

## 1. Raport privind etapa ianuarie – decembrie 2015

### 1. Continuarea studiului capacității de producție a biomasei la sorgul zaharat

Au fost înființate loturi experimentale de sorg zaharat prin două tehnologii de cultură: culturi principale înființate în primăvară și culturi secundare, înființate în vară, după recoltarea cerealelor de toamnă.

În cazul culturilor principale, înființate la 1 mai 2015, au fost aplicate lucrările de întreținere, combatere a dăunătorilor și fertilizare corespunzătoare tehnologiilor de producere a sorgului zaharat. Condițiile climatice mult diferite în anul 2015 față de cele din anul 2014 au dus la producții de biomasă sub cele înregistrate în anul 2014. Dacă în anul 2014 au fost obținute producții de biomasă la anumiți hibrizi în jur de 100 tone per hectar, în anul curent producțiile maxime s-au situat în jur de 60 de tone per hectar. Au fost prelevate probe de plante de sorg începând cu 1 august (de la 90 de zile de cultivare) și până la 1 noiembrie (la 180 de zile de cultivare). Plantele recoltate au fost analizate în ceea ce privește înălțimea, masa, conținutul în substanță uscată, după care s-au îndepărtat frunzele și paniculele, iar tulpinile au fost fragmentate și apoi tocate pe moara de laborator Retch SM 100. Biomasă tocată a fost apoi presată cu presa de laborator, s-a recoltat suc de sorg, iar bagasa rezultată s-a supus procesului de conservare și extracție simultană a zaharurilor rămase ne-extrase prin presare. ***Conservarea și extracția simultană a zaharurilor*** din biomasă de sorg este un concept original, elaborat ca urmare a rezultatelor obținute în acest proiect și este descrisă succint mai jos, la punctul 3 (*Continuarea cercetărilor privind posibilitățile de stocare și pretratare a biomasei recoltate de sorg zaharat, cu scopul utilizării acesteia pentru producerea de energie regenerabilă și a altor biocompuși*). În ceea ce privește producțiile obținute în anul 2015, în condițiile unui regim pluviometric foarte scăzut, care a dus la un deficit de apă în sol, după 90 de zile de la semănat plantele au atins înălțimi cuprinse între 120 cm și 180 cm, greutatea ale tulpinilor cuprinse între 130 și 235 de grame, concentrații de substanță uscată în jur de 37% și concentrații de zaharuri totale determinate cu refractometrul de 6,6-6,8 grade Brix, cu variații date de tipul de hibrid și condițiile de cultivare. După alte 15 zile (la 105 zile de la semănat) plantele au depășit 250 cm, tulpinile au atins 280 de grame, iar concentrații de zaharuri totale determinate cu refractometrul a variat între 8 și 11,2 grade Brix. Valorile maxime: înălțimea maximă de 320 cm, greutatea maximă de 794 grame și concentrația maximă în substanță uscată de 76,05% au fost atinse după 150 de zile de cultivare (probe recoltate la 1 octombrie). În ceea ce privește producția de zaharuri, concentrația maximă de zaharuri totale în suc (17 grade Brix) s-a atins după 135 de zile de cultivare și a rămas constant până la ultimele probe prelevate după 180 de zile de la semănat (la 1 noiembrie). Au fost de asemenea analizate concentrațiile de glucoză, zaharoză, glucide reducătoare pe tot intervalul de la 90 la 180 de zile de la semănat, cu prelevare de probe la fiecare 15 zile în cadrul acestui interval. Astfel, s-a putut stabili momentul optim de recoltare a sorgului zaharat în funcție de varietate genetică, fenofază, regim termic și pluviometric, urmărindu-se valorile maxime de zaharuri recoltabile prin presarea sucului din tulpini. Rezultatele obținute au fost publicate în volume de lucrări științifice și prezentate la conferințe: ***Sugar extraction and saccharification of sweet sorghum biomass for biorefining***, autori:

Vintila T., Sumalan R., Iosif G., Pop G., Kovacs K., publicată în Journal of Biotechnology, Volume 208, Supplement Issue ISSN 0168-1656 și prezentată la European Biotechnology Congress 2015, București; *Sweet sorghum as feedstock for fermentation industry*, autori: Teodor Vintilă, Kornel Kovacs, Nicolae Popa, Iosif Gergen, Radu Șumălan, Abstract Book, vol. 1 of Animal Science and Biotechnologies Symposium Bioengineering of Animal Resources, 28-29 mai 2015, ISSN 2343-9459.

Lucrările de cercetare din cadrul acestui pachet de activități au fost efectuate cu ajutorul echipamentelor și materialelor existente în cadrul laboratorului de biotehnologii industriale și microbiene din cadrul USAMVB Timișoara și cu ajutorul echipamentelor și materialelor achiziționate cu fonduri din grantul acordat acestui proiect, cum sunt: moara de laborator Retsch SM100, presa de laborator Ferrari Group, refractometru, spectrofotometru etc. De asemenea, au fost efectuate servicii de înființare și întreținere loturi experimentale cu sorg zaharat, deplasări pentru prelevare probe, participări la conferințe, salarii pentru personalul implicat în cadrul acestor activități.

## **2. Selecția unor tulpini de drojdii și testarea capacității lor de biosinteză a etanolului din suc de sorg**

În cadrul acestui pachet de activități s-a pornit de la statutul actual al cunoașterii în domeniu, și anume, este cunoscut faptul că există mai multe organisme capabile să fermenteze zaharuri și să producă etanol; de asemenea parametri aplicați în timpul procesului de fermentație afectează în mod direct activitatea metabolică a organismelor. De aceea, selecția tulpinilor corespunzătoare de microorganisme și stabilirea parametrilor optimi de fermentație sunt esențiale pentru optimizarea performanțelor procesului de fermentație și a randamentului de producție de etanol. De aceea, echipa din cadrul acestui proiect a încercat investigarea capacității mai multor microorganisme de a fermenta zaharurile din sucul sorg, evaluarea influenței ratei de inoculare, a temperaturii, a adaosurilor de surse de azot și fosfor asupra productivității procesului de fermentație.

Dintr-un total de douăsprezece tulpini microbiene testate (drojdii din genurile *Saccharomyces* și *Kluyveromyces* și bacterii din genul *Zymomonas*), tulpinile de drojdii din specia *Saccharomyces cerevisiae* s-au comportat cel mai bine în procesele de fermentație a sucului de sorg și au dus la obținerea de randamente mai mari de conversie a zaharurilor la etanol. De asemenea, s-a stabilit rata optimă de inoculare, care nu trebuie să depășească 5% cultură vegetativă de drojdie bine dezvoltată, sau de 0,5 g / l drojdie uscată. O tulpină de drojdie a fost selectată ca având performanțe mai bune în ceea ce privește fermentarea zaharurilor din sucul de sorg și a permis obținerea de randamente ridicate de etanol la 37°C din sucul de sorg. În ceea ce privește suplimentarea sucului de sorg cu surse exogene de azot și fosfor au avut ca efect creșteri nesemnificative a randamentelor de conversie a zaharurilor la etanol.

Rezultatele obținute au fost publicate în volume de lucrări științifice și prezentate la conferințe: ***Sorgul zaharat, materie primă ideală pentru biogaz, alți combustibili și bioproduse***, prezentată de Teodor Vintilă, la Workshopul Internațional - Biogaz din deșeuri, organizat în 04.03.2015 la ENREG, Arad, România (<http://www.enreg-expo.com/115.html?&L=1>); ***Study on fermentation capacity of several microbial strains for bioethanol production from lactose***, autori Popa Nicolae, Skumpija Alen, Vintila Teodor, Gergen Iosif, prezentată la conferința: Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences, 24 – 28 June 2015, Lozenec, Bulgaria. ***Evaluation of fermentation parameters and yeasts selection for ethanol production from sweet sorghum juice***, autori Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Georgeta Pop, Iosif Gergen, Radu Șumălan în Romanian Biotechnological Letters Vol. 20, No. 6, 2015.

Lucrările de cercetare din cadrul acestui pachet de activități au fost efectuate cu ajutorul echipamentelor și materialelor existente în cadrul laboratorului și a celor achiziționate cu fonduri din grantul acordat acestui proiect, cum sunt: tulpini de microorganisme, medii de cultură, incubatoare, incubatoare cu agitare, bioreactoare, senzori de gaze, alcoyzer, spectrofotometru etc. De asemenea, au fost efectuate deplasări pentru participări la conferințe, salarii pentru personalul implicat în cadrul acestor activități.

### **3. Continuarea cercetărilor privind posibilitățile de stocare și pretratare a biomasei recoltate de sorg zaharat, cu scopul utilizării acesteia pentru producerea de energie regenerabilă și a altor biocompuși**

*Conservarea și extracția simultană a zaharurilor* din biomasa de sorg este un concept original, elaborat ca urmare a rezultatelor obținute în acest proiect și constă în însilozarea biomasei de sorg cu conținut de zaharuri prin aditivare cu compuși organici care inhibă dezvoltarea microorganismelor în masa însilozată și care realizează în același timp și extracția zaharurilor din biomasă în fază lichidă, obținându-se producții mult mai mari de zahăr per hectar suprafață agricolă în comparație cu extragerea sucului de sorg prin presare. Mai mult, biomasa de sorg recoltată la sfârșitul verii sau toamna se poate păstra și procesa tot timpul anului, ceea ce permite utilizarea de echipamente și instalații cu capacități de mult mai mici (și mai ieftine) în comparație cu tehnologia clasică prin care se impune procesarea întregii recolte de sorg într-un timp cât mai scurt pentru a nu se pierde zaharurile din biomasă. Studiile de conservare și extracția simultană s-au derulat pe o perioadă de 1 an, începând cu recoltarea biomasei în toamna anului 2014, conservarea acesteia din octombrie 2014, urmată de prelevarea de probe pe parcursul a 12 luni și analiza conținutului de zaharuri extrase prin presarea biomasei însilozate cu aditivi organici. Un alt aspect original urmărit în aceste studii îl reprezintă posibilitatea degradării complexului lignocelulozic pe parcursul conservării cu aditivi organici, ceea ce duce la eliminarea etapei de pretratare fizico-chimică a bagasei dinaintea hidrolizei enzimatică pentru obținerea glucidelor din biomasa lignocelulozică. Prin urmare, prin aplicarea acestui procedeu se pot realiza simultan trei procese principale: conservarea zaharurilor pe perioade lungi, extracția zaharurilor din țesuturile biomasei în faza lichidă și pretratarea complexului lignocelulozic pentru îmbunătățirea ratei de hidroliză enzimatică a celulozei la glucoză. La finele lunii

octombrie 2015 au fost analizate ultimele probe, iar în noiembrie 2015 s-a început elaborarea cererii de brevet de invenție, care se va depune la OSIM la finalul anului 2015 – începutul anului 2016. Urmărim transferul acestor rezultate în aplicație practică, pentru că dezvoltarea unor tehnologii industriale pe baza proceselor elaborate în cadrul acestor cercetări vor avea impact tehnologic, economic și social remarcabil.

Rezultatele obținute au fost publicate în volume de lucrări științifice și prezentate la conferințe:

1. ***Sugar extraction and saccharification of sweet sorghum biomass for biorefining***, autori: Vintila T., Sumalan R., Iosif G., Pop G., Kovacs K., publicată în Journal of Biotechnology, Volume 208, Supplement Issue ISSN 0168-1656 și prezentată la European Biotechnology Congress 2015, Bucharest.

2. ***Tracking the path of metals in the process of lignocellulosic ethanol production from polluted biomass***, autori Vintilă T., Sumalan R., Negrea P, Barbu C.H., Vintila D., Kovacs K., Book of Abstracts of the 6th European Bioremediation Conference, Chania, Crete, Greece, June 29-July 2, 2015, ISBN 978-960-8475-23-6.

3. ***Procesarea în cascadă a biomasei de sorg zaharat cu obținerea de biocombustibili de nouă generație***, prezentată de Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Adrian Trulea, la a VII-a Conferință Internațională: Bioenergia în România, în cadrul RENEXPO South-East Europe – București, România în 17 Noiembrie 2015

4. De asemenea, în octombrie 2015 a fost trimisă spre publicare lucrarea: ***Metal distribution in the process of lignocellulosic ethanol production from heavy metal contaminated sorghum biomass***, autori Teodor Vintila, Radu Sumalan, Adina Negrea, Horia Barbu, Kornel Kovacs, la *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (indexat pe web of science, factor de impact peste 2).

Lucrările de cercetare din cadrul acestui pachet de activități au fost efectuate cu ajutorul echipamentelor și materialelor existente în cadrul laboratorului și a celor achiziționate cu fonduri din grantul acordat acestui proiect. De asemenea, au fost efectuate deplasări pentru participări la conferințe, salarii pentru personalul implicat în cadrul acestor activități.

#### **4. Obținerea de acid lactic și alți biocompuși din suc de sorg**

Într-o primă etapă au fost testate 13 tulpini de bacterii lactice din colecția de microorganisme industriale a USAMVBT pentru capacitatea de producție de acid lactic în medii sintetice cu conținut ridicat de zaharuri (amestec de glucoză și zaharoză similar sucului de sorg). S-a analizat producția celor doi enantiomeri de acid lactic (formele D și L) și s-a făcut screeningul pentru producția de acid acetic, pentru selecția tulpinilor homofermentative de cele heterofermentative. Din tulpinile luate în lucru s-au selecționat 5 tulpini de bacterii lactice din genul *Lactobacillus* după mai multe criterii: tulpini care au prezentat randamente ridicate de conversie a glucidelor la acid lactic și s-au obținut concentrații ridicate de acid lactic, tulpini care au produs cu preponderență unul din cei doi izomeri optici, tulpini care au produs amestecuri racemice și tulpini homofermentative, pentru a elimina prezența acidului acetic în mediul de fermentație, care este un contaminant cu efecte negative în etapa de extracție și purificare a acidului lactic. În a doua etapă de cercetare s-a trecut la cultivarea bacteriilor lactice în suc de sorg pentru evaluarea capacității de producție de acid lactic din astfel de materii prime. Izomerul D al acidului lactic este folosit pentru obținerea de PLA cu greutate moleculară mare, iar izomerul L

al acidului lactic este folosit pentru obținerea de PLA cu greutate moleculară mică, ambele variante de polimeri fiind aplicați în obținerea de materiale plastice biodegradabile. Tot în cadrul acestui pachet de activități s-a solicitat și s-a obținut de la UEFISCDI aprobarea pentru construirea unei instalații cu gaze sub presiune pentru culturi microbiene anaerobe utilizând fondurile alocate acestui grant. Activitățile de cercetare au fost prezentate la două conferințe: ***Sorgul zaharat, materie primă ideală pentru biogaz, alți combustibili și bioproduse***, prezentată de Teodor Vintilă, la Workshopul Internațional - Biogaz din deșeuri, organizat în 04.03.2015 la ENREG, Arad, România (<http://www.enreg-expo.com/115.html?&L=1>) și ***Procesarea în cascadă a biomasei de sorg zaharat cu obținerea de biocombustibili de nouă generație***, prezentată de Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Adrian Trulea, la a VII-a Conferință Internațională: Bioenergia în România, în cadrul RENEXPO South-East Europe – București, România în 17 Noiembrie 2015.

În anul în curs s-a reușit achiziția unui sistem de fermentare cu bioreactoare multiple (15 bioreactoare), care va fi montat la instalația cu gaze sub presiune pentru culturi microbiene anaerobe, și care va fi folosit pentru derularea activităților planificate în următorul an în cadrul acestui proiect.