

OBȚINEREA β -GLUCANILOR DIN PERETELE CELULAR AL DROJDIEI REZIDUALE DE VINIFICAȚIE

Ana CHIORU

Doctorat, Tehnologii biologice și chimice în industria alimentară, Facultatea Tehnologia Alimentelor,
Universitatea Tehnică a Moldovei, Chișinău, RM

Autorul corespondent: Ana Chioru, e-mail: ana.chioru@doctorat.utm.md

Coordonator științific: Aurica CHIRSANOVA, dr., conf. univ., Departamentul Alimentație și Nutriție

Rezumat. Industria viti-vinicolă produce cantități mari de produse secundare, inclusiv tescovină, ciorchine și sedimente de drojdii. Este important să fie dezvoltate noi strategii de reducere a deșeurilor și totodată valorificarea produselor secundare generate prin transformarea în produse cu valoare adăugată. Subproduse de vinificație sunt o sursă importantă de compuși bioactive. Drojdiile reziduale din vinificație, considerate în mod tradițional drept deșeuri, reprezintă o sursă neconvențională de β -glucani, molecule cu proprietăți multifuncționale și valoare adăugată semnificativă. Dacă β -glucanii din cereale sunt destul de studiați, în ultimi ani sunt studiate drojdiile reziduale din industria berii, cele din vinificație abia încep să fie valorificate. β -glucani fac parte din clasa polizaharidelor care sunt polimeri ai glucozei cu diferite legături glicozidice. Acest articol explorează oportunitățile de valorificare a drojdiilor reziduale, în special, cele mai eficiente metode de extragere a β -glucanilor, metodele de purificare și determinarea gradului de puritate a β -glucanilor extrași. Se investighează provocările și oportunitățile legate de diversele aplicații ale β -glucanilor obținuți din drojdii, incluzând: industria alimentară, farmaceutică, cosmetică și altele.

Cuvinte cheie: vinificație, drojdii reziduale, β -glucani, extragere, purificare

Introducere

Se cunoaște că 100 kg de struguri procesați generează aproximativ 20–25 kg de tescovină, 3–5 kg de tulpini și 8–10 kg de sediment de drojdie, în funcție de soiul de struguri și de metodele de vinificare aplicate [1]. Sedimentul de drojdie de vin poate fi clasificat în trei grupe în funcție de stadiul de vinificare: drojdie din prima și a doua fermentare, care se formează în timpul fermentației alcoolice și malolactice, și drojdiile de vin de maturare, formate în timpul maturării vinului. Pe de altă parte, sedimentele de drojdii de vin pot fi clasificate și în funcție de dimensiunea particulelor: sedimentele de drojdii grele (între 100 μ m și 2 mm, care se depun în 24 de ore) și ușoare (<100 μ m, între 1 și 24 μ m, și care rămân în suspensie la cel puțin 24 de ore după agitare) [2].

1. Prezentarea generală a drojdiilor reziduale din vinificație

Sedimentul de drojdie de vin este definită ca „sedimentul care se depune în rezervoarele de vinificație după fermentare, în timpul depozitării sau după tratament autorizat sau care se obține după filtrarea sau centrifugarea vinului” [3]. Dacă drojdiile reziduale din industria berii sunt deja valorizate pentru extragerea β -glucanilor, a extractele de drojdie sau drojdia de bere uscată, sedimentul de drojdii reziduale din vinificație sunt utilizate în mare parte pentru recuperarea alcoolului etilic și acidului tartric [4]. Figura 1 ilustrează etapele vinificației și tipurile de subproduse generate în fiecare etapă.

2. Compoziția biomasei de drojdii de vinificație

Compoziția sedimentului depinde de mai mulți factori, precum condițiile de mediu, regiunile de origine și caracteristicile agronomice ale acestora, soiul de struguri și timpul de maturare a vinului [2]. Sedimentul de drojdie de vin este format din partea lichidă și partea solidă. Frația solidă este

o combinație de drojdii, acizi organici (în principal acid tartric), carbohidrați insolubili (cum ar fi materiale celulozice sau hemicelulozice), săruri anorganice, lignină, proteine, compuși fenolici, pulpă și alte părți ale strugurilor. Frația lichidă este compusă în principal din etanol și acizi organici, cum ar fi acidul lactic și acetic [5].

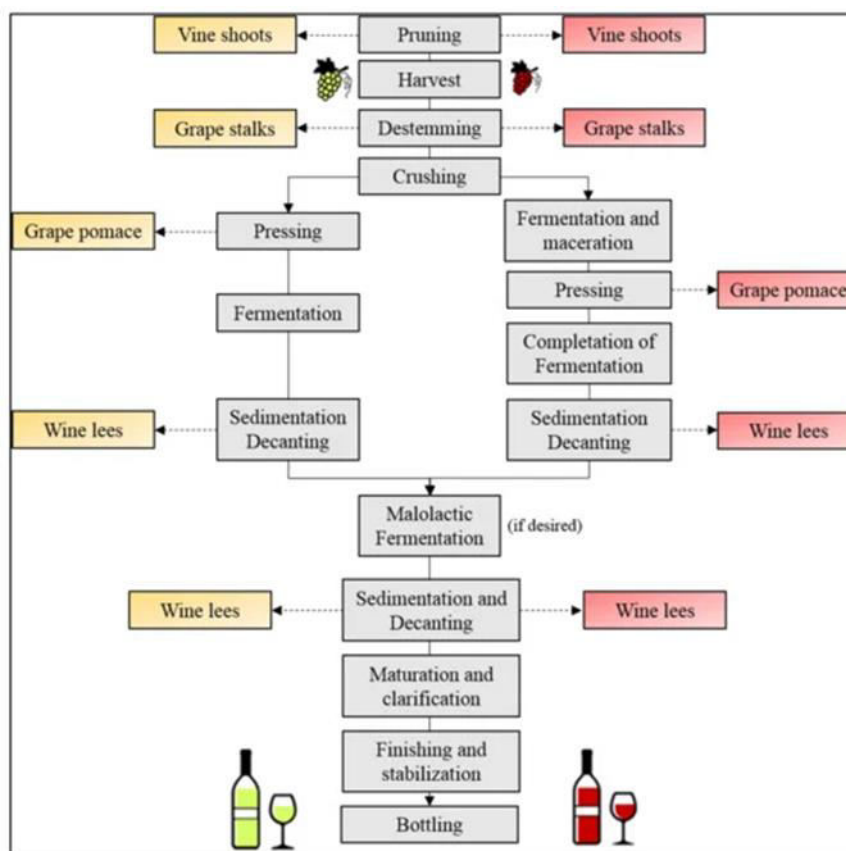


Figura 1. Schema proceselor de vinificație și deșeurile solide de vin [4]

3. Obținerea β -glucanilor din drojdii reziduale

β -glucani se găsesc în peretele celular al celulei de drojdie și este format 85%–90% dintr-un amestec de manani solubili în apă, 10–48% glucani solubili și 15–48% insolubili în alcali, precum și cantități minore de chitina. Datorită rigidității și grosimii peretelui, celula de drojdie *S. cerevisiae* este rezistentă la acțiunea litică și unele procese singulare nu sunt foarte eficiente pentru a sparge peretele celular [6]. Pentru obținerea β -glucanilor din drojdii reziduale sunt nevoie de mai multe etape, care sunt prezentate în Figura 2.



Figura 2. Etapele de extragere a β -glucanilor [7]

3.1. Pretratate

Pentru a elimina alți compuși și a asigura siguranța alimentară, drojdia reziduală trebuie supusă unor tratamente preventive înainte de extragerea β -glucanilor. Prin urmare, este necesar ca nămolul de drojdie să fie mai întâi centrifugat pentru a îndepărta partea lichidă. Sedimentul trebuie suspendat în apă și trecut prin site micrometrice pentru a îndepărta componentele de tescovine care mai pot rămâne [8].

3.2. Liza celulei de drojdie

Distrugerea celulelor este necesară pentru extracția și recuperarea produselor dorite, deoarece distrugerea celulelor îmbunătățește semnificativ recuperarea produselor biologice. Distrugerea celulelor nu poate fi considerată un proces izolat, deoarece afectează proprietățile fizice ale suspensiei celulare, influențând astfel indirect procesele ulterioare din aval. Cele mai răspândite metode de liza a celulelor de drojzii sunt ilustrate în Figura 3.

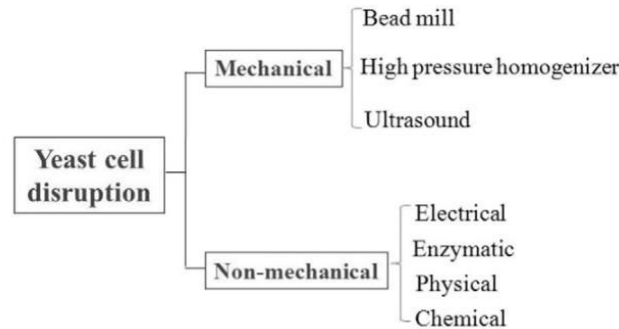


Figura 3. Tipurile de liza a celulelor de drojzii [7]

Eficiența ruperii celulelor a fost determinată ca diferența dintre greutatea suspensiei de 5 ml după uscare, înainte și după liza celulelor (ecuația (1)):

$$\text{Eficiența întreruperii} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

unde m_0 este biomasa uscată inițială înainte de liză și m_1 este biomasa uscată reziduală după liză [7].

3.3. Metode de extragere a β -glucanilor din drojdiile reziduale de vinificație

După liza celulelor de drojzii, urmează extragere propriu zisă a β -glucanilor din peretele celular. Cele mai utilizate metode de extragere sunt: metoda de extragere acido-bazică, metoda de extragere cu apa fierbinte/ omogenizare la presiune înaltă, extragerea enzimatică, extragerea asistată cu ultrasunete, extracție asistată cu microunde.

3.3.1. Metoda de extragere acido-bazică

Una dintre cele mai frecvent utilizate și mai sigure metode de extracție este extracția alcalină. Procesul de extragere este în mai multe etape și implică tratarea unui volum de suspensie celulară la cinci volume de hidroxid la temperaturi ridicate (+90°C). După îndepărtarea supernatantului, care conține proteine, lipide și acizi nucleici, se utilizează un tratament cu acid - în special, acid acetic în aceeași proporție de volum - pentru a îndepărta glicogenul și compușii amorfi [19]. Pe lângă NaOH și CH₃COOH se mai folosesc și alte combinații de baza-acid, precum: NaOH/HCl, NaOH/NaClO și NaOH + NaClO/DMSO [9].

3.3.2. Metoda de extragere cu apă fierbinte/omogenizarea la presiune înaltă

Această metodă utilizează apă fierbinte pentru a extrage β -glucanii din peretele celular al drojdiei. Este o abordare mai simplă în comparație cu alte metode, dar poate avea o puritate mai mică sau poate necesita o prelucrare ulterioară. Inițial suspensia de biomasa de drojzii este încălzită până la +121°C timp de 4 ore și apoi răcită la +45°C, după care este omogenizată cu un omogenizator de înaltă presiune [10].

3.3.3. Extragerea enzimatică

Ca și metoda descrisă mai sus această este folosită în combinație cu alte metode și are ca scop înlăturarea proteinelor și a lipidelor din suspensie. Astfel suspensia de drojdie este încălzită la +45 C și incubată cu adaos, mai întâi de protează, urmată de centrifugare, după care se efectuează incubarea cu adaos de lipaze, la fel urmată de centrifugare [10].

3.3.4. Tratarea cu solvenți organici

Pe lângă apă fierbinte, o serie de solvenți organici pot fi utilizați pentru extragerea β -glucanilor din drojdie. Fiecare solvent are propriile avantaje și dezavantaje, influențând randamentul, puritatea și proprietățile β -glucanilor obținuți. În calitate de solvent sunt utilizați etanolul [11], izopropanol, eter de petrol [12] sau acetone [10].

3.3.5. Extragerea asistată cu ultrasunete

Extragere asistată cu ultrasunete este considerată o tehnică eficientă pentru extragerea polizaharidelor bioactive din resursele naturale. Extragerea asistată cu ultrasunete are mai multe avantaje față de metodele tradiționale, precum creșterea difuziei, având un timp de extragere scurt fiind eficient și ecologic. În general, eficiența extragerii asistate cu ultrasunete este influențată de diverși factori, cum ar fi amplitudinea ultrasunetelor, timpul de extragere și raportul dintre lichid și materia primă, iar efectele acestora pot fi independente sau interactive [13], [14]. Cele mai răspândite frecvențe aplicate pentru extragerea β -glucanilor din drojdiile reziduale sunt: 22 kHz [15], 20 kHz [16], 40 kHz [17]. Combinarea mai multor metode este cea mai utilizată deoarece permite extragerea mai eficientă a β -glucanilor.

3.4. Purificarea finală

După procesul de extracție, probele trebuie supuse mai multor etape de purificare pentru a elimina alte substanțe precum proteine, compuși fenolici, monozaharide, aminoacizi sau alte molecule înrudite. Purificarea este necesară pentru a atinge valori de puritate de 80% a β -glucanilor din drojdiile, stabilită de UE prin Decizia (EU) 2017/2048 în 2017 [18]. Metoda de purificare poate fi repetarea metodei de extragere sau o metodă alternativă față de extragere. După cum arată studiile, cele mai eficiente metode de purificare (95.25%) sunt autoclavarea (tratarea la +125°C a suspensiei de 13% (g/g) timp de 5 ore) combinată cu purificarea enzimatică, precedată de extragere acido-bazică. La fel rezultate satisfăcătoare a arătat purificarea prin omogenizarea la presiune înaltă, urmată de tratarea cu acetone și proteaze (93.12%), precedată de extragerea cu apă fierbinte [19].

3.5. Uscarea

Pentru depozitarea β -glucanilor extrași pot fi aplicate 3 metode de conservare: uscare la aer, uscare prin pulverizare și liofilizare. Uscarea prin pulverizare este efectuată la temperaturi de intrare de +180°C. Liofilizarea sedimentului se efectuează prin congelarea la - 80°C, timp de 24h, urmata de liofilizarea vacuum la - 50°C, timp de 24h [20].

Determinarea conținutului de β -glucani extrași

Pentru a înțelege cât de eficientă a fost metoda aplicată de extragere a β -glucanilor este nevoie de a determina conținutul acestora în produsul obținut. Una din metodele de analiză este utilizarea unui kit enzimatic specific pentru glucani. Conținutul de β -glucani obținut este determinat cu ajutorul formulei (ecuația (2)):

$$B\text{-glucan} = AE \times F \times \frac{10.836}{W} \quad (2)$$

unde AE este absorbanta față de martor, F este conversia de la absorbanta la standardul μg (150 μg de D-glucoză) împărțit la absorbanta GOPOD a acestor 150 μg , iar W este greutatea probei analizate în mg, 10,836 -constant [7].

4. Aplicații ale β -glucanilor din drojdii reziduale

Proprietățile bioactive, efectele prebiotice, antioxidante, antitumorale și de reglare a lipidelor și glucozei din sânge a făcut din β -glucani ingrediente atractive pentru alimente funcționale. Pe lângă rolul său în nutriție și sănătate, mulți cercetători folosesc β -glucani pentru capacitatea lor de stabilizare în produse precum supe, sosuri și băuturi [21]. În produsele lactate sunt utilizate în calitate de texturizanti [22] și substituent parțial al grăsimilor în mezeluri sau brutărie [18, 23].

Concluzii

Drojdii reziduale din vinificație reprezintă o sursă valoroasă de β -glucani cu proprietăți funcționale multiple. Extractele de β -glucani din drojdii pot fi utilizate în diverse domenii, oferind o gamă largă de beneficii. Această lucrare sintetizează etapele principale și metodele de extragere a β -glucanilor din peretele celular al drojdiilor reziduale. Putem notifica că sunt necesare studii suplimentare a drojdiilor reziduale din vinificație pentru a putea fi valorificate în mai multe etape, extrăgând compuși valoroși.

Mulțumiri. The research was supported by Institutional Project 020405 “*Optimizing food processing technologies in the context of the circular bioeconomy and climate change*”, Bio-OpTehPAS being implemented at the Technical University of Moldova.

Referințe

- [1] Z. Ye, Y. Qin, R. Harrison, R. Hider, și A. E.-D. A. Bekhit, „Characterization of Bioactive Compounds in Lees from New Zealand Wines with Different Vinification Backgrounds”, *Antioxidants*, vol. 11, nr. 12, p. 2335, nov. 2022, doi: 10.3390/antiox11122335.
- [2] M. J. Jara-Palacios, „Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds”, *Antioxidants*, vol. 8, nr. 2, p. 45, feb. 2019, doi: 10.3390/antiox8020045.
- [3] A. Chioru *et al.*, „Physico-Chemical and Microbiological Profile of Wine Lees of Red Wines from Local Grapes Varieties”, *FNS*, vol. 14, nr. 11, pp. 1133–1148, 2023, doi: 10.4236/fns.2023.1411071.
- [4] A. Nanni, M. Parisi, și M. Colonna, „Wine By-Products as Raw Materials for the Production of Biopolymers and of Natural Reinforcing Fillers: A Critical Review”, *Polymers*, vol. 13, nr. 3, p. 381, ian. 2021, doi: 10.3390/polym13030381.
- [5] M. De Luca *et al.*, „Wine Lees as Source of Antioxidant Molecules: Green Extraction Procedure and Biological Activity”, *Antioxidants*, vol. 12, nr. 3, p. 622, mar. 2023, doi: 10.3390/antiox12030622.
- [6] I. Avramia și S. Amariei, „Spent Brewer’s Yeast as a Source of Insoluble β -Glucans”, *IJMS*, vol. 22, nr. 2, p. 825, ian. 2021, doi: 10.3390/ijms22020825.
- [7] I. Avramia și S. Amariei, „A Simple and Efficient Mechanical Cell Disruption Method Using Glass Beads to Extract β -Glucans from Spent Brewer’s Yeast”, *Applied Sciences*, vol. 12, nr. 2, p. 648, ian. 2022, doi: 10.3390/app12020648.
- [8] X. Tian, P. Yang, și W. Jiang, „Effect of Alkali Treatment Combined with High Pressure on Extraction Efficiency of β -d-Glucan from Spent Brewer’s Yeast”, *Waste Biomass Valor*, vol. 10, nr. 5, pp. 1131–1140, mai 2019, doi: 10.1007/s12649-017-0130-8.
- [9] A. E.-N. Zohri, H. Moubasher, H. Abdel-Hay, și M. Orban, „Biotechnological β -glucan Production from Returned Baker’s Yeast and Yeast Remaining after Ethanol Fermentation”, *Egyptian Sugar Journal*, vol. 13, nr. 0, pp. 29–43, dec. 2019, doi: 10.21608/esugj.2019.219349.
- [10] X. Liu, Q. Wang, S. Cui, și H. Liu, „A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Food Hydrocolloids*, vol. 22, nr. 2, pp. 239–247, mar. 2008, doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.11.008.
- [11] Ó. Benito-Román, V. H. Alvarez, E. Alonso, M. J. Cocero, și M. D. A. Saldaña, „Pressurized aqueous ethanol extraction of β -glucans and phenolic compounds from waxy

- barley”, *Food Research International*, vol. 75, pp. 252–259, sep. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.06.006.
- [12] M. Magnani, C. M. Calliari, F. C. de Macedo, M. P. Mori, I. M. de Syllos Cólus, și R. J. H. Castro-Gomez, „Optimized methodology for extraction of (1 → 3)(1 → 6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, nr. 4, pp. 658–665, nov. 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.05.023.
- [13] A. Raza, F. Li, X. Xu, și J. Tang, „Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 94, pp. 335–344, ian. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.033.
- [14] Y. Fu *et al.*, „Quantitative Evaluation of Ultrasound-Assisted Extraction of 1,3-β-glucans from *Dictyophora indusiata* Using an Improved Fluorometric Assay”, *Polymers*, vol. 11, nr. 5, p. 864, mai 2019, doi: 10.3390/polym11050864.
- [15] H. Yuan, Y. He, H. Zhang, și X. Ma, „Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of yeast β-glucan catalyzed by β-glucanase: Chemical and microstructural analysis”, *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 86, p. 106012, mai 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106012.
- [16] A. Bzducha-Wróbel, S. Błażej, A. Kawarska, L. Stasiak-Róžańska, I. Gientka, și E. Majewska, „Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for β-Glucan Isolation”, *Molecules*, vol. 19, nr. 12, pp. 20941–20961, dec. 2014, doi: 10.3390/molecules191220941.
- [17] F. Karslıoğlu, S. Ertunç, Z. YiLmazer HiTiT, și B. Akay, „Investigation of extraction method effect on yeast beta glucan production”, *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, dec. 2021, doi: 10.46239/ejbcs.734046.
- [18] A. Chioru și A. Chirsanova, „B-Glucans: Characterization, Extraction Methods, and Valorization”, *FNS*, vol. 14, nr. 10, pp. 963–983, 2023, doi: 10.4236/fns.2023.1410061.
- [19] S. C. Jaehrig *et al.*, „Antioxidative activity of (1→3), (1→6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media”, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, nr. 5, pp. 868–877, iun. 2008, doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.004.
- [20] Vassileios Varelas, P. Tataridis, M. Liouni, și T. Nerantzis, „Application of different methods for the extraction of yeast β-glucan”, *e-Journal of Science & Technology (e-JST)*, pp. 75–89, 2016.
- [21] A. Ahmad, F. M. Anjum, T. Zahoor, H. Nawaz, și S. M. R. Dilshad, „Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 52, nr. 3, pp. 201–212, mar. 2012, doi: 10.1080/10408398.2010.499806.
- [22] V. Chiozzi *et al.*, „Biotechnological Addition of β-Glucans from Cereals, Mushrooms and Yeasts in Foods and Animal Feed”, *Processes*, vol. 9, nr. 11, p. 1889, oct. 2021, doi: 10.3390/pr9111889.
- [23] A. Żbikowska *et al.*, „Microbial β-glucan Incorporated into Muffins: Impact on Quality of the Batter and Baked Products”, *Agriculture*, vol. 10, nr. 4, p. 126, apr. 2020, doi: 10.3390/agriculture10040126.