

BIOTEHNOLOGIE DE CONVERSIE A DESEURILOR VITI-VINICOLE SUB FORMA DE BIOMASA PROTEICA DE UZ ALIMENTAR SI FURAJER

BIOTECHNOLOGY OF VINEYARD AND WINERY WASTE CONVERSION INTO PROTEIN BIOMASS FOR FOOD AND FEED

M. PETRE¹, AI. TEODORESCU¹, VI. GHEORDUNESCU²

¹National Research & Development Institute of Biotechnology in Horticulture - Stefanesti - Arges, 37 Sos. Bucuresti - Pitesti, Arges County, 117715, Romania

²Biochemistry Institute of Romanian Academy, 296 Spl. Independentei, sect. 6, Bucharest, Romania

Abstract: *The present work reports on the main results carried out to study the biodegradation and bioconversion of cellulose wastes from vineyards and wine-producing industry into food protein (FP) and protein-rich feed (PRF) by using continuous cultures of edible fungi. The main aim of this study was to establish the optimal culture conditions for continuous fungal development in order to improve the enzymatic degradation and conversion of vineyards and wine industry wastes into protein biomass that could be used as food protein through body fruit producing as well as feed supplements by the final culture composts. During the experiments there were tested three strains of the cellulolytic fungal species *Pleurotus ostreatus* and two strains of *Lentinus edodes* species. All these fungal strains were used in pairs as well as separately, as samples, to compare the efficiency of their biological potential in biodegradation and bioconversion of vineyard and wine industry wastes into FP and PRF*

Preocupările privind utilizarea materialelor vegetale lignocelulozice ca o potențială sursă de producere a proteinelor, de uz alimentar, *food-protein (FP)* sau furajer, *protein-rich feed (PRF)*, a captat atenția specialiștilor din domeniu încă din anii '70 - '80, pentru a satisface necesitățile crescânde de proteine și noi alimente, prin aplicarea metodelor neconvenționale, concomitent cu reciclarea unor constituenți vegetali fără valoare economică (Carlile și Watkinson, 1996; Zarnea, 1994; Verstraete și Top, 1992).

Scopul principal al acestei lucrări este acela de a prezenta succint principalele rezultate ale experimentelor efectuate în vederea stabilirii biotehnologiei optime de cultivare a unor specii de ciuperci comestibile pentru intensificarea activității enzimatică de biodegradare și bioconversie a deșeurilor viti-vinicole sub formă de biomasă proteică de uz alimentar și furajer.

MATERIALE ȘI METODĂ

Pentru efectuarea protocolului de lucru s-au întrebuițat:

- culturi pure din speciile de Basidiomycete: *Pleurotus ostreatus*, sușele P.o. 14, P.o. 23 și P.o. 43, și respectiv, *Lentinus edodes*, sușele L.e. 07 și L.e. 15, din colecția INCDDBH - Ștefănești - Argeș;

- vase de cultivare cilindrice de 50 și 500 ml;
- baloane Erlenmeyer de 500 și 750 ml;
- medii de cultivare pe suport agarizat, cu malț extract și peptonă;
- cameră de cultivare cu termostat și aport intermitent de aer steril;
- incubator cu temperatură programabilă;
- autoclavă pentru termosterilizarea umedă a mediilor de cultivare.

Aceste experiențe au fost efectuate utilizând sistemul de cultivare a speciilor de ciuperci din Clasa Basidiomycetes, în fază staționară, de suprafață (Petre, 2002).

Clasa *Basidiomycetes* constituie cea mai evoluată unitate taxonomică, din cadrul Filumului *Fungi*, speciile care o compun având un miceliu bine dezvoltat și înmulțire sexuată prin basidiospori (Wainwright, 1992).

În experimentele efectuate pentru elaborarea unei biotehnologii de conversie enzimatică a deșeurilor, preponderent celulozice, rezultate din prelucrarea agro-industrială a strugurilor, precum și din viticultură, au fost utilizate două specii de macromicete comestibile: *Pleurotus ostreatus* și *Lentinus edodes*.

Speciile din genul *Pleurotus* (*Basidiomycota*, *Basidiomycetes*, *Holobasidiomycetidae*, *Poriales*, *Lentinaceae*) se caracterizează prin prezența unor hife de septum de tip dolipor și parentezomi, precum și cu bazidiospori care formează, în mod direct, un miceliu și o bazidie clavată, cilindrică, uniformă sau radiară, fără septare internă, în timp ce speciile aparținând genului *Lentinus* (*Basidiomycota*, *Basidiomycetes*, *Holobasidiomycetidae*, *Poriales*, *Lentinaceae*) prezintă miceliul preponderent rizomorf, uneori linear, care formează o bazidie subțire și elastică, cu marginea involută și posedă spori de culoare albă sau crem, cu aspect neted și de formă cilindrică (Vournakis și Runstadler, 1989).

Pentru întreținerea și conservarea culturilor pure a fost utilizat mediul agarizat cu extract de malț, tip Difco (Zarnea și colab., 1992). Drept sursă de carbon pentru cultivarea experimentală a celor două specii de ciuperci s-au utilizat deșeuri celulozice rezultate la prelucrarea agro-industrială a viței de vie și a strugurilor, care au fost pretratate mecanic, în două etape, de mărunțire și, respectiv, de măcinare. Apoi, s-a aplicat tratamentul termic de sterilizare cu aburi sub presiune, la 1,1 atm. și temperatura de 121°C, timp de 60 min (Chahal, 1994; Chahal și Hachey, 1990).

Cultivarea propriu-zisă a acestor specii de ciuperci a fost realizată într-o cameră de creștere, în condiții relativ constante, respectiv, la temperatura de 23 - 25°C, pH 5,5 - 5,7 și umiditatea relativă de 80 - 85%, cu un aport intermitent de aer steril (Chahal și Moo-Young, 1981). Incinta de cultivare a fost conectată o pompă de aer, prevăzută cu filtre Millipore (ϕ 45 μ m). În prima etapă, după un interval de timp, cuprins între 15 - 17 zile, în condiții de cultivare în sistem de suprafață, s-a obținut o biomasă compactă, de culoare albă, având o aromă, specifică acestor specii de macromicete cultivate, iar în etapa următoare, timp de 20 - 30 de zile, s-a desfășurat procesul de formare a corpurilor fructifere (Petre și Petre, 2003).

Acest protocol de lucru a fost aplicat în trei serii ale ciclurilor de cultivare, pentru fiecare specie de fungi, rezultatele fiind reprezentate de media datelor înregistrate în aceste repetiții \pm abaterea standard corespunzătoare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La încheierea ciclurilor de cultivare în sistem de suprafață a speciilor *Pleurotus ostreatus* și *Lentinus edodes* a fost analizată cantitativ concentrația de azot total din biomasa fungică obținută, utilizând metoda Kjeldhal, determinându-se astfel, în mod indirect, evoluția conținutului proteic al biomasei rezultate (Petre și colab., 2001). Conform datelor obținute, s-a constatat o variație a conținutului în

azot proteic, calculat în funcție de concentrația în substanță uscată a substratului celulozic (Fig. 1 și 2).

Fig. 1. Variația cantității de azot total a biomasei de *Pleurotus ostreatus*, în culturi de suprafață

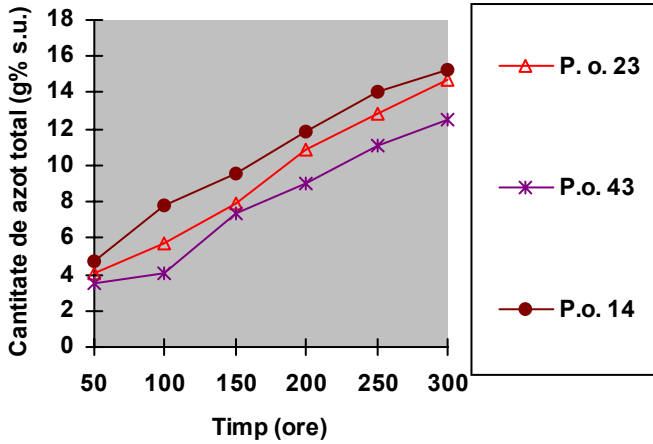
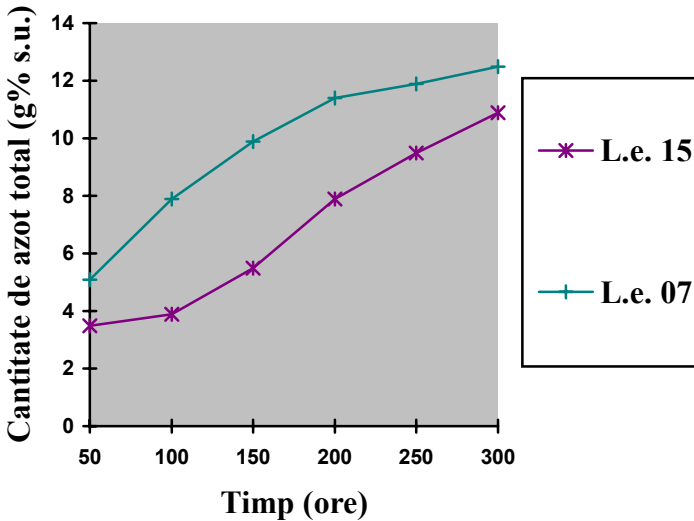


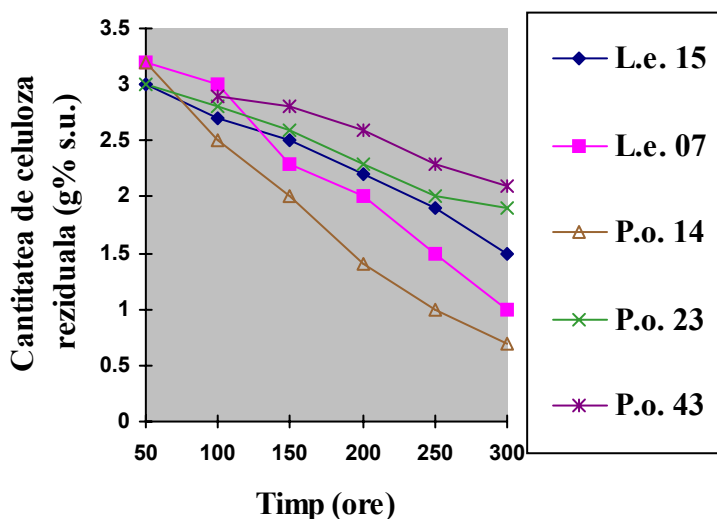
Fig. 2. Variația cantității de azot total a biomasei de *Lentinus edodes*, în culturi de suprafață



Pentru fiecare dintre ciclurile de cultivare ale celor două specii de ciuperci comestibile s-au efectuat analize chimice ale compoziției mediului de cultivare, privind determinarea conținutului de celuloză, utilizând metoda cântării directe a probelor de substrat, prelevate din mediul de cultivare, fapt ce a permis evaluarea ratei de degradare a celulozei în cursul desfășurării acestor cicluri de cultivare. Rezultatele acestor determinări sunt prezentate în figura 3.

Analizând aceste date se poate aprecia că variantele de cultivare a sușelor P.o. 14 și L.e. 07 asigură un randament de degradare a celulozei, mai mare cu 20 - 30%, comparativ cu celelalte trei variante, reprezentate de sușele L.e. 15, P.o. 23 și P.o. 43, a căror activitate de degradare a celulozei este, semnificativ, mai scăzută.

Fig. 3. Rata de degradare a celulozei, în culturi de *Pleurotus ostreatus* și *Lentinus edodes*



Având în vedere faptul că evoluția culturilor aparținând celor două specii de ciuperci, *P. ostreatus* și *L. edodes*, respectiv, sușele, *P. o. 14* și *L. e. 07*, a înregistrat cele mai bune rezultate privind biodegradarea și bioconversia deșeurilor rezultate din prelucrarea agro-industrială a viței de vie și a tescovinei obținute din procesele de vinificație, s-a procedat la cultivarea acestor două sușe pe substraturi constituite din aceleași tipuri de deșeuri viti-vinicole, respectiv, corzi de viță de vie (varianta 1) și tescovină (varianta 2), pe parcursul unor perioade de timp cuprinse între 20 și 30 de zile. Rezultatele acestor experimente, în cursul cărora s-a studiat influența volumului de inoculum asupra cantității finale de corpi fructifere formate, sunt redată în tabelele 1 și 2. Rezultatele prezentate constituie media datelor înregistrate în cursul a trei repetiții ± abaterea standard.

Tablelul 1.

Influența volumului de inoculum asupra formării corpurilor fructifere ale sușelor P.o. 14 și L.e.07, pe substraturi constituite din corzi de viță de vie (varianta 1)

Volumul de inoculum (v/w)	Cantitatea finală de corpuri fructifere (g /kg substratum)	
	P. o. 14	L. e. 07
7.0	254.23±0.12	215±0.20
6.5	275.28±0.15	278±0.23
6.0	343.53±0.15	397±0.07
5.5	383.49±0.12	335±0.03
5.0	255.95±0.23	295±0.15

Tablelul 2.

Influența volumului de inoculum asupra formării corpurilor fructifere ale sușelor P.o. 14 și L.e. 07, pe substraturi constituite din tescovină (varianta 2)

Volumul de inoculum (v/w)	Cantitatea finală de corpuri fructifere (g /kg substratum)	
	P. o. 14	L. e. 07
7.0	279.23±0.14	283±0.07
6.5	297.28±0.10	315±0.03
6.0	381.53±0.09	397±0.15
5.5	395.49±0.15	355±0.23
5.0	275.95±0.21	305±0.10

Conform acestor rezultate preliminare, schema biotehnologică de producere a biomasei proteice de uz alimentar și furajer, prin cultivarea unor specii de ciuperci comestibile pe substraturi constituite din deșeuri viti-vinicole este prezentată în figura 4.

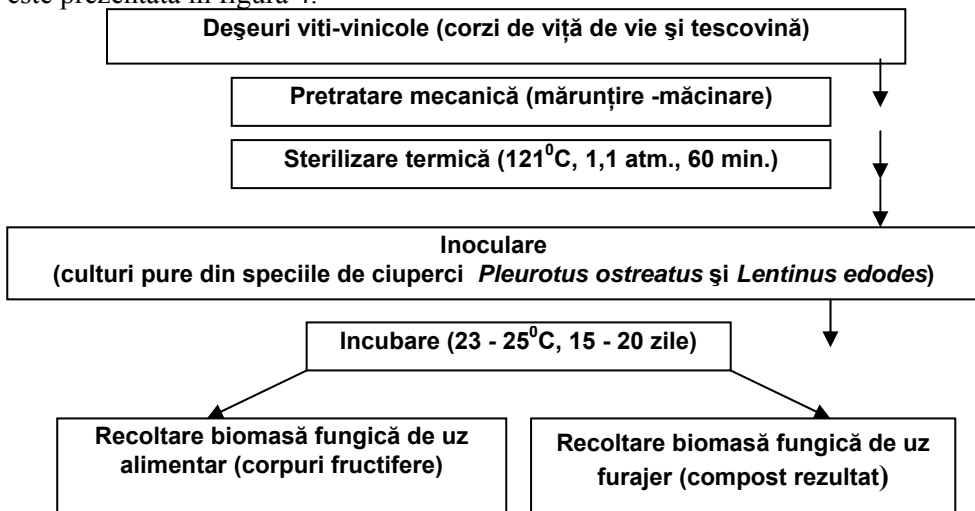


Fig. 4 - Schema biotehnologiei de producere a biomasei proteice din deșeuri viti-vinicole, prin cultivarea unor specii de ciuperci comestibile

CONCLUZII

1. Materialele vegetale reziduale, reprezentate de corzile de viță de vie și de tescovina rezultată din vinificație, au fost utilizate ca substraturi de creștere pentru speciile de bazidiomicete *Pleurotus ostreatus* și *Lentinus edodes*, obținându-se o biomasă fungică cu un conținut ridicat de proteine, atât sub formă de corpuri fructifere pentru uz alimentar, cât și sub forma composturilor post-cultură, utilizabile ca suplimente proteice furajere. Cultivarea propriu-zisă a acestor specii de ciuperci a fost realizată într-o cameră de creștere, special amenajată, în condiții relativ constante, respectiv la temperatura de 23 - 25⁰C, pH 5,5 - 5,7 și umiditatea relativă de 80 - 85%, cu un aport intermitent de aer steril.

2. Analizând datele înregistrate în cursul experimentelor de cultivare, se poate aprecia că variantele de cultivare a sușelor P.o. 14 și L.e. 07 asigură un randament de degradare a celulozei, mai mare cu 20 - 30%, comparativ cu celelalte trei variante, reprezentate de sușele L.e. 15, P.o. 23 și P.o. 43, a căror activitate de degradare a celulozei este, semnificativ, mai scăzută.

3. Rezultatele preliminare obținute au permis elaborarea schemei biotehnologice de producere a biomasei proteice de uz alimentar și furajer din deșeuri viti-vinicole, prin cultivarea intensivă a unor specii de ciuperci comestibile

BIBLIOGRAFIE

1. Carlile, M.J. and Watkinson, S.C. 1996. *Fungi and Biotechnology*. In: Carlile, M.J and Watkinson, S.C. (Eds), *The Fungi*. Academic Press: London, pp. 373 - 409
2. Chahal, D.S. 1994. *Biological disposal of lignocellulosic wastes and alleviation of their toxic effluents*. In: Chaudry, G.R. (ed.), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Chapman & Hall, London, pp. 364 - 385
3. Chahal, D.S. and Hachey, J.M. 1990. *Use of hemicellulose and cellulose system and degradation of lignin by Pleurotus sajor-caju grown on corn stalks*. *Am. Chem. Soc. Symp.*, **433**:304 - 310.
4. Chahal, D.S. and Moo-Young, M. 1981. *Bioconversion of lignocellulosics into animal feed*. *Devel. Ind. Microbiol.*, **22**:143 - 159.
5. Petre, M., Borduz, L., 2003. *Ciupercile medicinale utilizate în profilaxia și terapia bolilor umane grave*. Ed. Printech, București, 64 pagini (ISBN: 973-652-758-1)
6. Petre, M., 2002. *Biotehnologii pentru degradarea și conversia microbiană a constituenților vegetali*. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 203 pagini (ISBN: 973-30-2295-0)
7. Petre, M., Zarnea, G., Adrian, P., Gheorghiu, E. and Sularia, M. 2001. *Biocontrol of cellulose waste pollution by using immobilized filamentous fungi*. In: *Environmental Monitoring and Biodiagnostics of Hazardous Contaminants* (Healy, M., Wise, D.L., Moo-Young, M, eds), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 227-241
8. Verstraete, W. and Top, E. 1992. *Holistic Environmental Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, p. 1- 18.
9. Vournakis, J.N. and Runstadler, P.W. 1989. *Microenvironment: the key to improve cell culture products*. *Biotechnology*, **7**:143- 145.
10. Wainwright, M. 1992. *An Introduction to Fungal Biotechnology*. Wiley-Chichester, p. 55-60
11. Zarnea, G. 1994. *Bazele teoretice ale ecologiei microorganismelor*. În: *Tratat de microbiologie*, Ed. Academiei Române, București, vol. 5, p. 154 - 163.
12. Zarnea, G., Mihăescu, Gr., Velehorsch, V. 1992. *Principii și tehnici de microbiologie generală*, vol. 1, Univ. București, p. 141- 150.