii s-au concretizat în elaborarea și publicarea a 9 lucrări științifice, participarea la 7 sesiuni științifice naționale și internaționale, precum și prin participarea la derularea unui grant de cercetare.

VIII. ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ DIN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

VIII.1. ARTICOLE PUBLICATE

VIII.1.1. Articole publicate în reviste cotate ISI:

1. D. Cașcaval, **R.M. Matran**, A.I. Galaction, A. Tucaliuc, *Production of succinic acid in basket and mobile bed bioreactors - „green” alternative to the chemical technology*, Chinese Journal of Chemical Engineering 2016, 24(4), 513-520.

2. D. Cașcaval, **R.M. Matran**, M. Turnea, A.C. Blaga, A.I. Galaction, *Distribution of mixing efficiency in a split cylinder gas-lift bioreactor for Yarrowia lipolytica suspensions*, Canadian Journal of Chemical Engineering 2015, 93(1), 18-28.

3. **R.M. Matran**, A.C. Blaga, D. Cașcaval, A. Tucaliuc, A.I. Galaction, *Comparative studies on kinetics of anaerobic and aerobic biodegradation of lipids from olive oil mill wastewaters with mixture of Bacillus spp. cells*, Environmental Engineering and Management Journal 2015, 14 (3), 575 – 579.

4. A.I. Galaction, A.C. Blaga, **R.M. Matran**, D. Cașcaval, *Effect of bed configuration of immobilized biocatalysts on Penicillin G hydrolysis efficiency*, Korean Journal of Chemical Engineering 2015, 32(2), 216-221.

5. A.I. Galaction, **R.M. Matran**, A.C. Blaga, M. Turnea, D. Cașcaval, *Applications of pneumatic bioreactors in wastewaters treatment 1. Mixing efficiency and distribution in split-cylinder gas-lift bioreactor for viscous media*, Environmental Engineering and Management Journal 2014, 13 (10), 2653-2664.

6. A.I. Galaction, **R.M. Matran**, M. Turnea, A. C. Blaga, D. Cașcaval, *Engineering aspects of Penicillin G transfer and conversion to 6-Aminopenicillanic acid in bioreactor*

with mobile bed of immobilized penicillin amidase, Chemical Engineering Communications 2014, 201(12),1568 -1581.

7. **R.M. Matran**, A.I. Galaction, A.C. Blaga, M. Turnea, D. Cașcaval, *Green technology for 6-aminopenicillanic acid production - study of Penicillin G hydrolysis in a bioreactor with mobile bed of immobilized penicillin amidase under substrate inhibition*, Environmental Engineering and Management Journal 2013, 12 (11), 2261 -2266.

VIII.1.2. Articole publicate in reviste incluse BDI:

8. D. Cașcaval, A.I. Galaction, **R.M. Matran**, *New configurations of immobilized biocatalysts beds - Bioethanol production in basket bioreactors*, Buletinul Institutului Politehnic Iași 2013, 59(4), 95-112.

9. **R.M. Matran**, A.I. Galaction, D. Cașcaval, *Pneumatic bioreactors with immobilized biocatalysts: An overview*, Bulletin IPI 2013, 59(4), 39 – 47.

VIII.2. COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE

1. **Ramona Mihaela Matran**, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Anca Irina Galaction, Dan Cașcaval, *Studies on mixing efficiency and its distribution in Yarrowia lipolytica suspensions for a split-cylinder gas-lift bioreactor*, 2nd International Conference on Chemical Engineering – ICCE 2014, Iași, Romania, 5 - 7 November 2014.

2. Alexandra Cristina Blaga, **Ramona Mihaela Matran**, Anca Irina Galaction, Marius Turnea, Lenuța Kloetzer, Dan Cașcaval, *Analysis of mixing intensity and distribution in a split-cylinder gas-lift bioreactor for Yarrowia lipolytica cells suspensions*, European Symposium on Biochemical Engineering Sciences, Bioenergy and Biomolecules - ESBES 2014, Lille, France, 07 - 10 September 2014.

3. Anca Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Dan Cașcaval, **Ramona Mihaela Matran**, *Succinic acid production in a bioreactor with mobile bed of immobilized A.succininogenes*, International Conference on Chemical and Food Engineering - ICCFE 2014, Paris, France, 21-22 July 2014.

4. Anca Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga, **Ramona Mihaela Matran**, Marius Turnea, Dan Cașcaval, *Influence of external and internal diffusion on lipids biodegradation in a bioreactor with mobile bed of immobilized Bacillus spp. cells*, 7th International Conference Environmental Engineering and Management – ICEEM/07, Vienna, Austria, 18 – 21 September 2013.

5. **Ramona Mihaela Matran**, Maria Filibiu, Alexandra Cristina Blaga, Anca Irina Galaction, Dan Cașcaval, *Improvement of oxygen transfer in bacterial and yeasts cultures using oxygen-vectors*, 18th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCE XVIII, Sinaia, Romania, 4 - 7 September 2013.

6. Anca Irina Galaction, Dan Cașcaval, Alexandra Cristina Blaga, **Ramona Mihaela Matran**, Maria Filibiu, *Bioreactors of basket type for immobilized biocatalysts*, Salonul de Inventică CHIM-INVENT, Iași, Romania, 3-5 July 2013.

7. **Ramona Mihaela Matran**, Anca – Marcela Lupășteanu, Marius Turnea, Anca Irina Galaction, Dan Cașcaval, *Kinetics of lipids biodegradation with free and immobilized Bacillus spp. cells*, 1st International Conference on Chemical Engineering – CECE 2012, Iași, Romania, 28 - 30 November 2012.

VIII.3. ALTE ACTIVITĂȚI

Membru în colectiv (asistent de cercetare științifică): Proiect PCE-IDEI, cod PN-II-ID-PCE-2011-3-0088, nr. 207/2011 (1.02.2013 – 31.12.2013).

IX. BIBLIOGRAFIE (SELECTIVĂ)

1. D.S.J Rathod, A to Z of enzyme technology, M. F. Chaplin, C. Bucke, *Enzyme technology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
2. A.I. Galaction, A.M. Lupășteanu, D.Cașcaval, *Bioreactors with stirred bed of immobilized cells. 1.Studies on mixing efficiency*, Environmental Engineering and Management Journal 2007, 6(2), 101-110.
3. A.I. Galaction, R. Baltaru, L. Kloetzer, A. Vlysidis, C.Webb, M. Turnea, D. Cașcaval, *External and internal glucose mass transfers in succinic acid fermentation with stirred bed of immobilized Actinobacillus succinogenes under substrate and product inhibitions*, Journal of Microbiology and Biotechnology 2011, 21(12), 1257-1263.
4. D. Cașcaval, A.I. Galaction, **R.M. Matran**, *New configurations of immobilized biocatalysts beds - Bioethanol production in basket bioreactors*, Buletinul Institutului Politehnic Iași 2013, 59(4), 95-112.
5. Y. Chisti, M. Moo-Young, *Hydrodynamics and oxygen transfer in pneumatic bioreactor devices*, Biotechnology and Bioengineering 1988, 31, 487-494.
6. **R.M. Matran**, A.I. Galaction, D. Cașcaval, *Pneumatic bioreactors with immobilized biocatalysts: An overview*, Bulletin IPI 2013, 59(4), 39 – 47.
7. M.Y.Chisti, (1989), *Airlift bioreactors*, London-New York: Elsevier Applied Science.
8. R. Davarnejad, E. Bagheripoor, A. Sahraei, *CFD Simulation of scale influence on the hydrodynamics of an internal loop airlift reactor*, Engineering 2012, 4, 668-674.
9. W. Zhang, Y. Yong, G. Zhang, C. Yang, Z.S. Mao, *Mixing characteristics and bubble behavior in an airlift internal loop reactor with low aspect ratio*, Chinese Journal of Chemical Engineering 2014, 22(6), 611—621.
10. D. Cașcaval, A.I. Galaction, M. Turnea, *Comparative analysis of mixing distribution in aerobic stirred bioreactor for simulated yeasts and fungus broths*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2007, 34(1), 35-47.

11. D. Caşcaval, A.I. Galaction, R. Rotaru, M.Turnea, *Study on the mixing efficiency in a basket bioreactor with immobilized yeasts cells*, Environmental Engineering and Management Journal 2011, 10(5), 711-716.
12. SpinChem® (2017a), SpinChem® Products, available at <http://www.spinchem.com/technology/>.
13. SpinChem® (2017b), SpinChem® Technology, available at <http://www.spinchem.com/technology/>.
14. SpinChem® (2017c), SpinChem® Applications, available at <http://www.spinchem.com/applications/>.
15. A. Hussain, M. Kangwa, M. Fernandez-Lahore, *Comparative analysis of stirred catalytic basket bio-reactor for the production of bio-ethanol using free and immobilized Saccharomyces cerevisiae cells*, AMB Express 2017, 7, 158-167.
16. Y. Chisti, M. Moo - Young, *Reaction Engineering. Improve the performance of air-lift reactors*, Chemical Engineering Progress 1993, 89(6), 38-45.
17. M. del C. Chávez, L.V. González, M. Ruiz, M. de la Luz, X. Negrete, O. Martín Hernández, E.M. Escamilla, *Mass transfer in bioreactors*, 2011, Mass Transfer in Multiphase Systems and its Applications, Prof. Mohamed El-Amin (Ed.), ISBN: 978-953-307-215-9, InTech, Available from <http://www.intechopen.com/books/mass-transfer-in-multiphase-systems-and-its-applications/mass-transfer-in-bioreactors>.
18. W. Zhang, Y. Yong, G. Zhang, C. Yang, Z.S. Mao, *Micro-mixing characteristics and bubble behaviors in an airlift internal loop reactor with low height-to-diameter ratio* 2012, 14th European Conference on Mixing, Warszawa, 10-13 September 2012.
19. J.N. Ntuhuga, T. Senn, P. Gschwind, R. Kohlus, *An evaluation of different bioreactor configurations for continuous bio-ethanol production*, Applied Energy 2013, 108, 194–201.
20. D. Caşcaval, A.I. Galaction, *Bioprocese alimentare şi farmaceutice*, Editura “Gr.T. Popa”, Iaşi, 2014.
21. M.R. Detofol, E. Aguiar-Oliveira, C.E. Bustamante-Vargas, A.B. de Jesus Soares, M.B. Alvarado Soares, F. Maugeri, *Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor*, Journal of Biotechnology 2015, 210, 44-51.
22. A. Hussain, M. Kangwa, A.G. Abo-Elwafa, M. Fernandez-Lahore, *Influence of operational parameters on the fluid-side mass transfer resistance observed in a packed bed bioreactor*, AMB Express 2015, 5(1), 25.
23. A.I. Galaction, R. Baltaru, L. Kloetzer, A. Vlysidis, C. Webb, M. Turnea, D. Caşcaval, *Succinic acid fermentation in a stationary-basket bioreactor with a packed bed of immobilized Actinobacillus succinogenes: 1. Influence of internal diffusion on substrate mass transfer and consumption rate*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2012, 39(6), 877-888.
24. D.Caşcaval, A.I. Galaction, M. Turnea, A.M. Lupăşteanu, *Biodegradation of lipids from olive oil mill wastewaters in a stationary basket bioreactor with immobilized Bacillus spp. cells – Influence of internal diffusion*, Water Science and Technology 2012, 65(5),

920-926.

25. A.L. Levy, *Measurement of triglycerides using nonane extraction and colorimetry*, Annals of Clinical & Laboratory Science 1972, 2(6), 474-479.
 26. **R.M. Matran**, A.I. Galaction, A.C. Blaga, M. Turnea, D. Cașcaval, *Green technology for 6-aminopenicillanic acid production - study of Penicillin G hydrolysis in a bioreactor with mobile bed of immobilized penicillin amidase under substrate inhibition*, Environmental Engineering and Management Journal 2013, 12 (11), 2261-2266.
 27. A.I. Galaction, **R.M. Matran**, M. Turnea, A. C. Blaga, D. Cascaval, *Engineering aspects of Penicillin G transfer and conversion to 6-Aminopenicillanic acid in bioreactor with mobile bed of immobilized penicillin amidase*, Chemical Engineering Communications 2014, 201(12), 1568 -1581.
 28. D. Cașcaval, M. Turnea, A.I. Galaction, A.C. Blaga, *6-Aminopenicillanic acid production in stationary basket bioreactor with packed bed of immobilized penicillin amidase—Penicillin G mass transfer and consumption rate under internal diffusion limitation*, Biochemical Engineering Journal 2012, 69, 113– 122.
 29. R.B. Bird, W.E. Stewart, N.E. Lightfoot, *Transport phenomena*, Wiley, New York, 1960.
 30. A.I. Galaction, A.C. Blaga, **R.M. Matran**, D. Cașcaval, *Effect of bed configuration of immobilized biocatalysts on Penicillin G hydrolysis efficiency*, Korean Journal of Chemical Engineering 2015, 32(2), 216-221.
 31. D. Cașcaval, **R.M. Matran**, A.I. Galaction, A. Tucaliuc, *Production of succinic acid in basket and mobile bed bioreactors - „green” alternative to the chemical technology*, Chinese Journal of Chemical Engineering 2016, 24(4), 513-520.
 32. M.K. Moraveji, M.E. Fakhari, E. Mohsenzadeh, R. Davarnejad, *Hydrodynamics and oxygen mass transfer in a packed bed split-cylinder airlift reactor containing dilute alcoholic solutions*, Heat and Mass Transfer 2013, 49(1), 11-19.
 33. A.I. Galaction, **R.M. Matran**, A.C. Blaga, M. Turnea, D. Cașcaval, *Applications of pneumatic bioreactors in wastewaters treatment 1. Mixing efficiency and distribution in split-cylinder gas-lift bioreactor for viscous media*, Environmental Engineering and Management Journal 2014, 13(10), 2653-2664.
 34. D. Cașcaval, **R.M. Matran**, M. Turnea, A.C. Blaga, A.I. Galaction, *Distribution of mixing efficiency in a split cylinder gas-lift bioreactor for Yarrowia lipolytica suspensions*, Canadian Journal of Chemical Engineering 2014, 93(1), 18-28.
 35. F. D. Harzevili, *Biotechnological applications of the yeast Yarrowia lipolytica*, SpringerBriefs in Microbiology, Springer Science & Business Media, New York, 2014.
 36. GIA, *Vegetable Oils Cooking and Salad Market Report*, San Jose 2016, <http://www.strategyr.com>.
 37. **R.M. Matran**, A.C. Blaga, D. Cașcaval, A. Tucaliuc, A.I. Galaction, *Comparative studies on kinetics of anaerobic and aerobic biodegradation of lipids from olive oil mill wastewaters with mixture of Bacillus spp. cells*, Environmental Engineering and Management Journal 2015, 14(3), 575-579.
-