

CZU: 663.12 + 579.66

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4980564>

## ACTIVITATEA ENZIMATICĂ A UNOR EXTRACTE DIN BIOMASA LEVURILOR DEȘEURILOR INDUSTRIEI DE BERE

*Nadejda EFREMOVA, Oleg CHISELIȚA, Natalia CHISELIȚA,  
Alina BEȘLIU, Elena TOFAN, Ana LOZAN, Marina DANILIȘ*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie*

În articol sunt prezentate rezultatele cercetării eficienței a 6 metode diferite de autoliză a biomasei levurilor de bere și a activității catalazei (CAT) și superoxidismutazei (SOD) din extractele de diferită natură obținute din ea. Activitatea CAT și SOD a fost studiată în extractele aminoacido-proteice, manoproteice și  $\beta$ -glucanice. Conform rezultatelor obținute, factorii de bază, care condiționează obținerea extractelor cu activitate CAT și SOD maximală, sunt pH-ul și temperatura, utilizate la autoliză. Pentru obținerea extractelor de diferită natură cu activitate CAT și SOD înaltă, este oportună utilizarea la etapa inițială de prelucrare a biomasei de levuri (autoliză) a tamponului fosfat de sodiu (pH-7,8) și a temperaturii +45°C. Extractele proteice, obținute din biomasa de levuri din deșeurile industriei de bere, caracterizate prin activitate CAT și SOD înaltă, posedă potențial înalt de utilizare în industria alimentară, farmaceutică și în sectorul zootehnic.

**Cuvinte-cheie:** *Saccharomyces cerevisiae*, levuri de bere, autoliză, extract din levuri, catalază, superoxidismutază.

### ENZYMATIC ACTIVITY OF SOME YEAST BIOMASS EXTRACTS FROM THE BEER INDUSTRY WASTE

The article presents the research results of the efficiency of six different methods of autolysis of brewer's yeast biomass and the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) of different nature extracts, obtained from it. CAT and SOD activities have been studied in amino acid protein, mannoprotein and  $\beta$ -glucan extracts. According to the obtained results, the basis factors that condition the obtaining of extracts with maximum CAT and SOD activities are pH and temperature used in autolysis. To obtain extracts of different nature with high CAT and SOD activities, it is opportune to use sodium phosphate buffer (pH-7,8) and the temperature of +45°C at the initial stage of processing yeast biomass (autolysis). The protein extracts obtained from waste yeast biomass from the beer industry, characterised by high CAT and SOD activities, have a high potential for use in the food, pharmaceutical industries and livestock sectors.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, brewer's yeast, autolysis, yeast extract, catalase, superoxide dismutase.

### Introducere

În ultimii ani, cercetările ce țin de obținerea și utilizarea extractelor naturale cu proprietăți antioxidante devin tot mai actuale [1]. Studiul diferitor microorganisme în calitate de sursă de preparate antioxidante este o direcție importantă în domeniul biotehnologiei microbiene. Levurile din genul *Saccharomyces sp.* sunt considerate și pot servi ca sursă importantă de enzime antioxidante [2-3]. Un rol important în distrugerea radicalilor liberi revine aminoacizilor și enzimelor: superoxidismutaza (SOD) și catalaza (CAT) [4-6]. Actualmente, interes sporit prezintă utilizarea deșeurilor industriei de bere, în special a biomasei de levuri, în calitate de sursă importantă de aminoacizi și enzime cu efect antioxidant. Relevanța cercetărilor este determinată de spectrul larg de aplicare a extractelor proteice obținute din biomasa levurilor de bere, datorită valorii nutritive, activității biologice și antioxidante înalte a acestor extracte.

Utilizarea biomasei de levuri din deșeurile industriei de bere, ca materie primă pentru producerea extractelor proteice și enzimatic, poate soluționa problema deficitului produselor naturale autohtone cu eficacitate înaltă și sinecost rezonabil și, de asemenea, poate contribui la reducerea impactului negativ al deșeurilor asupra mediului. Extractele aminoacido-proteice cu proprietăți antioxidante, obținute din levurile de bere, prezintă interes deosebit prin faptul că pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică pentru obținerea produselor naturale, precum și a bioaditivelor pentru hrana animalelor. Utilizarea extractelor proteice cu conținut sporit de aminoacizi și enzime antioxidante poate soluționa multe probleme din sectorul zootehnic al țării, care se confruntă cu deficit permanent de furaje de calitate cu conținut echilibrat de substanțe biologice active.

Astfel, levurile și diferite extracte în baza acestora sunt un ingredient valoros pentru ameliorarea rațiilor furajere ale animalelor [7]. Extractele proteice cu activitate biologic înaltă din levuri prezintă interes ca factor de creștere a animalelor și de reducere a morbidității; de asemenea, pot fi folosite ca aditivi în tratamentul și profilaxia dereglărilor legate de insuficiența proteinelor și vitaminelor în rația de bază a animalelor și a păsărilor de fermă.

Deoarece celulele levuriene posedă perete celular rigid și rezistent la acțiunea diferitor fermenți, inclusiv digestivi, utilizarea biomasei și obținerea biopreparatelor în baza ei deseori este limitată. În acest sens, distrugerea pereților celulari levurieni are prioritate pentru utilizarea eficientă a biomasei și obținerea extractelor biologic active. Actualmente sunt cunoscute diverse metode eficiente de autoliză și distrugere a pereților celulari levurieni, bazate pe utilizarea enzimelor, ultrasunetului, distrugerii mecanice (omogenizare), utilizate fiecare în parte sau în diferite combinații, dar care până la urmă sunt destul de costisitoare și necesită utilaj special. Din aceste considerente, **scopul** acestor cercetări constă în selectarea metodei optime de autoliză a biomasei de levuri pentru obținerea extractelor proteice cu activitate SOD și CAT maximală.

### Material și metode

Ca material de cercetare a fost utilizată biomasa de levuri (*Saccharomyces cerevisiae*) de fermentare inferioară din deșeurile industriei de bere, oferite de fabrica de bere Kellers (Budești).

#### Metodele de realizare a cercetărilor

Pentru optimizarea condițiilor de autoliză a biomasei au fost cercetate șase variante diferite de distrugere a pereților celulari. La fiecare variantă s-a folosit ca material de lucru 30 g de biomasă de levuri de bere decongelate, care a fost supusă diferitor condiții de autoliză. Aceasta s-a efectuat în colbe Erlenmayer, cu volum de 250 ml, în care s-a introdus cantitatea menționată de biomasă și diferite soluții în volum de 30 ml (raport 1:1). Suspensiile au fost termostatate la temperatura de 37,45 și 55°C timp de 8 ore.

Au fost cercetate următoarele variante:

**Varianta 1 (martor).** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml apă distilată (în raport 1:1), se adaugă acid acetic glacial în recalcul de 3 ml de acid la 1L de suspensie. Suspensia obținută se supune autolizei la +55°C timp de 8 ore, cu agitare periodică [8].

**Varianta 2.** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml apă distilată (în raport 1:1), se adaugă acid acetic glacial în recalcul de 3 ml de acid la 1L de suspensie. Suspensia obținută se supune autolizei la +37°C timp de 8 ore, cu agitare periodică.

**Varianta 3.** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml soluție tampon fosfat de sodiu, pH – 7,8 (în raport 1:1). Suspensia obținută se supune autolizei la +37°C timp de 8 ore, cu agitare periodică.

**Varianta 4.** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml apă distilată (în raport 1:1), se adaugă acid acetic glacial în recalcul de 3 ml de acid la 1L de suspensie. Suspensia obținută se supune autolizei la +45°C timp de 8 ore, cu agitare periodică.

**Varianta 5.** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml soluție tampon fosfat de sodiu, pH – 7,8 (în raport 1:1). Suspensia obținută se supune autolizei la +45°C timp de 8 ore, cu agitare periodică.

**Varianta 6.** Biomasa de levuri de bere decongelate (30 g) se amestecă cu 30 ml apă potabilă (în raport 1:1), se adaugă acid acetic glacial în recalcul de 3 ml de acid la 1L de suspensie. Suspensia obținută se supune autolizei la +37°C timp de 8 ore, cu agitare periodică.

**Activitatea catalazei (CAT)** s-a determinat cu utilizarea metodei spectrofotometrice, care se bazează pe capacitatea peroxidului de hidrogen de a interacționa cu molibdatul de amoniu, formând un complex colorat stabil [9,10].

**Activitatea superoxidismutazei (SOD)** s-a stabilit cu utilizarea metodei spectrofotometrice, care se bazează pe capacitatea anionului superoxid de a reduce sarea de tetrazoliu-nitroblue în prezența tetrametiletildiaminei și riboflavinei până la un compus stabil, insolubil de tip formazan [11].

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată utilizând setul de programe MO Excel și Statistica 9.0. Rezultatele au fost exprimate prin calcularea mediei, deviației standard și a intervalului de încredere pentru o medie a trei repetări. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru  $P \leq 0,05$ .

### Rezultate și discuții

În prezent, levurile sunt pe larg utilizate pentru producerea pe scară industrială a proteinei, enzimelor (invertaza, dehidrogenaza) etc. [12]. Un obiect biotehnologic de mare perspectivă îl reprezintă levurile din genul *Saccharomyces*, fiind considerate o sursă valoroasă de antioxidanți, precum și de superoxidismutază și catalază. Levurile dețin avantaje semnificative față de alte surse de enzime antioxidante: viteză înaltă de creștere, ciclul scurt de producere (2-3 zile), prețul relativ mic al componentelor mediilor nutritive, prezența a două tipuri de SOD (Cu/ZnSOD și MnSOD). SOD reprezintă o metaloenzimă și este regulatorul principal al

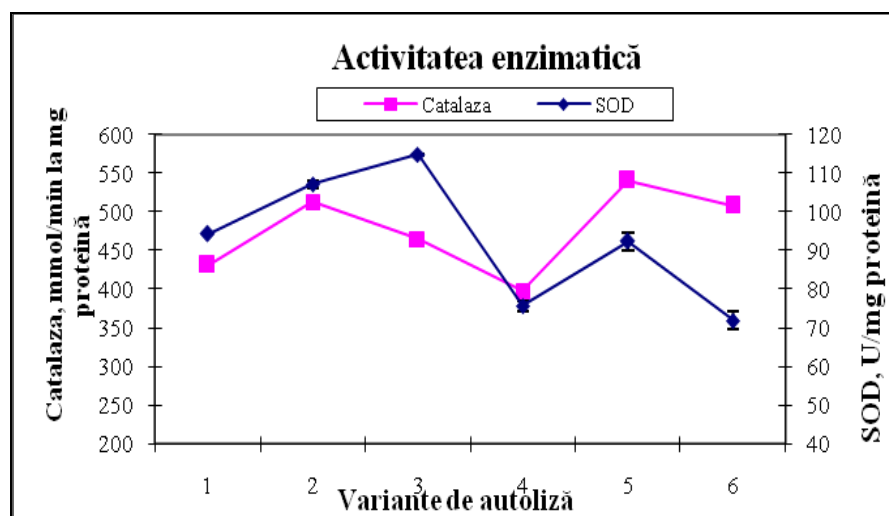
proceselor de oxidare în celulă. Această enzimă catalizează reacția de recombinație a radicalilor  $O_2^-$  cu formarea peroxidului de hidrogen și a oxigenului triplet [13]. Catalaza acționează în conversia peroxidului de hidrogen care este un agent oxidant puternic, cu caracter toxic pentru celule. Aceste două enzime sunt principalele enzime antioxidante ale levurilor, iar după valorile activității lor se poate judeca despre statutul oxidativ al biomasei de levuri și al produselor obținute în baza acesteia, implicit despre calitatea și inofensivitatea lor.

Inițial, biomasa de levuri de bere a fost supusă autolizei conform variantelor experimentale sus-menționate. Din fiecare variantă experimentală și din varianta martor au fost obținute consecutiv trei extracte: hidric (fracția aminoacido-proteică), alcalin (fracția manoproteică) și insolubil în alcalii și acizi (fracția  $\beta$ -glucanică).

Extractul hidric (fracția aminoacido-proteică) a fost obținut prin separarea fazei lichide de cea solidă (biomasa), prin centrifugare la 3500 rot./min timp de 15 minute, imediat după autoliză. Extractul alcalin (fracția manoproteică) a fost obținut în continuare prin tratarea biomasei restante cu soluție 1N NaOH (pH-12), raport (1:5), la temperatura de  $80 \pm 5^\circ C$ , timp de 2 ore. Extractul alcalin a fost recuperat prin centrifugare la 3500 rot./min. timp de 15 minute. Extractul insolubil în alcalii și acizi (fracția  $\beta$ -glucanică) a fost obținut din biomasa restantă de la extracția alcalină, prin tratarea acesteia cu acid acetic 0,5N (raport 1:5), la temperatura de  $75 \pm 5^\circ C$  timp de 1 oră. Fracția  $\beta$ -glucanică a fost recuperată prin centrifugare la 3500 rot./min timp de 15 minute. Sedimentul a fost spălat de 3 ori cu apă distilată și uscat la temperatura de  $50 \pm 5^\circ C$ .

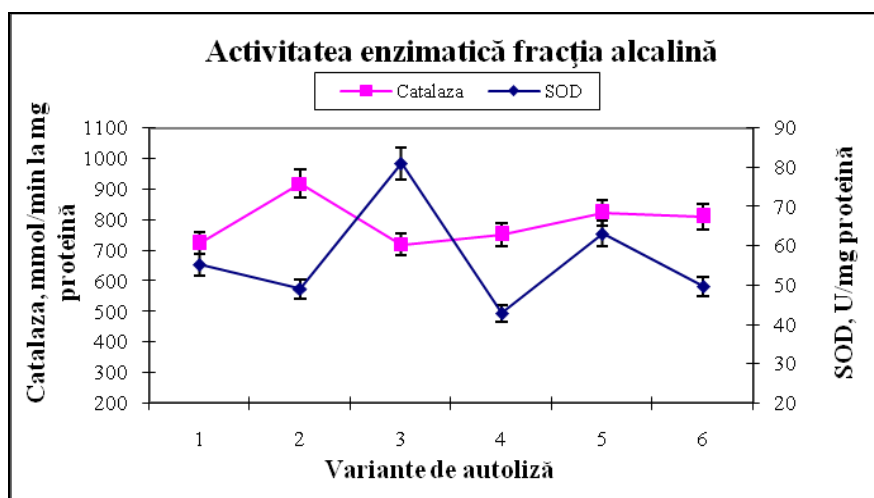
În toate extractele obținute a fost determinată activitatea enzimelor antioxidante CAT și SOD.

În rezultatul cercetărilor s-a stabilit că activitatea CAT în fracțiile aminoacido-proteice variază între  $397,7 \pm 1,65$  și  $540,2 \pm 2,66$  mmol/min per mg de proteină, valoare maximă înregistrându-se în varianta 5, la utilizarea tamponului fosfat de sodiu și a temperaturii de  $+45^\circ C$ . Activitatea SOD în aceste fracții variază la nivel de  $71,9 \pm 2,19$  –  $114,7 \pm 0,10$  U/mg proteină cu valoare maximă în varianta III, în care ca factor de inducție a autolizei a servit același tampon fosfat de sodiu și temperatura  $+37^\circ C$  (Fig.1).



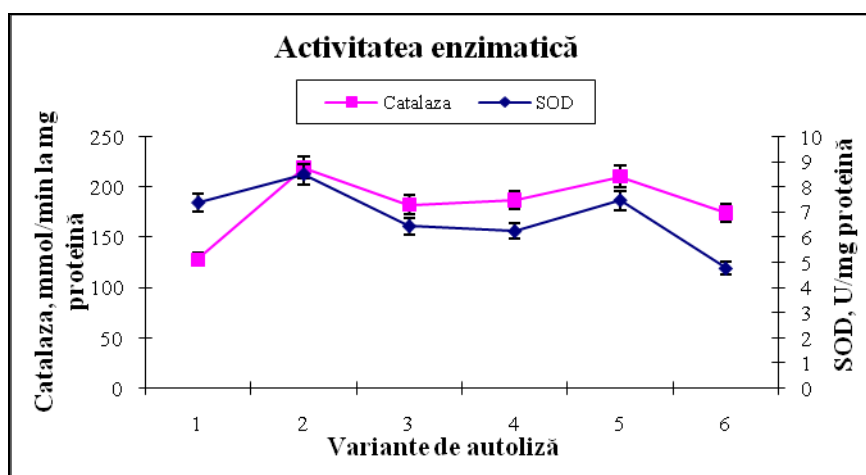
**Fig.1.** Activitatea CAT și SOD în extractele hidrice (aminoacido-proteice) obținute din biomasa de levuri de bere la utilizarea diferitor metode de autoliză: 1 –  $+55^\circ C$  +  $H_2O$  dist. + acid acetic; 2 –  $+37^\circ C$  +  $H_2O$  dist. + acid acetic; 3 –  $+37^\circ C$  + tampon fosfat de sodiu; 4 –  $+45^\circ C$  +  $H_2O$  dist. + acid acetic; 5 –  $+45^\circ C$  + tampon fosfat de sodiu; 6 –  $+37^\circ C$  +  $H_2O$  robinet + acid acetic.

În continuare a fost evaluată activitatea CAT și SOD în extractele alcaline (fracția manoproteică). Astfel, rezultatele obținute denotă că în varianta 1 (martor) activitatea CAT a constituit  $721 \pm 4,0$  mmol/min la mg proteină, iar activitatea SOD –  $55,14 \pm 0,09$  U/mg/proteină. Sporirea activității ambelor enzime concomitent s-a constatat în variantele experimentale obținute prin metoda de autoliză a biomasei cu utilizarea tamponului fosfat de sodiu la temperatura de  $+45^\circ C$ . Activitatea CAT în probele cu tampon fosfat de sodiu constituie  $718 \pm 2,94$  –  $822 \pm 5,0$  mmol/min la mg proteină, iar activitatea SOD constituie  $63,06 \pm 0,27$  –  $80,96 \pm 2,29$  U/ mg proteină (Fig.2). Activitate maximă a CAT a fost stabilită în varianta a doua –  $916,5 \pm 3,5$  mmol/min la mg proteină, însă activitatea SOD în acest caz a fost joasă și a constituit  $49,0 \pm 1,4$  U/mg proteină. În celelalte variante, unde a fost utilizat acidul acetic, activitatea enzimelor diferă nesemnificativ de proba martor sau este mai mică comparativ cu valoarea de referință.



**Fig.2.** Activitatea CAT și SOD în extractele alcaline (manoproteice) obținute din biomasa de levuri de bere după autoliză prin diferite metode: 1 – +55°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 2 – +37°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 3 – +37°C + tampon fosfat de sodiu; 4 – +45°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 5 – +45°C + tampon fosfat de sodiu; 6 – +37°C + H<sub>2</sub>O robinet + acid acetic.

La etapa următoare s-a evaluat activitatea enzimatică CAT și SOD în fracțiile β-glicanice obținute. În rezultat s-a stabilit că activitatea enzimatică a CAT și SOD în aceste fracții este semnificativ mai joasă comparativ cu cele aminoacido-proteice și manoproteice și ating valori de 128,0±7,0-219,5±2,5 mmol/min. la mg proteină pentru CAT și 4,8±0,09-8,5±0,16 U/mg proteină pentru SOD. În același timp, trebuie menționat că activitate relativ înaltă a ambelor enzime s-a stabilit iarăși în varianta 5, în care inițial pentru prelucrarea biomasei a fost utilizat tamponul fosfat de sodiu și temperatura +45°C (Fig.3).



**Fig.3.** Activitatea CAT și SOD în fracțiile β-glicanice obținute din biomasa de levuri de bere după autoliză prin diferite metode: 1 – +55°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 2 – +37°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 3 – +37°C + tampon fosfat de sodiu; 4 – +45°C + H<sub>2</sub>O dist. + acid acetic; 5 – +45°C + tampon fosfat de sodiu; 6 – +37°C + H<sub>2</sub>O robinet + acid acetic.

În timpul extragerii, proteinele se pot denatura sau deteriora din cauza temperaturilor înalte sau reactivilor chimici utilizați. O soluție tampon potrivită utilizată în timpul procesului de extracție contribuie la îmbunătățirea stabilității moleculelor proteice și protejează integritatea proteinelor în timpul separării de alte componente ale celulei. Rezultate similare au obținut și alți cercetători, care au demonstrat experimental eficiența înaltă a soluțiilor tampon, inclusiv a tamponului fosfat de sodiu, în extragerea proteinelor, CAT și SOD din diferite obiecte biologice [14-16].

Deci, putem menționa că rezultatele obținute vor contribui la eficientizarea semnificativă a metodelor de prelucrare a biomasei de levuri din deșeurile industriei de bere, ceea ce va permite obținerea unor produse proteice naturale de calitate cu valoare nutritivă și activitate biologică înaltă.

**Concluzii**

1. Pentru obținerea extractelor de diferită natură cu activitate CAT și SOD maximală din biomasa de levuri de bere, este oportună utilizarea la etapa inițială de prelucrare a biomasei a tamponului fosfat de sodiu și a temperaturii +45°C pe durata autolizei.
2. Factorii de bază, care condiționează obținerea extractelor cu activitate CAT și SOD maximală, sunt pH-ul și temperatura, utilizate la etapa de autoliză.
3. Utilizarea soluțiilor alcaline la etapele ulterioare de prelucrare a biomasei nu afectează activitatea enzimelor antioxidante și permite obținerea din levurile de bere a extractelor cu activitatea CAT și SOD la un nivel acceptabil.
4. Extractele proteice, obținute din biomasa de levuri din deșeurile industriei de bere, caracterizate prin activitate CAT și SOD înaltă, posedă potențial înalt de utilizare în industria alimentară, farmaceutică și în sectorul zootehnic.

**Referințe:**

1. DUDA, E.Z., MERENA, B.S., RODAK, M.B., OCHAB, M.K. Natural antioxidants-properties and possible applications. In: *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 2018, no.5(4), p.251-258.
2. FERREIRA, O., VIEIRA, E., TAVARELA, J. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. In: *Trends in Food Science&Technology*, 2010, vol.21, p.77-84.
3. LUSHCHAK, V. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. In: *Acta biochimica Polonica*, 2006, vol.53(4), p.679-684.
4. LUSHCHAK, V., GOSPODARYOV, D. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Cell Biol. Int.*, 2005, vol.29, p.187-192.
5. MORANO, K. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics*, 2012, vol.190(4), p.1157-1195.
6. CHRIS, G. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, vol.253, p.893-898.
7. SHURSON, C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses and quantification methods. In: *Animal Feed Science and Technology*, 2018, vol.235, p.60-76.
8. CHISELIȚA, O. Studii de eficientizare a prelucrării sedimentelor de drojii de la vinificație. In: *Studia Universitatis*, 2009, nr.6(26) p.107-111.
9. KOMINA, A.V., KOROSTILEVA, K.A., GYRYLOVA, S.N., BELONOGOV, R.N., RUKSHA, T.G. Interaction Between Single Nucleotide Polymorphism in Catalase Gene and Catalase Activity Under the Conditions of Oxidative Stress. In: *Physiol. Res.*, 2012, vol.61, p.655-658.
10. TITOVA, N.M., SUBBOTINA, T.N. *Enzymology: Laboratory Workshop* (in Russian). Krasnoyarsk: Siberian Federal University. 2012. 60 p.
11. NEKRASOVA, G.F., KISELEVA, I.S. *Guide to laboratory and practical classes* (in Russian). Ekaterinburg: Ural State University, 2008. 157 p.
12. REVA, V. *Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor*. Chișinău, 2001. 186 p.
13. TURRENS, J. Superoxide Dismutase and Catalase. In: *Comprehensive Toxicology*, 2010, vol.4, p.219-227.
14. JAKNEGT, P.J., et al. A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. In: *Journal of Photochemistry and photobiology. B, Biology*, 2007, vol.87(3), p.218-226.
15. CHUNYU, H., ZHULONG, C., FAN, Y. Comparative Analyses of Universal Extraction Buffers for Assay of Stress Related Biochemical and Physiological Parameters. In: *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, vol.45(7), p.684-695.
16. GUO, C., GYNN, M., CHANG, T.M.S. Extraction of superoxide dismutase, catalase and carbonic anhydrase from stroma-free red blood cell hemolysate for the preparation of the nanobiotechnological complex of polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase-carbonic anhydrase. In: *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2015, vol.43(3), p.157-162.

**Notă:** Lucrarea a fost realizată în cadrul Proiectului 20.80009.5107.16. „Preparate microbiene biologice active noi pentru majorarea potențialului reproductiv și productiv al animalelor de interes zootehnic”, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

**Date despre autori:**

**Nadejda EFREMOVA**, doctor în științe biologice; cercetător științific coordonator, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** efremova.nadejda@gmail.com

**ORCID:** 0000-0002-9664-346X



**Oleg CHISELIȚA**, doctor în științe biologice; cercetător științific coordonator, director de proiect, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** chiselita@mail.ru; oleg.chiselita@imb.md

**ORCID:** 0000-0001-7298-1512

**Natalia CHISELIȚA**, doctor în științe biologice; cercetător științific coordonator, șef LCȘ *Biotehnologia Levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** chiselita.natalia@gmail.com

**ORCID:** 0000-0002-6943-8129

**Alina BEȘLIU**, doctor în științe biologice; cercetător științific superior, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** besliu.imb@gmail.com

**ORCID:** 0000-0002-9451-0524

**Elena TOFAN**, doctor în științe biologice; cercetător științific superior, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** biotechnol\_asm@mail.ru

**ORCID:** 0000-0002-0186-4391

**Ana LOZAN**, cercetător științific stagiar, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** nutza\_14@mail.ru

**ORCID:** 0000-0002-3725-2872

**Marina DANILIȘ**, cercetător științific stagiar, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** marinuska@yahoo.com

**ORCID:** 0000-0003-0601-7746

*Prezentat la 15.04.2021*