

Raport privind etapa ianuarie– noiembrie 2016

1. Obținerea de acid lactic și alți biocompuși din suc de sorg

Echipa proiectului a efectuat cercetări cu privire la cultivarea bacteriilor lactice folosind ca mediu de fermentație sucul de sorg în vederea producției de acid lactic. Tulpinile de bacterii lactice testate pentru producerea de acid lactic provin din Colecția de Microorganisme Industriale a USAMVB Timișoara (CMIT) și sunt următoarele: *Lactococcus lactis* CMGB 31, *Lactobacillus* sp. CMIT 1.45, *Lactobacillus pentosus* DSM 20314, *Lactobacillus acidophilus* CMIT 1.49, *Lactobacillus* sp CMIT 1.47, *Lactobacillus* sp CMIT 1.48, *Lactobacillus plantarum* CMIT 1.46, *Enterococcus faecium* CMIT 1.57, *Lactobacillus paracasei* CMIT 1.55, *Lactobacillus helveticus* CMIT 1.51, *Lactobacillus rhamnosus* CMIT 1.51, *Streptococcus faecalis* CMIT 1.61, *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*) CMIT 1.62. În prima etapă au fost cultivate pe medii specifice (MRS și GSY) modificate astfel încât să se obțină o compoziție de zaharuri similară cu cea găsită în sucul de sorg (glucoză, zaharoză și fructoză). În etapa următoare s-a testat obținerea acidului lactic prin fermentarea sucului obținut din tulpinile de sorg de pe culturile experimentale. Fermentația s-a realizat în condiții statice, la 37°C, 48 de ore. S-au prelevat probe la 0, 4, 8, 16, 24, 28, 36, 48 ore. Din probele recoltate s-a determinat concentrația de zaharuri reducătoare, glucoza, zaharoză, acidul lactic formele D și L și acidul acetic.

În urma rezultatelor obținute a devenit posibilă evaluarea capacității de producție de acid lactic din astfel de materii prime. Astfel, au fost obținute productivități de acid lactic cuprinse între 70 și 85% raportat la glucidele consumate. În funcție de procedeele aplicate pentru extracția zaharurilor din biomasa de sorg, s-au obținut soluții glucidice cu concentrații de zaharuri totale cuprinse între 14 și 24 %, ceea ce permite obținerea unor producții de acid lactic de 11-18 g / 100 ml suc sorg. Raportat la cantitatea totală de tulpini de sorg, se pot obține producții de acid lactic de până la 550 kg / tonă S.U. biomasă tulpini de sorg. Acidul lactic (izomerii D și L) este folosit pentru obținerea de PLA, ambele variante de izomeri fiind aplicați în obținerea de materiale plastice biodegradabile. Lactatul de calciu este un produs folosit în cantități mari în medicina umană și veterinară. O altă abordare este fermentarea anaerobă a glucidelor obținute prin hidroliza celulozei din bagasa de sorg cu ajutorul speciilor de *Clostridium* pentru obținerea de acetonă, etanol și butanol de generația a doua. Primele rezultate preliminare obținute de echipa proiectului cu privire la extracția zaharurilor din tulpinile de sorg, hidroliza celulozei din reziduuri și fermentarea acestor zaharuri au fost

trimise spre publicare: Teodor Vintila, Vasile Daniel Gherman, Nicolae Popa, Dumitru Popescu, Adina Negrea, Influence of Enzymatic Cocktails on Conversion of Agricultural Lignocellulose to Fermentable Sugars, Revista de Chimie, (I.F. 0,81) și prezentate la conferințe internaționale: Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Adrian Trulea, Iosif Gergen, Kornel Kovacs, Biorefinery of sweet sorghum to produce biogas and other biochemicals, Biogas Science 2016, 21-24 August 2016, Szeged, Ungaria; Mild alkaline pretreatment applied in the biorefinery of sorghum biomass for ethanol and biogas production, Agriculture for Life, Life for Agriculture, 9-11.06.2016, București; Sugar Production Potentials of Some Sweet Sorghum Hybrids Cultivated in Heavy Metals Polluted Soil, International Conference for Environmental and Agricultural Engineering, 14-16 august, Porto, Portugalia; Biorafinăria biomasei pentru obținere de biocombustibili și bioplastic, conferința Bioenergia în România din cadrul Expoziției RoEnergy, 20.10.2016, Timișoara, Biorefinery of sweet sorghum for a circular economy, First European Sorghum Congress, București 3-4 November 2016.

2. Îmbunătățirea bilanțului energetic prin procesarea în cascadă a sorgului pentru obținerea de biogaz

În acest pachet de lucru echipa de proiect a abordat procesul de biorafinare prin conectarea în cascadă a biotehnologiilor probate anterior folosind biomasa de sorg ca materie primă. În scopul de a maximiza producția de energie a materiei prime prelucrate, au fost examinate trei căi diferite de conversie:

1. Conversia biomasei nepretratate la biogaz prin digestia anaerobă;
2. Conversia biomasei pretratate biogazului prin digestie anaerobă;
3. Conversia biomasei pretratate la etanol, urmată de digestia anaerobă a reziduurilor rezultate după fermentarea alcoolică.

Biomasa produsă de trei hibrizi diferiți de sorg: *Sorghum bicolor x sudaneze* cv. Jumbo, originar din Australia, *Sorghum bicolor x sudaneze* Sugargraze II, originar din SUA și *Sorghum bicolor var. Saccharatum* cv. F135ST, originar din România, a fost folosită ca material biologic. Biomasa a fost uscată după recoltare și apoi măcinată folosind moara Retsch SM100 achiziționată cu fonduri oferite de acest grant. După măcinare, biomasa a fost supusă procesului de pretratare. Următorul pas al procesului a constat din hidroliza enzimatică a biomasei pretratate. Fermentația s-a efectuat cu *Saccharomyces cerevisiae* în flacoane de 500 ml echipate cu senzori de etanol și CO₂ de la Blue Sens - Germania. Digestia anaerobă a biomasei a fost efectuată conform cu standardul VDI 4630 (VDI, 2006) în sistem batch

utilizând sistemul AMPTS II care conține 15 fermentatoare (Bioprocess de control - Suedia) achiziționate cu fonduri oferite de acest grant. Rezultatele obținute arată diferențe importante în ceea ce privește producția de biogaz și de metan obținute în cazul digestiei anaerobe a biomasei nepretratate și pretratate. În ceea ce privește producția metan, pretratarea crește producțiile cu o medie de $61 \text{ l}_N / \text{kg}$ de substanță uscată organică, ceea ce se traduce prin creșterea cu 21% a cantității de metan. În fermentatoarele în care a fost realizată digestia anaerobă a reziduurilor rezultate după fermentația alcoolică a biomasei pretratate de sorg s-au obținut randamente mult mai mari. În toate loturile conținând reziduuri de la cele trei varietăți de sorg, producțiile de metan au fost în medie cu 49% mai mari decât în cazul loturilor cu biomasă nepretrată și cu 22% mai mare decât în cazul loturilor cu biomasă pretrată. Cu toate ca o parte din carbohidrații din biomasă au fost degradați și transformați în etanol în timpul procesului de fermentație, cele mai mari producții de biogaz și de metan au fost înregistrate în loturile conținând reziduuri de fermentație. Noi am identificat două motive care pot justifica obținerea acestor rezultate.

În primul rând, în timpul fermentației alcoolice a biomasei, drojdiile convertesc o parte din zaharurile solubile nu numai în etanol, care este extras prin distilare. În timpul procesului de creștere, drojdiile sintetizează proteine și alte biomolecule care apoi sunt utilizate ca substrat de microorganismele din faza de digestie anaerobă și transformate în biogaz.

Pe de altă parte, procesul de fermentație alcoolică poate fi considerată ca o etapă suplimentară de pretratare biologică a biomasei care slăbesc legăturile din complexul lignocelulozic, eliberându-se astfel o cantitate suplimentară de carbohidrați care poate fi convertită în etapa de digestie anaerobă. Dintre cele trei căi diferite de conversie studiate în acest pachet de lucru: (1) digestia anaerobă a biomasei nepretratate; (2) digestia anaerobă a biomasei pretratate; (3) digestia anaerobă a bagasei rezultate după fermentarea alcoolică a biomasei pretratate; cele mai mari producții s-au obținut prin a treia cale de conversie, prin înlănțuirea procesului de fermentație alcoolică cu cel de digestie anaerobă. Aceste rezultate demonstrează că procesarea integrată prin conectarea în cascadă a producției de bioetanol de a doua generație cu digestia anaerobă este cel mai eficient bioproces din punct de vedere al randamentelor energetice obținute din biomateriale ca biomasa de sorg.

Un aspect important al cercetărilor din acest proiect este realizarea de loturi experimentale de sorg zaharat pe soluri poluate cu metale grele, în zona Copșa-Mică, județul Sibiu. Scopul acestei cercetări nu doar fitoremedierea solurilor poluate, ci și exploatarea potențialului reprezentat de zonele poluate, în care produsele agricole nu sunt recomandate utilizării în scop alimentar sau furajer. Mai mult decât atât, am urmărit distribuția metalelor grele în diferitele

fracții, produse și subproduse generate pe parcursul biorafinării biomasei poluate cu metale grele. Sorgul obținut pe aceste soluri poate fi utilizat exclusiv pentru aplicații industrial, non-alimentare, cum ar fi producția de energie din surse regenerabile, în conformitate cu tehnologia descrisă în acest studiu.

Biomasa pretrată se hidrolizează folosind celulaze și fermentată la etanol cu *Saccharomyces cerevisiae*. Concentrația metalelor în faza solidă a mediului de hidroliză / fermentare a crescut, datorită solubilizării fracției principale a solidelor organice, iar o parte din metale (în special Zn a fost găsit în faza lichidă a mediului de fermentație). Cea mai mare parte a metalelor poluante au rămas în reziduul solid, o mică fracțiune din reziduul de distilare, iar urme de Pb și Cu au putut fi găsite în etanolul distilat. Reziduurile au fost supuse digestiei anaerobe pentru a se obține biogaz și digestat, care poate fi returnat pe aceleași terenuri poluate ca îngrășământ.

Extinderea acestui proces la nivel industrial poate fi o soluție utilă pentru a utiliza astfel de soluri pentru producerea de energie în loc de utilizare lor pentru producerea de alimente sau furaje poluate cu metale grele. Conversia biomasei în surse de energie ca etanolul și metanul poate fi realizată într-o biorafinărie plasată în interiorul zonei poluate / contaminate, astfel costurile de transport vor fi reduse. Foarte important, reziduul (digestatului) care conține metalele poluante pot fi distribuite pe aceleași terenuri poluate, evitând astfel răspândirea poluantului în alte zone, cum este cazul dispersiei cenușii bogate în metale grele rezultate din arderea biomasei obținute e astfel de soluri poluate. Rezultatele obținute în cadrul acestor cercetări au fost publicate sau sunt în curs de publicare în: Adrian Trulea, Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Georgeta Pop, Mild alkaline pretreatment applied in the biorefinery of sorghum biomass for ethanol and biogas production, *AgroLife Scientific Journal* accepted in Issue 2, December 2016 (journal indexed Thomson Reuters); Teodor Vintilă, Nicolae Popa, Adrian Trulea, Iosif Gergen, Kornel Kovacs, Biorefinery of sweet sorghum to produce biogas and other biochemicals, *Biogas Science* 2016, 21-24 August 2016, Szeged, Ungaria; Teodor Vintila, Adina Negrea, Horia Barbu, Radu Sumalan, Kornel Kovacs, Metal Distribution in the Process of Lignocellulosic Ethanol Production from Heavy Metal Contaminated Sorghum Biomass, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* Volume 91, Issue: 6, 2016, 1607-1614, IF: 2,349; Teodor Vintilă, Adrian N. Trulea, Nicolae Popa, Daniela Vintila, Georgeta Pop, Sugar Production Potentials of Some Sweet Sorghum Hybrids Cultivated in Heavy Metals Polluted Soil, *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, ISSN: 2301-3737 (online) accepted in volume V4N1 MAR. 2017.

3. Optimizarea întregului proces

În cadrul acestei activități, am abordat în mod integrat biorafinarea plantelor zaharoase abordând ca studiu de caz sorgul zaharat. Biorafinarea aplicată în acest proiect constă în conservarea zaharurilor prin însilozarea aditivată a biomasei proaspăt recoltată de sorg zaharat, extracția zaharurilor din biomasa însilozată, urmată de fermentarea zaharurilor cu obținere de etanol, hidroliza fără pretratare a lignocelulozei, obținerea de etanol din hidrolizatul celulozic, digestia anaerobă a reziduurilor de la fermentare și hidroliză cu obținere de biogaz și îngrășământ organic.

Ca urmare a studiilor efectuate în această etapă a proiectului a fost generat un proces original de biorafinare, supus brevetării, (*Cerere de brevet de invenție nr. A 00334 / 11.05.2016, Titlul invenției: Procedeu de biorafinare a plantelor zaharoase cu conservarea și extracția zaharurilor pentru obținerea de biocombustibili și alți biocompuși. Titular: USAMVB Timișoara. Cererea de brevet va fi publicată în: BOPI 11 / 2016, Noiembrie 2016*).

Procedeul original de biorafinare a plantelor zaharoase dezvoltat în cadrul acestui proiect asigură următoarele avantaje:

- Aditivul de conservare și agentul de extracție se recuperează din materialul însilozat și poate fi refolosit la următoarele extracții;
- În timpul conservării și extracției zaharurilor din biomasa de plante zaharoase, conservantul are și efect de pretratare a biomasei lignocelulozice, astfel încât nu este necesară o altă etapă de pretratare a biomasei lignocelulozice înainte de hidroliza enzimatică a celulozei pentru obținerea de zaharuri fermentescibile.
- Cantitatea de biogaz obținută din reziduurile de la fermentarea alcoolică a sorgului zaharat este mai mare decât cantitatea de biogaz obținută din sorgul zaharat nesupus fermentării alcoolice.
- Prin înlănțuirea celor trei procese principale: (1) fermentarea alcoolică a zaharurilor extrase din plantele zaharate, (2) hidroliza enzimatică și fermentarea bagasei rezultate după extracția zaharurilor și (3) digestia anaerobă a reziduurilor de la hidroliză și fermentare cu producere de biogaz, producția totală de energie este maximizată, iar la finalul procesului se obține îngrășământ organic.

După 6 luni de stocare a silozului de sorg în condițiile descrise, concentrația de zaharuri în lichidul recoltat din silozuri a urcat până la 150 mg/ml. Pe parcursul întregii perioade de 12 luni de stocare și extracție a zaharurilor, concentrația de zaharuri în suc s-a menținut la valori

aproximativ constante, la ultima recoltare la 12 luni s-a obținut o concentrație de 136 mg/ml. În ceea ce privește cantitatea de suc recoltată, aceasta poate să varieze în funcție de tipul de presă folosit și de forța de presare a biomasei. Un alt aspect, referitor la extracția sucului, acesta poate fi extras prin levigare, fără presare. Prin aceste extracții repetate, producția de zaharuri raportată la cantitatea de biomasă de sorg supusă extracției este mult sporită față de procedeul cu o singură extracție.

Prin hidroliza și fermentarea bagasei rezultate din extracția prin inundare repetată conform procedurii supus brevetării se obține o producție de 1000 litri / hectar. Această producție este mai mare decât producția de etanol obținută prin pretratarea alcalină și abur sub presiune urmată de hidroliza enzimatică a bagasei rezultat după fermentarea în substrat solid a sorgului. Acest rezultat aduce o noutate extrem de importantă, și anume: tratarea în timp de mai multe luni a biomasei lignocelulozice cu soluție de conservant are efect mai bun în ceea ce privește ameliorarea accesului enzimelor celulozolitice pentru hidroliza celulozei decât metodele clasice de pretratare fizico-chimice (hidroxid de sodiu și abur sub presiune). Acest aspect are un impact major în economia proceselor de biorafinare a biomasei vegetale, pentru că etapele de pretratare fizico-chimice sunt endergonice și poluante. Cu alte cuvinte, tratarea biomasei de plante zaharoase conform procedurii supus brevetării are triplu efect: (1) de conservare a zaharurilor, (2) de extracție a zaharurilor și (3) de eliberare a celulozei din complexul lignocelulozic, facilitând accesul enzimelor celulozolitice pentru hidroliza celulozei la glucoză.

Biotehnologia inovativă dezvoltată de echipa de proiect permite procesarea biomasei de plante zaharoase (în special sorg zaharat) pe tot timpul anului, și nu doar în perioada imediat următoare recoltării (pentru că zaharurile se pierd în timp), așa cum se face în tehnologiile aplicate în prezent. De asemenea, se obține etanol din zaharurile extrase, etanol din celuloză și biogaz din resturile de la fermentare și hidroliză fără a se aplica metode fizice sau chimice de pretratare a biomasei lignocelulozice.

Asistent Manager Proiect,
S.I. Dr. ing. Vintilă Teodor

