

CZU: 663.14 + 573.6

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4431557>

COMPOZIȚIA BIOCHIMICĂ A SEDIMENTELOR LEVURILOR DE BERE LA DIFERITE PROCEDEE DE AUTOLIZĂ

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

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

În prezenta lucrare sunt evaluate rezultatele privind optimizarea condițiilor de autoliză și extragerea componentelor celulare în urma fracționării biomasei sedimentelor levurilor de bere. Autoliza a fost efectuată cu utilizarea ca factori de inducție a acidului acetic glacial și a soluției tampon fosfat de sodiu, la temperaturi de +37°C și +45°C, timp de 8 ore, cu agitare periodică. S-a constatat că cantitatea maximă de proteine și carbohidrați a fost obținută în varianta experimentală în care a fost utilizată soluția tampon fosfat de sodiu la temperatura de +45°C. Rezultatele obținute prezintă o oportunitate de aplicare în biotehnologie pentru prelucrarea sedimentelor levurilor de bere și implimentarea în diverse domenii, în special în sectorul zootehnic.

Cuvinte-cheie: *Saccharomyces cerevisiae, metode de autoliză, extract proteic, extract manoproteic, fracția β-glucanică, carbohidrați, proteine.*

BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE BEER YEAST SEDIMENTS IN DIFFERENT AUTOLYSIS PROCESSES

In this paper are evaluated the results on the optimization of autolysis conditions and the extraction of cellular components following the fractionation of beer yeast sediment biomass. Autolysis was performed by using glacial acetic acid and sodium phosphate buffer as induction factors, at temperatures of + 37°C and + 45°C, for 8 hours, with periodic stirring. It was found that the maximum amount of protein and carbohydrates were obtained in the experimental variant in which sodium phosphate buffer was used at +45°C. The obtained results present an opportunity for application in biotechnology for the processing of brewer's yeast sediments and implementation in various fields, especially in the zootechnic sector.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae, autolysis methods, protein extract, mannoprotein extract, β-glucan fraction, carbohydrates, proteins.*

Introducere

În ultimul deceniu, levurile din genul *Saccharomyces* spp. sunt cel mai important grup de microorganisme, atât din punct de vedere calitativ, cât și economic, care se comercializează și se utilizează în producția mai multor produse alimentare, inclusiv a berii [1]. Dar, conform tehnologiei de producere a berii, după cinci procese de fermentație acestea sunt aruncate ca deșeuri, ceea ce are un impact negativ asupra mediului înconjurător.

Actuală ar fi utilizarea deșeurilor levuriene după finalizarea procesului de fermentare ca materie primă pentru producerea extractelor cu conținut bogat de proteine, aminoacizi, vitamine, hormoni și carbohidrați [1]. Astfel poate fi redus impactul negativ asupra mediului și micșorate costurile de prelucrare a deșeurilor levuriene.

O altă direcție de interes major este utilizarea extractelor din sedimentele levuriene care au un conținut bogat de substanțe biologice active pentru nutriția și protecția sănătății animalelor [2,3]. Cheltuielile pentru hrana animalelor constituie în medie 65-70%, deci reducerea costurilor, suplینirea componentelor biologice active și organizarea unei alimentații adecvate joacă un rol principal în intensificarea producției [4].

Însă, un impediment este faptul că celulele levuriene posedă perete celular rigid și rezistent la acțiunea diferitor fermenți [5], inclusiv digestivi; astfel, utilizarea biomasei și obținerea extractelor în baza ei deseori este limitată. Actualmente, pentru distrugerea pereților celulari levurieni servesc diverse metode de autoliză bazate pe utilizarea enzimelor, ultrasunetului, plasmolizei, distrugerii mecanice (omogenizare) [6,7], utilizate fiecare în parte sau în diferite combinații, dar care până la urmă sunt destul de costisitoare și necesită echipament special.

Din aceste considerente, sunt necesare și actuale studii cu utilizarea metodelor mai simple și eficiente din punct de vedere energetic de autoliză și distrugere a peretelui celular levurian pentru sporirea valorii nutritive și biologice. Parametru important pentru determinarea eficienței metodei de autoliză asupra levurilor este analiza compoziției biochimice a conținutului de proteină [8].

Reieșind din cele expuse, scopul cercetărilor constă în investigarea compoziției biochimice a sedimentelor levurilor de bere la diferite procedee de autoliză.

Material și metode

Ca material de cercetare a fost utilizată biomasa de levuri (*Saccharomyces cerevisiae*) de fermentare inferioară de la producerea berii, oferită cu amabilitate de fabrica de bere Kellers (Budești).

Metodele de realizare a cercetărilor. Determinarea biomasei uscate s-a realizat gravimetric conform metodei uzuale prin uscarea biomasei în etuvă la temperatura de 105°C până la masă constantă și prin recalculul substanței uscate [9].

Conținutul total de carbohidrați a fost determinat la PG T60 VIS Spectrophotometer la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și a D-glucozei în calitate de standard [10]. Proteina a fost determinată spectrofotometric conform metodei Lowry [11], în calitate de standard fiind utilizată albumina cristalină din serul bovinelor.

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată utilizând setul de programe MO Excel și Statistica 9.0. Rezultatele datelor a 3 repetări au fost exprimate prin calcularea mediei, deviației standard și a intervalului de încredere pentru o medie. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru $P \leq 0,05$

Rezultate și discuții

Pentru atingerea scopului și selectarea celei mai eficiente metode de a autoliză pentru sedimentele levurilor de bere au fost cercetate 6 variante experimentale. Astfel, 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 (în raport 1:1). Suspensiile au fost termostatate la temperatura de +37, +45 și +55°C, timp de 8 ore, cu agitare periodică.

Au fost supuse cercetării următoarele variante experimentale:

Varianta I (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 II. 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 III. 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 IV. 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 V. 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 VI. 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.

Ulterior, a fost efectuată fracționarea biomasei levuriene de la producerea berii, în trei etape. La etapa I a fost extrasă fracția proteică, prin centrifugarea autolizatei la 3500 rot./min. timp de 15 minute. La etapa a II-a, extractele manoproteice au fost obținute prin tratarea sedimentelor restante după centrifugare din prima etapă cu soluție 1N NaOH (în raport 1:5) și a fost efectuată hidroliza la temperatura de 80±5°C timp de 2 ore. Apoi, suspensiile au fost supuse centrifugării la 3500 rot./min. timp de 15 minute. La etapa a III-a, sedimentele restante după eliminarea supernatantelor alcaline au fost colectate și au fost utilizate în continuare pentru obținerea fracțiilor β-glucanice. Extracția fracției β-glucanice a fost efectuată prin hidroliza cu acid acetic de 0,5N (în raport 1:5), la temperatura de 75±5°C, timp de 1 oră. După hidroliză suspensiile acide au fost supuse centrifugării la 3500 rot./min. timp de 15 minute. Sedimentul, care constituie fracția β-glucanică insolubilă în alcalii și acizi, se spală de 3 ori cu apă distilată și se usucă la 50±5°C.

Valoarea nutritivă a extractelor în mare măsură depinde de componența lor biochimică, în special de cantitatea de proteine și carbohidrați. După compoziția aminoacizilor proteinele sunt cel mai valoros ingredient

din biomasa levuriană, superior după compoziția aminoacizilor față de proteinele din cereale și doar puțin inferior comparativ cu proteinele din lapte și din făina de pește [1]. Proteinele participă la întreținerea integrității celulare în răspunsul imun și autoimun al organismelor în structura și funcția celulelor [12]. Carbohidrații sunt o altă componentă importantă a celulelor levuriene care, conform studiilor din literatura de specialitate, variază în limitele 15-56% [13,14]. De asemenea, carbohidrații obținuți din celule microbiene au o vastă aplicare în practică, cosmetologie, alimentație, zootehnie [15]. Astfel, eficiența diferitor metode de autoliză, utilizate în aceste cercetări, a fost determinată anume în baza acestor indici, care denotă disponibilitatea substanțelor pentru a putea fi extrase.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat că în fracția I extractele proteice obținute conțin de la 70 până la 85 mg/ml substanță uscată, din care de la 59,0±1,0 până la 64,0±0,2 mg/ml proteină și 8,1±0,07 – 9,9±0,09 mg/ml carbohidrați, în funcție de metoda de autoliză utilizată. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

**Conținutul de substanțe uscate, proteine și carbohidrați
în extractele proteice în funcție de metoda de autoliză utilizată**

Varianta de autoliză	Substanță uscată, mg/ml	Proteine, mg/ml	Carbohidrați, mg/ml
Varianta I	78	62,5±1,5	8,9±0,07
Varianta II	70	59,0±1,0	9,8±0,04
Varianta III	74	63,1±0,1	8,1±0,07
Varianta IV	85	62,7±1,7	8,7±0,04
Varianta V	74	64,0±0,2	9,9±0,09
Varianta VI	71	59,3±1,8	8,7±0,07

Astfel, este de menționat faptul că variantele de autoliză în care a fost utilizată soluția tampon fosfat de sodiu permite obținerea extractelor proteice cu un conținut maxim de proteine și carbohidrați care constituie 85,3±0,13 – 86,5±0,27% și, respectiv, 10,9±0,10 – 13,4±0,12% din S.U. (Fig.1).

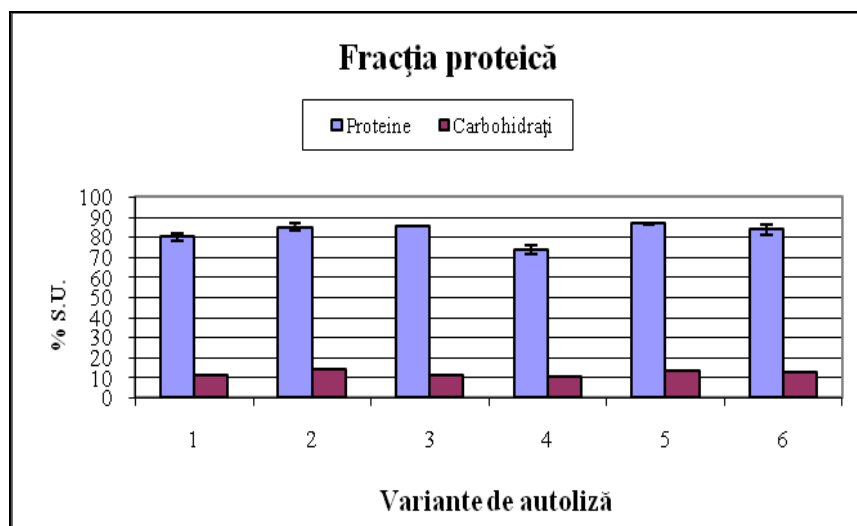


Fig.1. Conținutul de proteine și carbohidrați în fracțiile proteice (autolizate) obținute din biomasa de levuri de bere la utilizarea diferitor metode de autoliză: 1 – +55°C + H₂O dist. + acid acetic; 2 – +37°C + H₂O dist. + acid acetic; 3 – +37°C + tampon fosfat de sodiu; 4 – +45°C + H₂O dist. + acid acetic; 5 – +45°C + tampon fosfat de sodiu; 6 – +37°C + H₂O robinet + acid acetic.

În continuare a fost evaluat conținutul biochimic de extracte alcaline (manoproteice) obținute. În rezultat s-a determinat că acestea conțin 54-64 mg/ml substanță uscată, din care 34,5±0,11 – 40,7±0,31 mg/ml revin proteinei, iar 16,5±0,15 – 22,0±0,20 mg/ml carbohidraților în funcție de varianta de autoliză (Tab.2).

Tabelul 2

**Conținutul de substanțe uscate, proteine și carbohidrați
în extractele manoproteice în funcție de metoda de autoliză utilizată**

Varianta de autoliză	Substanță uscată, mg/ml	Proteine, mg/ml	Carbohidrați, mg/ml
Varianta I	58	34,5±0,11	19,2±0,11
Varianta II	62	35,0±0,10	22,0±0,20
Varianta III	54	37,3±0,05	17,2±0,70
Varianta IV	62	39,9±1,17	16,5±0,15
Varianta V	63	40,7±0,31	21,8±0,57
Varianta VI	64	38,1±0,19	19,3±0,30

Ca și în cazul extractelor proteice, valori maxime ale conținutului de proteine și carbohidrați în extractele manoproteice au fost înregistrate în variantele III și V, în care pentru efectuarea autolizei a fost utilizată soluția tampon fosfat de sodiu. Conținutul lor, în funcție de temperatura utilizată, a fost de 64,5±0,50 – 67,7±0,09% S.U. și, respectiv, de 17,2±0,70 – 21,8±0,57% S.U. (Fig.2).

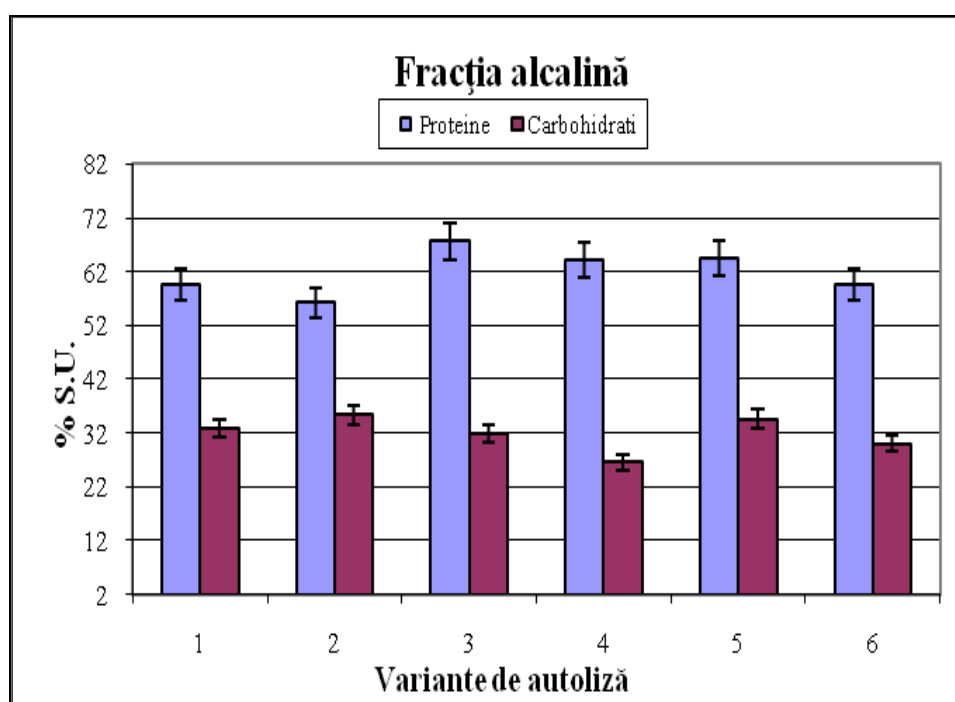


Fig.2. Conținutul de proteine și carbohidrați în fracțiile alcaline manoproteice obținute din biomasa de levuri de bere după autoliză prin diferite metode: 1 – +55°C + H₂O dist. + acid acetic; 2 – +37°C + H₂O dist. + acid acetic; 3 – +37°C + tampon fosfat de sodiu; 4 – +45°C + H₂O dist. + acid acetic; 5 – +45°C + tampon fosfat de sodiu; 6 – +37°C + H₂O robinet + acid acetic.

În continuare a fost determinat conținutul de proteine și carbohidrați în fracțiile β-glucanice insolubile în alcalii și acizi. Astfel, s-a constatat că aceste fracții, în funcție de varianta de autoliză utilizată, conțin de la 6,3 până la 13,9% S.U. de proteine și de la 46,8 până la 83,4% S.U. de carbohidrați (Fig.3). Conținutul minimal de proteine în fracția β-glucanică obținută în variantele experimentale confirmă faptul că tamponul fosfat posedă eficiență înaltă ca inductor al autolizei și substanțele biologice active în cantități maxime deja au fost extrase la etapele precedente.

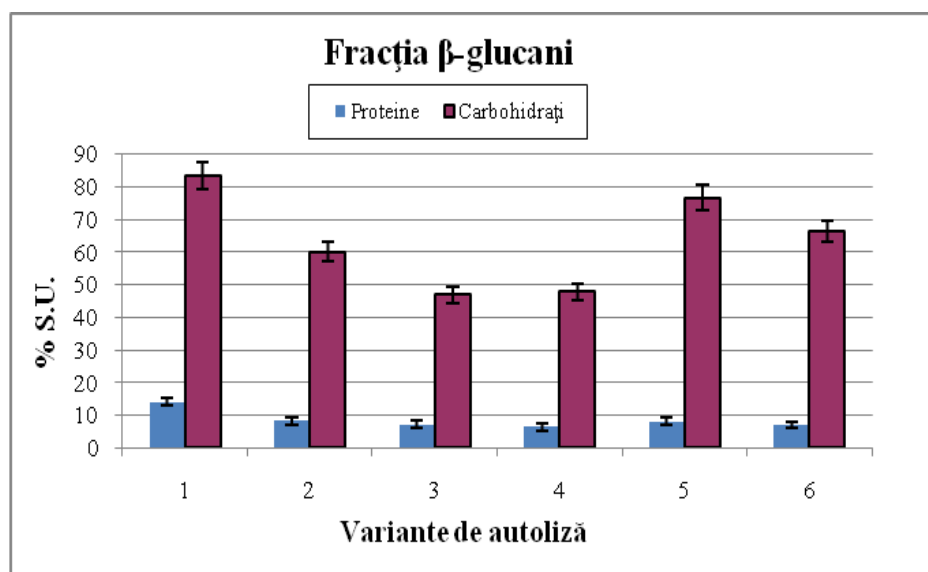


Fig.3. Conținutul de proteine și carbohidrați în fracțiile β-glucanice obținute din biomasa de levuri de bere după autoliză prin diferite metode: 1 – +55°C + H₂O dist. + acid acetic; 2 – +37°C + H₂O dist. + acid acetic; 3 – +37°C + tampon fosfat de sodiu; 4 – +45°C + H₂O dist. + acid acetic; 5 – +45°C + tampon fosfat de sodiu; 6 – +37°C + H₂O robinet + acid acetic.

Așadar, rezultatele obținute confirmă eficiența soluției tampon fosfat de sodiu și a temperaturii de 45°C în calitate de inductor al autolizei, care permite obținerea unor extracte cu un conținut înalt de proteine și carbohidrați. Ele sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate, conform cărora optimizarea parametrilor de extracție, ca temperatura, durata și concentrația biomasei în suspensie, a contribuit la obținerea unui extract pentru utilizare în industria alimentară, cu un conținut de 51,4 ± 1,2% S.U. de proteine și de 25,9 ± 0,1% S.U. de carbohidrați. Efectuând extracția la temperatura de 95°C, timp de 9 ore, concentrația biomasei în suspensie este de 10% [16].

Concluzii

1. Autoliza biomasei (celulelor) levuriene cu utilizarea soluției tampon fosfat de sodiu și a temperaturii de 45°C permite obținerea extractelor de diversă natură cu compoziție biochimică mai valoroasă, comparativ cu alte variante cercetate.
2. Extractele proteice, manoproteice și fracția β-glucanică, obținute din biomasa de levuri de bere prin autoliză la 45°C cu soluție tampon fosfat de sodiu și extracție fracționată consecutivă, conțin de la 8,0 până la 86,4% S.U. de proteine, de la 13,3 până la 76,6% S.U. de carbohidrați, în funcție de natura lor.
3. Compoziția biochimică variată a fracțiilor extrase oferă posibilitatea valorificării lor cu scopul creării de noi preparate. Rezultatele obținute pot fi aplicate în biotehnologie, la elaborarea noilor tehnologii autohtone de producere a preparatelor de natură proteică și glucidică cu potențial înalt de utilizare în sectorul zootehnic.

Referințe:

1. БАННИЦЫНА, Т.Е., КАНАРСКИЙ, А.В., ЩЕРБАКОВ, А.В., ЧЕБОТАРЬ, В.К., КИПРУШКИНА, Е.И. Дрожжи в современной биотехнологии. В: *Вестник Международной академии холода*, 2016, №1, с.24-29.
2. HATOUM, R., LABRIE, S., FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. In: *Front Microbiology*, 2012, no.3, p.421.
3. PINTILIE, G. *Cercetări privind valorificarea drojdiilor de bere reziduale pentru obținerea unor produse cu valoare nutrițională ridicată*: Teză de doctor, 2011, p.32-35.
4. SUZZI, G., ROMANO, P., PONTI, I., MONTUSCHI, C. Natural wine yeasts as biocontrol agents. In: *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, vol.78, p.304-308.
5. VILELA, E.S.D., SGARBIERI, V.C., ALVIN, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). In: *Revista de Nutrição*, 2000, vol.13, no.3, p.185-192.

6. KNORR, D., SHETTY, K., HOOD, L., KINSELLA, J. An enzymatic method for yeast autolysis. In: *Journal of Food Science*, 2006, no.44, p.1362-1365.
7. BREDDAM, K., BEENFELDT, T. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. In: *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 1991, no.35, p.323-329.
8. CHISELIȚA, O. Studii de eficientizare a prelucrării sedimentelor de drojdii de la vinificație. În: *Studia Universitatis*, 2009, nr.6, vol.26, p.107-111.
9. ЕГОРОВ, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Москва: Изд-во МГУ, 1995. 224 с. ISBN 5-211-033582
10. DEY, P., HARBORN, J. Methods in Plant Biochemistry. In: *Carbohydr. Academic Press*, 1993, vol.2, p.529.
11. LOWRY, O., ROSEBOUGH, N., FARR, A. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.
12. WALSH, G. Proteins and Proteomics. In: *Proteins*, 2015, p.1-23.
13. BZDUCHA-WRÓBEL, A., KIELISZEK, M., BŁAŻEJAK, S. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. In: *Eur. Food Res. Technol.*, 2013, no.4, vol.237, p.489-499.
14. BATT, C., TORTORELLO, M. *Encyclopedia of Food Microbiology*. New York: Academic Press, 2014, p.294. ISBN 978-0-12384730-0
15. HOANG-TUONG, N.H., OBULISAMY, P.K., KIRSTEN, H. Bio-Refining of Carbohydrate-Rich Food Waste for Biofuels. In: *Energies*, 2015, vol.7, no.8, p.6350-6364. ISSN 1996-1073
16. COSTA, A.G., MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Obtencao e caracterizacao de manoproteinas da parede celular de leveduras de descartes em cervejaria. In: *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringa*, 2012, no.1, vol.34, p.77-84.

Notă: Investigațiile au fost realizate în cadrul Proiectului „Preparate microbiene biologice active noi pentru majorarea potențialului reproductiv și productiv al animalelor de interes zootehnic”, cu cifrul 20.80009.5107.16.

Date despre autori:

Alina BEȘLIU, doctorandă, Școala doctorală Științe Biologice; cercetător științific la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: besliu.imb@gmail.com

Oleg CHISELIȚA doctor în biologie, cercetător științific coordonator, director de proiect, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: chiselita@mail.ru

Natalia CHISELIȚA doctor în biologie, cercetător științific coordonator, șef LCȘ Biotehnologia Levurilor, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: chiselita.natalia@gmail.com

Nadejda EFREMOVA, doctor în biologie, cercetător științific coordonator, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: efremova.nadejda@gmail.com

Elena TOFAN doctor în biologie, cercetător științific superior, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: biotehnol_asm@mail.ru

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

E-mail: nutza_14@mail.ru

Prezentat la 20.11.2020