

EXTRAGEREA β -GLUCANULUI DIN DROJDIILE DE VIN

Stella GUȚU, Dumitru CALCATINIUC

Universitatea Tehnică a Moldovei

Abstract: Dat fiind faptul că industria vitivinicolă este foarte dezvoltată în Republica Moldova, iar deșeurile rezultate în procesul de producție a vinurilor de struguri sunt, în mare parte, neutilizate, se propune o variantă convenabilă de a evita acest dezavantaj prin extragerea din drojdiile de vin a unui polizaharid cu utilizări polivalente, numit β -glucan. În articol este expusă și explicată metoda de extragere a betaglucanului din drojdiile de vin corespunzând microbiologului japonez Saowanee Thammakiti, care constă în tratarea pereților celulari ai drojdiilor cu bază și acid în diferite concentrații. Este prezentat calculul efectuat în conformitate cu datele obținute în cadrul cercetărilor de laborator ce corespunde parametrului conținutul de substanță uscată. Acest indice este, de asemenea, comparat cu valorile aferente din alte surse.

Cuvinte cheie: β -glucan / drojdii din vin / *Saccharomyces cerevisiae*/ substanță uscată

Introducere

Industria vitivinicolă în Republica Moldova reprezintă una dintre ramurile principale ale economiei. Circa 90% din volumul total al vinului produs este destinat exportului, constituind astfel o importantă sursă de venit pentru bugetul statului [10]. Viticultura și vinificația în Moldova au tradiții multisekulare cu rădăcini adânci în trecutul veacurilor istorice. Milioane de oameni consumă strugurii viței de vie în stare proaspătă și produsele obținute din prelucrarea strugurilor, fiindcă sunt universale după însușirile gustative și curative și se deosebesc prin conținut unicat al compușilor utili (cca 600), adaptare înaltă la condițiile mediului ambiant, îngrijire relativ simplă, eficacitate economică sporită, etc. [2].

Conform Biroului Național de Statistică al Republicii Moldova, producția de vinuri naturale din struguri pentru anii precedenți nu a fost una constantă, înregistrându-se valori între 12,3 și 16,3 mil.dal. în perioada anilor 2007-2017 [11]. Acest lucru este mai bine ilustrat în diagrama de mai jos.

Din această diagramă este vizibil faptul că în anul 2017 domeniul industriei vitivinicole a înregistrat o recoltă record, care a constituit cca 163 000 tone de vin, în comparație cu anul 2007, pentru care această valoare era egală cu 123 000 tone de vin.

De menționat că în producerea vinului – băutură alcoolică obținută prin fermentare parțială sau completă a mustului din struguri proaspeți - se folosesc doar 70% din materia primă, restul 30% fiind pierderile, numite “reziduuri” [12]. Acestea din urmă sunt reprezentate de chiorchine, tescovina, pieliță, tirighie sau piatră de var, drojdii, ș.a. Ulterior unele se utilizează, iar altele își păstrează statutul de “deșeu”. De exemplu, tescovina este valorificată în scopul obținerii furajului proteic, acidului tartric, uleiului alimentar, coloranților, taninului, etc. Semințele strugurilor se întrebuințează pentru obținerea uleiului cu destinație farmaceutică. Din pielița strugurilor se pot obține polifenoli, utilizați în cosmetologie și estetică.

Productia principalelor produse industriale pe Tipuri de produse si Ani

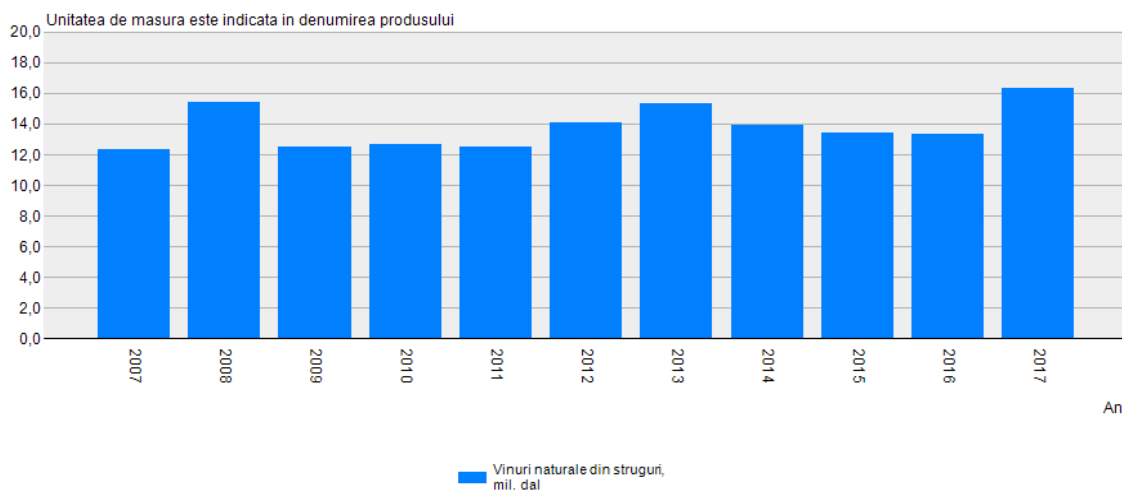


Fig.1. Variația producției de vinuri naturale din struguri din Republica Moldova (anii 2007-2017)

Mai puțin sunt folosite drojdiile din vinurile naturale de struguri, care se aruncă anual, pierzându-se astfel substanțe importante din compoziția lor. Reieșind din valoarea producției de vin din ultimii ani se poate calcula cantitatea de drojdii uzate, care ar putea fi reciclate și ar aduce beneficii atât pentru medicină și cosmetologie, cât și pentru industria alimentară. Drojdiile de vin sunt compuse în principal din β -glucani, manoproteine și chitină [4]. β -glucanii (BG) sunt polizaharidele cele mai abundente ale peretelui celular al acestora și reprezintă polizaharide naturale complexe a monomerilor D-glucozei, unite prin legături glicozidice și conjugate în pozițiile β -(1-6) și β -(1-3) [1]. Formula moleculară este $C_{18}H_{32}O_{16}$. β -glucanii sunt utilizați pe larg atât în medicină, datorită stimulării imunității, rezistenței împotriva agenților patogeni virali, bacterieni, parazitari, precum și activității antitumorale, în cosmetologie – la producerea de preparate care împiedică iritarea și întârzie îmbătrânirea pielii, dar și în industria alimentară din motiv că β -glucanii au capacitate mare de menținere a apei, proprietăți de gelifiere, îngroșare, stabilizare și emulsionare. La nivel mondial, β -glucanii sunt comercializați sub diferite forme: capsule pentru întărirea imunității, gel pentru menținerea sănătății pielii, sirop pentru copii, concentrat de tărâțe de ovăz, fulgi cu β -glucani – hrană pentru peștii de acvariu, etc. Importante surse de β -glucani reprezintă cerealele (în special, orz, ovăz, psilium, porumb), bacteriile, ciupercile, algele, lichenii, dar bineînțeles și drojdiile (levurile) [6]

În prezent, peste hotarele țării drojdiile sunt studiate în calitate de sursă de materie primă pentru elaborarea preparatelor medicamentoase și profilactice, drept suplimente furajere, dar și ca sursă de substanțe biologic active. Drojdiile sunt capabile să sintetizeze un complex de substanțe bioactive, inclusiv polizaharide, cu un rol important în activitatea vitală a organismelor vii. Producerea microbiologică a polizaharidelor biologic active este una din ramurile biotehnologiilor ce se dezvoltă rapid. La momentul actual industria microbiologică produce un spectru larg de polizaharide valoroase: WGP (whole glucan particles), Zymosan, Curdlan, dextran, xantan, etc [3 Giavasis]. Toate aceste preparate sunt importate și în Republica Moldova, fapt ce evidențiază necesitatea și actualitatea cercetărilor ce țin de elaborarea tehnologiilor autohtone de obținere a polizaharidelor naturale, în cazul de față a β -glucanilor.

Deși printre levurile producătoare de polizaharide, utilizate în alimentație, se regăsesc reprezentanți ai genurilor *Zygosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, totuși *Saccharomyces cerevisiae* rămâne o sursă majoră de β -glucani. β -glucanii obținuți din levuri au fost aprobați de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară ca ingrediente alimentare noi și recunoscute ca fiind sigure GRAS (Generally Recognized as Safe) de către Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente.

Saharomicetele sunt utilizate în producerea alimentelor și băuturilor fermentate timp de mii de ani și sunt cele mai detaliat studiate microorganisme, ale căror condiții de cultivare sunt foarte bine cunoscute și pot fi optimizate pentru a maximiza randamentul de producere a β -glucanilor. Din punct de vedere biotehologic ele au avantajul de a produce o cantitate relativ mare de biomasă cu cheltuieli minime. Biomasă de levuri în calitate de produs secundar al producției de vin ar putea fi de asemenea utilizată ca materie primă pentru obținerea β -glucanilor, fapt care a fost aplicat în cadrul acestei cercetări științifice.

1. Materiale și metode de cercetare.

Drept obiect de studiu a servit drojdia/sedimentul de la vinul din struguri Victoria. Acesta reprezintă un soi de struguri de masă obținut din încrucișarea soiurilor Cardinal și Afuz Ali. În prezent se află în cultură pe suprafețe întinse în toate țările unde se cultivă struguri de masă: România, Turcia, Grecia, Italia, Spania, chiar și unele țări din Africa de Sud. În ceea ce privește însușirile agrobiologice, Victoria este un soi cu vigoare mijlocie spre mare, fertilitate bună (63-73% lăstari fertili) și productivitate foarte înaltă, datorită mărimii strugurilor. Productivitatea soiului este de 18-20 tone la hectar, în dependență de zona și condițiile de cultură. Strugurii manifestă rezistență biologică bună la ger (-18°C - -20°C) și la secetă, se comportă bine față de brumele și înghețurile de primăvară, datorită dezmușuririi târzii. De asemenea, manifestă rezistență mijlocie la boli și dăunători, [13, Condei Gh, Lepădatu V.]

Peretele celular al levurilor este ținta principală a metodelor de extracție a β -glucanilor. Metodele de lezare a peretelui celular și extracție a componentelor diferă semnificativ între ele, fiecare afectând cu grad diferit de gravitate randamentul final, puritatea, greutatea moleculară, solubilitatea, activitatea biologică și alte proprietăți biologice și funcționale ale β -glucanului extras. Extragerea eficientă a β -glucanilor din pereții celulari levurieni, ce posedă o structură complexă, este posibilă numai prin alegerea metodelor eficiente de distrugere a acestora. În majoritatea cazurilor, pentru dezagregarea pereților celulari, se apelează la procedee cu aplicarea ultrasunetului, congelării-decongelării, autolizei, măcinării în mori cu bile, precum și a enzimelor. Parametrii variabili la extragerea β -glucanilor din biomasă levuriană sunt: solvenții și concentrația acestora, temperatura, durata de extracție, etc. Metoda de extragere a β -glucanilor include, în principiu, două

faze: dezagregarea celulelor și extracția de β -glucani din pereții celulari prin intermediul tratării cu bază și acid în diferite proporții.

În cadrul cercetării științifice s-a utilizat metoda lui Thammakiti Saowanee de obținere a β -glucanilor. Cercetările realizate de microbiologul japonez Thammakiti și expuse în revista Food Science & Technology sub formă de articol științific elucidează importanța obținerii betaglucanului (din levuri) pentru utilizarea mai apoi în alimentație [5]. Acesta a descris metoda de lucru și rezultatele experienței, după cum urmează. Un preparat de β -glucan, obținut din drojdia de bere uzată, a fost evaluat pentru aplicații alimentare potențiale. Acest material a fost autolizat și pereții celulari obținuți au fost omogenizați, extrași mai întâi cu alcalii, apoi cu acid și apoi uscați prin pulverizare. Au fost investigate efectele omogenizării asupra compoziției chimice, proprietăților reologice și proprietăților funcționale ale β -glucanului. Peretele celular omogenizat a prezentat un conținut mai mare de β -glucan și o vâscozitate aparentă decât cele care nu au fost omogenizate din cauza fragmentării pereților celulari. În comparație cu β -glucanul din comerț din drojdia pentru panificație, s-a constatat că β -glucanul obținut din acest studiu a avut o vâscozitate aparentă mai mare, capacitate de menținere a apei și capacitate de stabilizare a emulsiei, precum și capacitate similară cu cea de legare a uleiului. Aceste constatări sugerează că beta-glucanul obținut din drojdia de bere poate fi utilizat în produse alimentare ca agent de îngroșare, menținere a apei sau agent de legare a uleiului și stabilizator de emulsionare.

Metoda de obținere a β -glucanilor, utilizată în cadrul studiilor de laborator, constă în autoliza suspensiei de drojdie (15% g/g conținut uscat cu pH=5), la 50°C timp de 24 ore, agitare moderată. Ulterior, autolizatul se supune încălzirii la 80°C timp de 15 minute, răcirii sub jet de apă până la temperatura camerei și centrifugării la 3565 rot/min timp de 10 minute. Sedimentul primit se colectează. Procedura de extracție a β -glucanilor constă în tratarea pereților celulari cu 1N NaOH (raport 1:5, adică 5 volume de 1N NaOH) la temperatura de 80±5°C timp de 2 ore. După aceasta se adaugă 5 volume de acid acetic 0,5N și se încălzește la temperatura de 75±5°C timp de 1 oră. Extractul se centrifughează la 3565 rot/min timp de 10 minute la temperatura camerei, sedimentul (betaglucanii) se spală de trei ori cu apă distilată și se usucă la 50±5°C. Pasta obținută de β -glucani este de culoare cafeniu-deschis [5, Thammakiti S., et al.2004].

Explicarea schematică a metodei este prezentată în Figura 1.2.

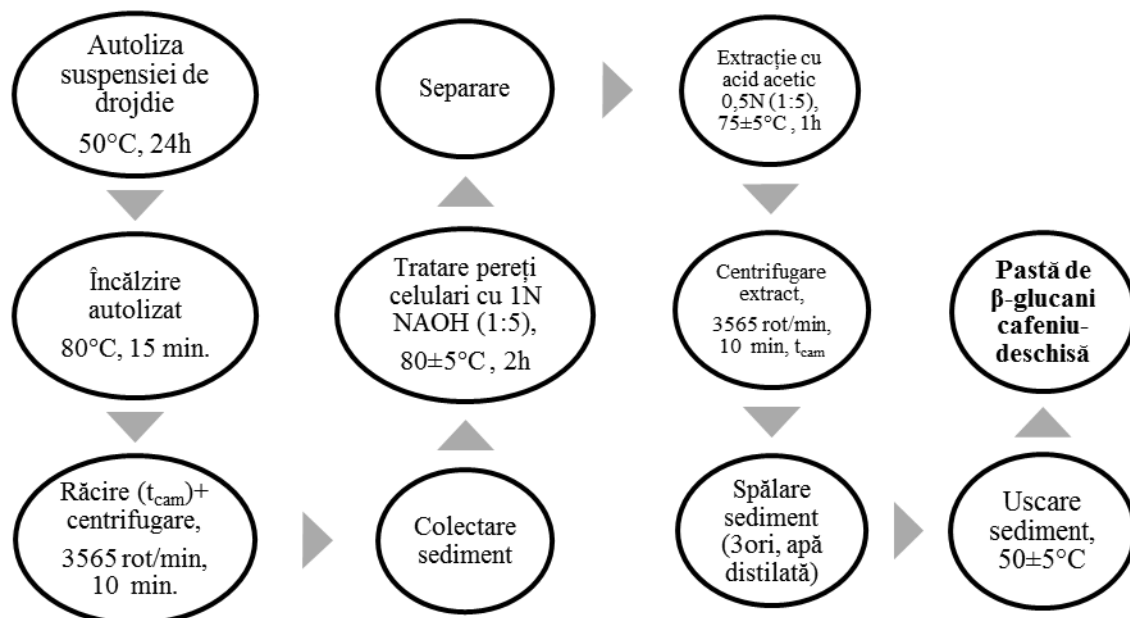


Fig. 2. Metoda de obținere a β -glucanilor din levuri (THAMMAKITI)

Reieșind din metoda dată de obținere a β -glucanilor, conform lui Thammakiti, apare necesitatea utilizării în procesul cercetărilor a materialelor, reactivilor și aparatelor, prezentate în tabelul de mai jos.

Materiale, aparate și reactivi utilizați

| Nr d/o | Materiale și aparate | Reactivi |
|--------|---------------------------|----------------------|
| 1 | pîlnii de sticlă | suspensie de drojdie |
| 2 | hîrtie de filtru | soluție 1N NaOH |
| 3 | baloane conice de 100 ml | acid acetic 0,5N |
| 4 | baghetă de sticlă | apă distilată |
| 5 | cilindru gradat de 100 ml | |
| 6 | castron/crațiță | |
| 7 | termometru | |
| 8 | cântar | |
| 9 | plită electrică | |
| 10 | termostat | |
| 11 | centrifugă | |

2. Rezultate și discuții.

Determinarea conținutului de β -glucan în drojdia/sedimentul din vin. Pentru determinarea conținutului de β -glucan din drojdia/sedimentul din vin au fost luate aproximativ 500g de suspensie de drojdie de vin Victoria din laboratorul de oenologie al facultății Tehnologia Alimentelor. Din suspensia inițială, care a fost filtrată, s-a cântărit aproximativ 1 g și proba a fost pusă la termostat pentru 48 ore. Pe baza acesteia s-a determinat conținutul substanței uscate după formula din continuare (pentru 1 gram de substanță uscată cântărită):

$$SU = (m_2 - m) : (m_1 - m) \times 100\%, \quad (1)$$

unde: m – masa fiolei goale, g; $m = 10,373g$

m_1 – masa fiolei cu produsul înainte de uscare, cu adaos de levuri g; $m_1 = 11,345 g$

m_2 – masa fiolei cu produsul după uscare, fiola cu levuri uscate g; $m_2 = 10,687g$

$SU = (10,687g - 10,373g) : (11,345g - 10,373g) \times 100\% = (0,314g : 0,972g) \times 100\% = 32,30\%$ - substanța uscată din aproximativ 1g de levuri umede.

Astfel, rezultă că în 1g de biomasă umedă cu betaglucan se conține 0,323 g substanță uscată, respectiv în 10g biomasă umedă (ceea ce corespunde cu masa inițială a probei de analizat) se conțin 3,23 g biomasă uscată, restul constituind partea lichidă.

Determinarea conținutului de β -glucan în drojdia/sedimentul din vinul Victoria s-a efectuat după următoarea formulă de calcul:

$$\beta\text{-glucan (\% la SU)} = (m_f \beta\text{-glucan} - m_f \text{ goală}) / b_{m\text{uscată}} \times 100\% \quad (2)$$

unde: $m_f \beta\text{-glucan}$ - masa fiolei cu β -glucan, **30,898g**;

$m_f \text{ goală}$ – masa fiolei goale, **30,413g**;

$b_{m\text{uscată}}$ – biomasa uscată, **3,23 g**.

$\beta\text{-glucan (\% la SU)} = (30,898g - 30,413g) / 3,23 g \times 100\% = 15,02\%$

Din calculul dat se poate concluziona că în 10g de suspensie de drojdie din vin se conțin 15,02% β -glucan uscat. Rezultă că conținutul de β -glucan din drojdiile de vin este mult mai înalt în comparație cu același parametru din componența altor surse de câteva ori, în conformitate cu datele din Tabelul 1.2 [7,8,9].

Tabelul 2

Conținutul comparativ de β -glucan din componența diferitor surse

| Nr. d/o | Conținutul de β -glucani din vinul Victoria, % | Conținutul de β -glucani după sursele bibliografice, % |
|---------|--|--|
| 1 | 15 | Ahmed Asfi: “în fasole se conțin 2,4-3,5 % β -glucani” |
| 2 | | Bushra Munir: “în porumb se conțin 0,1-1,3 β -glucani |
| 3 | | Tahira Tabassum: “în orz se conțin 5-10 β -glucani în dependență de soi” |

Datele din tabel explică clar că conținutul de β -glucan din drojzii este de circa 4 ori mai mare decât din componența fasolelor, de aproximativ 14 ori mai mare decât în porumb și de cel puțin 2 ori mai mare decât în orz.

Concluzii

Extragerea β -glucanului din reziduurile de drojzii din vinuri reprezintă avantaje pentru procesul de producție, astfel evitându-se pierderile. De asemenea, activitatea biologică înaltă și diversitatea domeniilor de utilizare a β -glucanilor, în special a celor din levuri, evidențiază oportunitatea studierii acestor compuși, ce posedă potențial înalt în promovarea sănătății umane și elaborarea preparatelor biologice active cu utilizări polivalente. Mai mult decât atât, conținutul de β -glucan în drojdiile de vin este mai înalt comparativ cu același parametru din componența altor surse, precum porumbul, orzul, fasolele, etc. fapt ce accentuează importanța extragerii lui anume din drojdiile de vinuri.

Bibliografie

1. CHISELIȚA, Natalia, Tehnologie de obținere a β -glucanilor din levuri, Chișinău, 2018-158 p.;
2. SULA I., NICOLAESCU, Gh., BRATCO D., et al. Dezvoltarea viticulturii și vinificației în Republica Moldova, Lucrări științifice, vol.42 (2): Horticultură, viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor: materialele Simpozionului Științific Internațional "Horticultura modernă - realizări și perspective", UASM, Chișinău, 2015 – 287 p.
3. GIAVASIS I., Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. In: Current Opinion in Biotechnology, 2014, vol. 26, p. 162-173;
4. PEREZ-GARCIA L.A. Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. J Glycobiol. 2012;1. doi:10.4172/2168-958X.1000102
5. THAMMAKITI S., SUPHANTHARIKA M., PHAESUWAN T., VERDUYN C., Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. Int J Food Sci Tech, 2004, vol.39 (1), 2004-21-29.;
6. SAJAD S., et al. " β -Glucan and Functionality: A Review", EC Nutrition, 2017, 10.2 67-74;
7. ASIF A., ZAHEER A., Nutraceutical aspects of β -glucan with application in food products, Nutraceuticals, 10.1016/B978-0-12-804305-9.00011-7, 2016, (387-425);
8. AHMAD A., MUNIR B., ABRAR M., BASHIR S., ADNAN M., et al. "Perspective of β -Glucan as Functional Ingredient for Food Industry". 2012, J Nutr Food Sci 2:133. doi: 10.4172/2155-9600.1000133;
9. HAVRLENTOVA M. et al. "Cereal β -glucans and their significance for the preparation of functional foods - a review". Czech Journal of Food Science 2011, 29.1: 1-14;
10. https://ro.wikipedia.org/wiki/Industria_vinicol%C4%83_%C3%AEn_Republica_Moldova;
11. http://statbank.statistica.md/pxweb/pxweb/ro/40%20Statistica%20economica/40%20Statistica%20economica__14%20IND__IND030/IND030100.px/table/tableViewLayout1/?rxid=01a609d1-6fb0-44aa-9691-eb5235203b50;
12. <https://ru.scribd.com/doc/130218801/Valorificarea-de-C5%9Feurilor-din-vinifica%C5%A3ie>;
13. <http://www.horticultorul.ro/vita-de-vie/soiul-de-vita-de-vie-victoria/>