

Raport științific sintetic intermediar
privind implementarea proiectului pe toată perioada de execuție până în prezent

1. Raport privind etapa septembrie – decembrie 2013

Membrii echipei s-au documentat cu privire la datele din literatura de specialitate referitoare la tema propusă. De asemenea, s-a elaborat metodologia de lucru prin implicarea întregului personal implicat în proiect.

În această etapă s-a elaborat planul de activități pentru determinarea ritmului de creștere a plantelor de sorg sub influența condițiilor climatice de toamna specifice Câmpiei Joase a Timișului. De asemenea, s-a elaborat planul de lucru în vederea studiului capacității de producție a biomasei la sorgul zaharat cultivat în ***cultură succesivă după cereale*** (după orz). După recoltarea orzului (în ultima decadă a lunii iunie) s-a pregătit terenul și s-au realizat patru loturi în care s-au semănat patru hibrizi de sorg, ca și cultură succesivă după orz de toamnă.

Materialul biologic utilizat pentru realizarea cercetărilor a fost compus din patru varietăți de sorg cu origini diferite și anume:

1. Sorghum bicolor x sudanense var. Jumbo - origine Australia
2. Sweet sorghum x sweet sorghum hybrid var. Sugargraze - origine Australia
3. Sorghum bicolor x sudanense x sweet sorghum var. Sugargraze II - origine USA
4. Sorghum bicolor convariet. saccharatum var. F135ST - origine România (INCDA Fundulea).

Loturile experimentale au fost înființate în 10 iulie 2013, după recoltarea culturilor de orz. În cadrul variantelor experimentale construite în acest proiect, plantele de sorg au înregistrat amplitudini a înălțimii cuprinse între 188 cm în cazul var. Jumbo și 254 cm în cazul var. F135ST. Referitor la creșterea în înălțime a plantelor aparținând celor patru genotipuri studiate, am constatat faptul că în fenofaza 1.4 BBCH înălțimea cea mai mare au înregistrat-o plantele aparținând genotipului Jumbo, în fenofaza 3.7 BBCH plantele aparținând genotipului Sugargraze II, respectiv în fenofazele 6.7 și 8.9 BBCH genotipul F135ST a înregistrat cele mai mari valori ale înălțimii plantelor comparativ cu celelalte genotipuri.

În ceea ce privește dinamica producției de biomasă, s-a observat faptul că pe toate variantele experimentale comparativ cu celelalte genotipuri, F135ST a realizat valori maxime, în timp ce genotipul Jumbo a înregistrat cele mai mici valori.

Referitor la producția de substanță uscată a celor patru genotipuri studiate, se constată că în fenofaza 1.4 BBCH valoarea cea mai mare au înregistrat-o plantele aparținând genotipului Sugargraze II, în timp ce în ultimele trei momente ale determinării genotipul F135ST a realizat producția de substanță uscată cea mai mare comparativ cu celelalte genotipuri.

Nivelul producției de biomasă a fost foarte mare: între 70 și 86 de t / ha, la toate variantele experimentale. Sorgul zaharat reacționează foarte bine la aplicarea de îngrășăminte de bază la semănat, prin aplicarea îngrășămintelor la 3 cm sub semințe. Sorgul este o specie cu plasticitate ecologică mare, care oferă randament mare, chiar ca o cultură succesivă după cereale, biomasa putând fi recoltată atunci când boabele sunt în curs de dezvoltare. Este suficientă fertilizarea numai o singură dată, nu este nevoie de fertilizare suplimentară datorită ciclului scurt de dezvoltare în cultură succesivă: 90-110 zile. Culturile de sorg s-au oprit din dezvoltare în prima decadă a lunii octombrie datorită temperaturilor de îngheț din timpul nopții.



06.08.2013



22.08.2013

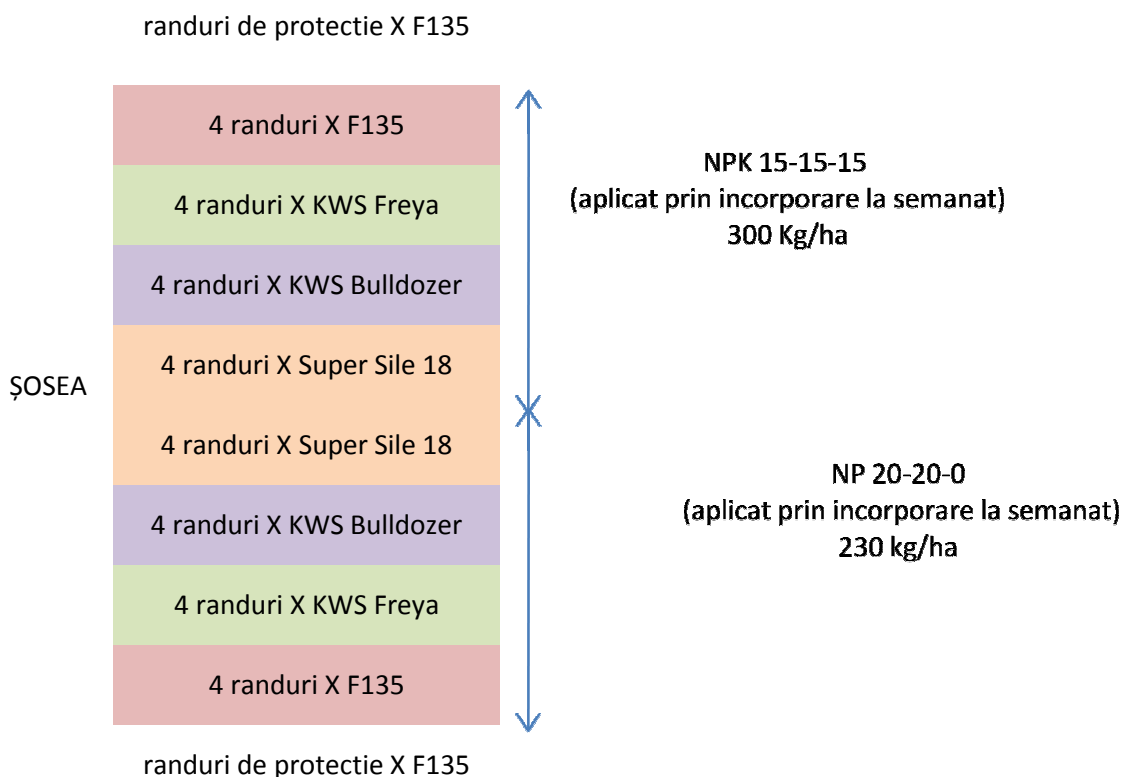


07.10.2013

În ceea ce privește cercetările privind conservarea biomasei de sorg, a fost elaborată o lucrare științifică cu titlul *Ensiling Sweet Sorghum and Maize Stalks as Feedstock for Renewable Energy Production*, Authors: Trulea Adrian, Vintila Teodor, Pop Georgeta, Șumălan Radu, Sorin Gaspar, publicată în Research Journal of Agricultural Science Vol.45 No.3 - ISSN 2066 - 1843 - Editura Agroprint – 2013. Experimentele au fost efectuate la scară de laborator, iar minisilozurile au fost construite din sorg tocat la cca 1 cm, bagasă de sorg, combinații de sorg cu coceni de porumb, tratate și netratate cu inoculant cu bacterii lactice și etanol ca aditivi de conservare. Doisprezece tipuri de silozuri au fost obținute prin combinarea tipurilor de biomasă și aditivi. A fost examinat efectul acestor aditivi și combinații de biomasă asupra calităților și compoziției silozului rezultat. Silozuri fost analizate în scopul evaluării conservarea valorii nutritive și a calității biomasei însilozate. Cele mai mici valori ale pH-ului (3.3) au fost înregistrate în cazul silozurilor de bagasă de sorg și bagasă de sorg cu etanol. Cele mai mari valori ale pH-ului (6-6.3), în cazul în care în silozuri de coceni de porumb, în aceste silozurii fiind găsite și cele mai mari valori a numărului de contaminanți. Zaharuri solubile au fost conservate în concentrație mare în biomasa însilozată tratată cu etanol: peste 91% din zaharurile solubile în apă a fost găsit în sorgul însilozat cu etanol, și mai puțin de 57% în sorg însilozat cu bacterii lactice. Etanol a inhibat de asemenea și degradarea proteinelor în siloz și multiplicarea contaminanților ($1,9 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ în sorg tratat cu etanol în comparație cu $3,2 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ în silozul de sorg fără aditivi). Inoculanții cu bacterii lactice ameliorează parametrii de conservare a sorgului zaharat, dar duce la un consumul de zaharuri în timpul însilozării. Pierderile de substanță uscată, grăsimi, celuloză brută nu au fost semnificative în silozurile obținute.

2. Raport privind etapa ianuarie – decembrie 2014

Membrii echipei au continuat studiul capacității de producție a biomasei la sorgul zaharat. În acest scop, a fost înființat un câmp experimental (50% din suprafața stabilită inițial) cu 4 hibridi de sorg zaharat, în două variante de fertilizare, pe 4 repetiții, în condițiile pedoclimatice și tehnologice specifice Câmpiei Joase a Timișului. Culturile au fost semănate în 29.04.2014, aplicându-se o desime de semănare de 166000 bg/ha.



Schema de amplasare a culturilor experimentale în jud. Timiș

În plus, a mai fost înființat un câmp experimental cu 3 hibridi de sorg în condițiile pedoclimatice și tehnologice specifice zonei podișului Transilvaniei, pe soluri poluate din zona Copșa-Mică, județul Sibiu. În zona Copșa-Mică s-au realizat loturi experimentale cu hibridii cultivați în 2013 în jud. Timiș (var. Jumbo, Sugargraze, Sugargraze II) Au fost efectuate analize privind calitatea solului la răsărirea plantelor, la înflorire și la recoltare pentru următorii parametri: pH, azot total, humus, fosfor, potasiu, sulfat, sodiu, calciu și magneziu, pentru urmărirea dinamicii de absorbție a elementelor nutriției implicate în realizarea biomasei. În ceea ce privește producția de biomasă, s-au obținut valori cuprinse între 16,5 t/ha substanță uscată în cazul hibridului Freya (KWS) și 42,8 t/ha substanță uscată în cazul hibridului Bulldozer (KWS), în varianta de fertilizare NPK 20-20-0.

În ceea ce privește extracția sucului din sorg, s-au obținut productivități cuprinse între 0,02 – 0,07 g suc / g plantă în cazul var. Freya și respectiv Bulldozer și până la 0,23 – 0,27 g suc / g plantă în cazul var. Jumbo și respectiv Sugargraze. Concentrațiile în zahăr reducător în sucii extras variaza între 22,13 – 31,80 g/l în cazul var. Super Sile și respectiv Sugargraze și până la 70,07 – 84,52 g/l în cazul var. F135 și respectiv Sugargraze II.

În ceea ce privește conservarea glucidelor în biomasa recoltată de sorg zaharat, au fost realizate mai multe variante experimentale de silozuri de sorg conservate prin administrare de diferiți aditivi de însilozare (culturi selecționate de bacterii lactice, un acid organic și un alcool în diferite concentrații). Biomasa recoltată în toamna 2013 a fost inițial congelată până la deschiderea financiară a etapei 2014 a proiectului, iar în primăvara 2014 a fost însilozată în mini-silozuri la nivel de laborator. Au fost realizate 18 variante de însilozare conținând biomasa mărunțită la max. 2 cm. După adăugarea aditivilor de conservare, pungile au fost închise sub vid, introduse într-o incintă climatizată și păstrate la 22°C timp de 6 luni.

Pentru a determina modul în care s-au conservat zaharurile în biomasa însilozată, s-a extras sucii din silozuri la diferite intervale de timp de păstrare și s-a determinat concentrația în zaharuri totale, zahăr reducător, zaharoză și glucoză. De asemenea, s-au făcut analize microbiologice pentru a stabili prezența și raportul populațiilor de microorganisme de-a lungul perioadei de conservare a biomasei cu diferiți aditivi. S-au obținut rezultate remarcabile și surprinzătoare. În anumite condiții de conservare, unul dintre aditivi nu numai că a indus conservarea glucidelor în biomasa însilozată dar a contribuit chiar la extracția glucidelor din biomasa în fază lichidă și obținerea unei cantități mai mari de zahăr per cantitate de biomasa decât în cazul biomasei presate înainte de însilozare. În prezent, cercetările au fost reluate prin diversificarea concentrațiilor de aditiv, biomasa recoltată în septembrie este în prezent însilozată și se vor preleva probe până la 6 luni de conservare pentru a se determina capacitatea de conservare (și de extracție) a zaharurilor în biomasa recoltată.

Rezultatele obținute vor fi folosite pentru elaborarea unei cereri de brevet de invenție pentru un procedeu de conservare a glucidelor în biomasa de sorg din momentul recoltării până la procesare pe o perioadă de cel puțin 6 luni în condiții tehnologice convenționale și cu costuri joase.

Cu privire la obținerea etanolului de generația a doua din biomasa lignocelulozică

După măcinarea grosieră a biomasei în moara de laborator prin sita de 20 de mm, s-a făcut extracția sucului de sorg prin presare. Sucii s-au conservat prin congelare până la utilizarea lui în cercetările de laborator pentru obținerea de etanol și alți biocompuși. Bagasa rezultată a fost uscată pentru a preveni proliferarea microorganismelor în interiorul acesteia și s-a păstrat la temperatura camerei până la utilizare. Etapele principale ale procesului de obținere a etanolului de generația a doua din bagasa de sorg sunt: pretratarea mecanică și fizico-chimică; hidroliza enzimatică a poliglucidelor eliberate din complexul lignocelulozic și etapa de fermentare a hidrolizatului obținut. Enzimele folosite în etapa de hidroliză pot fi obținute *in-situ* prin cultivarea microorganismelor celulozolitice pe bagasa de sorg ca substrat de creștere. În acest sens, au fost efectuate fermentații în sistem submers (SLF) și culturi în substrat solid (SSC) de fungi din genul *Trichoderma* și *Aspergillus*. S-a determinat activitatea endoglucanazică și celulazică a extractelor obținute din culturile fungice pe bagasa de sorg și s-au obținut rezultate valoroase în ceea ce privește titrurile enzimatică, în special în cazul SSC. În acest sistem de biosinteză s-au obținut extracte enzimatică cu activitate mai mare decât în sistemul SLF.

Rezultatele obținute în cadrul acestor cercetări au fost publicate în lucrarea *Sorghum bagasse as substrate for cellulase production by submerged and solid-state cultures of Trichoderma*, autori Daniela Vintila, Kornel Kovacs, Teodor Vintila, în Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2014, 47 (1) (<http://spasb.ro/index.php/spasb/article/view/1776>) – volum indexat BDI.

În continuare, bagasa de sorg și alte tipuri de biomasă lignocelulozică au fost supuse procesului de pretratare fizico-chimică, urmat de hidroliza enzimatică cu ajutorul celulazelor fungice. Rezultatele obținute au fost prezentate la simpozionul internațional organizat de Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii din cadrul USAMVB Timișoara și sunt publicate în lucrarea *Fermentable sugars by steam/alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of biomass*, autori Adrian Trulea, Horia Barbu, Benoni Lixandru, Daniela Vintila, Georgeta Pop, Teodor Vintila, Kornel Kovacs, din Abstract Book of Animal Science and Biotechnologies Symposium, 2014. Alte rezultate din cadrul acestor cercetări au fost prezentate sub formă de poster la Congresul European de Biotehnologii, desfășurat în iulie 2014 la Edinburgh, Scoția. Rezultatele sunt publicate sub formă de rezumat în *Enhancing energy yield through saccharification of sorghum bagasse and second generation bio-ethanol production*, autori: Teodor Vintilă, Adrian Trulea, Daniela Vintilă, Georgeta Pop, Iosif Gergen, Kornel Kovacs, *New Biotechnology – Volume 31S*, July 2014 (volum cotate ISI, factor de impact 2,106). În studiul nostru, am folosit șase produse comerciale conținând enzime capabile să degradeze biomasă, pentru a cataliza hidroliza celulozei obținută prin pretratarea bagasei de sorg și a obține zaharuri fermentescibile. S-au realizat variante experimentale care conțin combinații de bagasă pretratată mecanic sau fizico-chimic (abur-alkalin), și diferite cocktail-uri de enzime. Rezultatele au indicat combinația de bagasă pretratată fizico-chimic și complexul celulozolic NS22086 (Novozymes), ca cel mai eficient. În continuarea experimentelor, s-au aplicat aceste condiții pentru a hidroliza trei tipuri de bagasă de *Sorghum bicolor* (Sugargraze, Jumbo și Fundulea FT132). Procentele de hidroliză obținute în cazul celor trei tipuri de sorg sunt între 32% și 40%. A fost monitorizată concentrația de zaharuri reducătoare și de glucoză eliberată în tamponul hidroliză. Procesul de conversie a continuat cu fermentația hidrolizatelor obținute cu ajutorul drojdiilor *Saccharomyces cerevisiae* în fermentatoare de 500 ml echipate cu senzori NIR (BlueSens) pentru a evalua în timp real concentrația de etanol, oxigen și CO₂. Concentrațiile de etanol obținute în mediile de fermentație conținând bagasă hidrolizată din cele trei tipuri de sorg au fost cuprinse între 1,65 g • ml⁻¹ și 1,96 g • ml⁻¹. Aceste valori reprezintă productivități de etanol între 330 g • g⁻¹ și 392 g • g⁻¹ raportate la bagasă substanță uscată. Aplicarea biotehnologiilor dezvoltate în acest studiu, în combinație cu metodele curent aplicate de extracție a zahărului din sorg, vor duce la creșterea eficienței producției de etanol, iar productivitatea totală de energie va crește.

În perspectiva cercetărilor privind obținerea de biogaz din biomasă și din reziduurile de fermentare, a fost elaborată o instalație pilot automatizată de producere și valorificare a biogazului. Pentru aceasta s-a depus la OSIM o cerere de brevet de invenție, publicată în buletinul OSIM: Cerere de brevet de invenție nr. a 201300067, publicată în BOPI nr. 7 / 2013. Titlul invenției: *Instalație automatizată pentru producerea biogazului*. Autor: Vintilă Teodor.

Director proiect,
