

STUDII DE EFICIENTIZARE A PRELUCRĂRII SEDIMENTELOR DE DROJDII DE LA VINIFICAȚIE

Oleg CHISELIȚA

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

In the present article the data of purification procedures, drying and autolysis intensification of winery yeasts biomass is shown. The follow methods for intensification have been used: the different water volumes utilization, different NaHCO_3 concentration and sediments washing time, autolysis induction factors, different temperatures, autolysis time and biomass drying time.

Introducere

În timpul de față produsele biotehnologiilor levuriene pătrund tot mai mult în diferite domenii ale economiei, participând la producerea produselor alimentare, băurilor alcoolice și nealcoolice, biocombustibilului, chimicalelor, fermenților industriali, suplimentelor furajere, preparatelor medicale, în agricultură, asigurând și rezolvarea multor probleme ecologice [1].

Un aspect important al utilizării drojdiilor este obținerea autolizatorilor din biomasa lor. Valoarea biologică și nutritivă înaltă a autolizatorilor de drojdii se explică prin faptul că în timpul procesului de autoliză, sub acțiunea propriilor fermenți, are loc distrugerea biopolimerilor drojdiei, ceea ce mărește accesibilitatea substanțelor biologice active din biomasă. În baza autolizatorilor de drojdii sunt elaborate o serie de suplimente alimentare biologice active „Нагипол”, „Авими́н”, a căror eficacitate în calitate de preparate bioreglatorii a fost demonstrată printr-un șir de experimente clinice [2].

Una dintre variantele optimale pentru obținerea preparatelor proteico-vitaminice este autoliza (fermentoliza) biomasei diferitelor tulpini de drojdii. Pentru a asigura necesitățile economiei în preparate proteico-vitaminice de înaltă calitate la un preț convenabil pentru beneficiari, se propun următoarele metode: 1) Realizarea autolizei numai cu utilizarea fermenților nativi caracteristici culturii date și respectarea parametrilor de timp și temperatură; 2) Utilizarea în calitate de materie primă a sedimentelor de drojdii de la uzinele de bere și vinificație, fiind exclusă aruncarea lor la canal; 3) Producerea preparatelor proteico-vitaminice cu destinație furajeră și alimentară, însoțită de cumulara tehnologiilor de autoliză a drojdiilor și de obținere a siropurilor glucozo-galactozice [3].

O fază importantă în procesul de prelucrare a sedimentelor de drojdii este purificarea lor (eliminarea impurităților, rămășițelor de alcool, sărurilor acidului tartric, diminuarea acidității) și uscarea ulterioară a autolizatorilor în condiții optime de temperatură pentru a asigura conținutul maxim al substanțelor biologice active în biomasa uscată. Reieșind din cele expuse anterior, am inițiat o serie de cercetări cu scopul eficientizării prelucrării sedimentelor de drojdii de la vinificație.

Material și metode

Ca material de cercetare au servit sedimente de drojdii de la vinurile de masă seci alb (Chardonnay) și roșu (Cabernet) oferite de Institutul Național pentru Viticultură și Vinificație din Republica Moldova.

Pentru selectarea condițiilor de spălare, obținere a plasmolizatului și de uscare a sedimentelor drojdiilor vinicole s-au cercetat unele procedee care au la bază utilizarea diferitelor volume de apă, soluții de NaHCO_3 , regimuri de temperatură și durate de timp propuse în brevetele de invenții [4-7].

Proteina s-a determinat cantitativ conform metodei Lowry bazată pe determinarea intensității culorii soluției de proteină [8].

Componența azotului aminic s-a identificat cu ajutorul analizatorului AAA-339 „Microtehnica” (Cehia) utilizând metoda clasică [9].

Determinarea substanței uscate s-a realizat conform metodei gravimetrice descrise în literatură [10].

Rezultate și discuții

În scopul stabilirii parametrilor optimi de purificare (eliminarea impurităților, rămășițelor de alcool, diminuarea acidității) a drojdiilor din sedimentele vinicole, acestea au fost supuse spălării cu:

a) apă în proporție de 1:3; 1:5, la temperaturi de 5, 10, 15°C, timp de 10, 15, 30, 40 minute, urmată de separarea biomasei prin decantare;

b) soluție de bicarbonat de sodiu de 1, 5, 10% în proporție de 1:2, urmată de separarea biomasei prin decantare.

Aprecierea eficienței s-a făcut după valorile pH-ului biomasei (indice utilizat la elaborarea furajelor și suplimentelor furajere). Ca martor a servit pH-ul inițial al sedimentelor de drojdii. Din analiza datelor se poate constata că valorile inițiale ale pH-ului sedimentelor variază în limitele 3,79 – 3,82.

Valorile pH-ului practic rămân neschimbate în probele cu diferite durate de spălare cu apă, raporturi sediment: apă sau temperaturi ale apei utilizate pentru spălare. Tratamentul sedimentelor de drojdii cu soluția de bicarbonat de sodiu de 1, 5, 10%, în proporție de 1:2, a dus la diminuarea acidității biomasei de drojdii, ceea ce a îmbunătățit calitățile ei gustative. Valori optime ale pH-ului (ce corespund normelor de elaborare a furajelor și suplimentelor furajere [11,12]) s-au obținut pentru varianta 3 (drojdii vin roșu) și varianta 4 (drojdii vin alb), în care a fost utilizată soluția de bicarbonat de sodiu (NaHCO_3) de 1% sau de 5% (Fig.1, A și B).

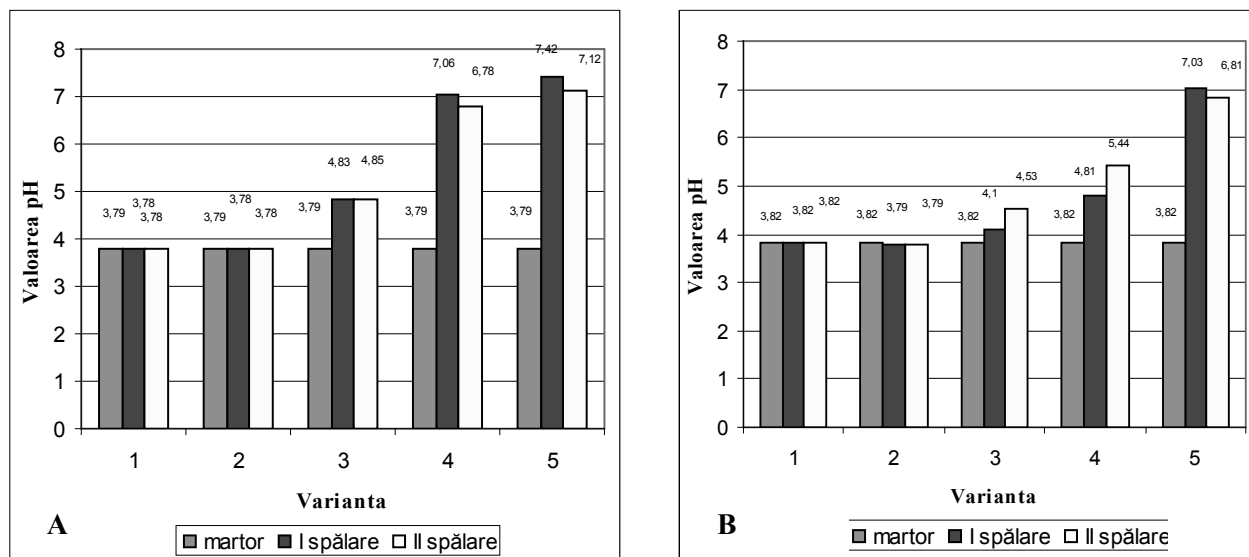


Fig.1. Valorile pH-ului sedimentelor de drojdii vinicole de la vinul roșu A și alb B, purificate prin spălare:
 1 – Sediment: apă (1:3); 2 – Sediment: apă (1:5); 3 – Sediment: NaHCO_3 de 1% (1:2);
 4 – Sediment: NaHCO_3 de 5% (1:2); 5 – Sediment: NaHCO_3 de 10% (1:2).

Astfel, în scopul evitării majorării prețului final al produselor, pentru purificarea sedimentelor de drojdii vinicole de impurități, rămășițe de alcool, diminuarea acidității, se propun, în dependență de scopul utilizării produsului finit, procedee ce includ:

a) spălarea biomasei de drojdii cu apă în proporție de 1:3, timp de 10-15 minute (1-2 ori). Decantarea fazei lichide;

b) spălarea biomasei de drojdii cu soluție de bicarbonat de sodiu de 1% sau de 5% în proporție de 1:2, urmată de separarea biomasei de supernatant prin decantare.

În al doilea set de experimente, obiectivul de bază al cercetărilor a fost de a spori valoarea nutritivă a suplimentului furajer.

Pentru optimizarea condițiilor de autoliză a drojdiilor, ca material de lucru s-a folosit biomasa de drojdii de vin purificate, care a fost supusă diferitelor condiții de autoliză:

A) o parte din sediment a fost termostatat la temperatura de 37 și 55°C timp de 12, 24, 48 ore;

B) o altă parte din sediment a fost preventiv supusă congelării/decongelării, la -18°C, apoi termostatării în condiții echivalente variantei A).

Randamentul procedeele utilizate a fost estimat prin microscopia autolizatului, determinarea proteinei totale, în unele cazuri – a conținutului de azot aminic, care este proporțional cantității aminogrupelor eliberate.

S-a constatat că valorile conținutului de proteină pentru ambele tipuri de sedimente sunt mai mari în probele obținute prin metoda de autoliză a biomasei congelate de drojdii în condițiile utilizării temperaturii de 55°C, durata de autoliză fiind 12 ore (Tabelele 1 și 2). Conținutul de proteină în probele sedimentului congelat de la vinul alb constituie 26,80 g% S.U. (substanță uscată), iar în probele sedimentului congelat de la vinul roșu – 39,96 g% S.U. Sedimentele necongelate necesită o durată mai lungă pentru autoliză, astfel că conținutul maximal de proteină s-a obținut în probele autolizate la temperatura +55°C timp de 48 ore. Ca martor au servit sedimente de drojdii de la vinul roșu și alb nesupuse autolizei. Estimarea efectuată prin microscopia autolizatelor a confirmat faptul că gradul de distrugere a peretelui celular al drojdiilor supuse autolizei la +37°C și +55°C este diferit; în acest caz, microscopia probelor autolizate poate servi ca un indiciu orientativ.

Tabelul 1

Varierea conținutului de proteină în autolizatele sedimentului de drojdie de la vinul alb în dependență de temperatură, durata autolizei și congelarea/decongelarea sedimentelor

Nr. d/o	Varianta	Sediment necongelat			Sediment congelat/decongelat		
		Proteină, g% S.U.	T _{F(95%)}	% – Martor	Proteină, g% S.U.	T _{F(95%)}	% – Martor
1	Martor	19,60±0,19	0,85	100	20,90±0,57	2,47	100
2	37 °C / 12 ore	17,37±1,02	4,42	88,6	20,93± 0,65	2,83	100
3	37 °C / 24 ore	14,01±0,82	3,53	71,5	20,64 ±1,48	6,37	98,7
4	37 °C / 48 ore	17,58±0,20	0,86	89,6	20,35 ±1,96	8,45	97,3
5	55 °C / 12 ore	23,86±1,24	5,36	121,7	26,80 ±0,14	3,63	128,2
6	55 °C / 24 ore	24,63±2,32	9,98	125,7	26,34 ±0,72	3,11	126,0
7	55 °C / 48 ore	25,05±2,08	8,98	127,8	24,76 ±0,87	3,77	118,5

Valorile criteriului autenticității teoretice $T_{st(95\%)} = 2,78$

Tabelul 2

Varierea conținutului de proteină în autolizatele sedimentului de drojdie de la vinul roșu în dependență de temperatură, durata autolizei și congelarea/decongelarea sedimentelor

Nr d/o	Varianta	Sediment necongelat			Sediment congelat/decongelat		
		Proteină, g% S.U.	T _{F(95%)}	% – Martor	Proteină, g% S.U.	T _{F(95%)}	% –Martor
1	Martor	31,83 ±0,46	1,99	100	35,69± 0,35	1,51	100
2	37 °C / 12 ore	26,21 ±1,38	5,94	82,3	30,82 ±4,59	19,77	86,3
3	37 °C / 24 ore	27,00± 0,93	4,01	84,8	29,66 ±4,13	17,77	83,1
4	37 °C / 48 ore	26,86 ±1,40	6,02	84,4	-	-	-
5	55 °C / 12 ore	31,90 ±0,57	2,47	100,2	39,96 ±0,32	3,39	112,0
6	55 °C / 24 ore	35,15 ±0,45	1,93	110,4	40,32 ±2,82	12,14	112,9
7	55 °C / 48 ore	36,38 ±0,30	1,33	114,3	36,28 ±1,50	6,45	101,6

Valorile criteriului autenticității teoretice $T_{st(95\%)} = 2,78$

În conformitate cu rezultatele obținute, s-a stabilit că autoliza sedimentelor de drojdiei vinicole decurge mai eficient conform procedeelelor:

a) pentru sedimentele de drojdiei preventiv congelate – autoliza la temperatura de +55 °C timp de 12 ore, amestecare periodică;

b) pentru drojdiile necongelate – autoliza la temperatura de +55 °C timp de 48 ore, amestecare periodică.

În următorul set de experimente pentru sporirea gradului de autoliză și scindare a proteinei ca factor de inducție al autolizei celulelor de drojdie s-a folosit acidul acetic glacial și temperatura de +55°C. Au fost cercetate 5 variante:

Varianta I (martor) – s-a utilizat **lizocima**, enzimă folosită în industria alimentară pentru producerea suplimentelor nutritive [13].

Drojdiile sedimentelor vinicole, păstrate timp de 2-3 luni la temperatura de 12-20°C, se încălzesc până la 37°C, se adăugă în masa lor **0,1- 0,2% lizocimă**, se amestecă și se expun la temperatura dată 1,5-2,0 ore. În continuare, se adăugă **zahărul în proporție de 1:2**, se omogenizează la 50-55°C; amestecul obținut se menține 2-3 zile.

Varianta II – s-a utilizat **3 ml acid acetic glacial la 1 l suspenzie**.

Varianta III – s-a utilizat **5 ml acid acetic glacial la 1 l suspenzie**.

Varianta IV – s-a utilizat numai temperatura de +55°C.

Varianta V – s-a utilizat **soluție de 1% de NaHCO₃** și temperatura de +55°C.

În toate variantele experimentale biomasa se purifică prin spălare cu apă în raport 1:3, timp de 5-10 minute (1-2 ori). După decantarea fazei lichide, suspensia de drojdie (biomasă+apă – 1:4 după substanță uscată) se supune autolizei la temperatura +55°C cu adăugarea componentilor respectivi. Toate variantele au fost supuse autolizei timp de 4, 8, 12, 24 și 48 ore.

Produsul obținut se usucă în dulapul cu vid la +55° ...+ 60°C până la substanța absolut uscată (S.A.U.) de 90%. Controlul procesului se efectuează după valorile azotului aminic și ale proteinei.

Rezultatele dinamicii valorilor azotului aminic, proteinei și pH-ului, în dependență de durata procesului de autoliză a drojdiilor, sunt expuse în Figurile 2-4.

Valori maxime ale conținutului de azot aminic în autolizat s-au evidențiat în varianta III (în care s-a utilizat 5 ml acid acetic glacial la 1 l suspensie). Valorile azotului aminic constituie 3,0-3,52 g% S.A.U., ceea ce depășește mărtoșul cu 20-44,9% (Fig.2). În varianta mărtoș, în care ca factor de inducție a autolizei s-a utilizat lizocima, valorile azotului aminic constituie 2,07- 2,77 g% S.A.U. Rezultatele obținute relevă faptul că acidul acetic contribuie la sporirea randamentului procesului de autoliză și scindare a proteinei drojdiilor din sedimentele vinicole.

În cazul analizei rezultatelor dinamicii conținutului de proteină s-a constatat că în autolizatele variantelor experimentale II-V scindarea proteinelor este mai accentuată față de varianta I (mărtoș) (Fig.3).

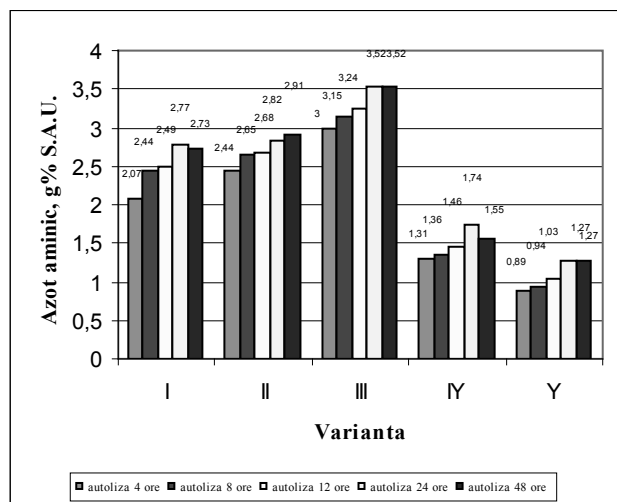


Fig.3. Dinamica valorilor proteinei (g% S.A.U.), în dependență de durata procesului de autoliză a drojdiilor de la vinul alb.

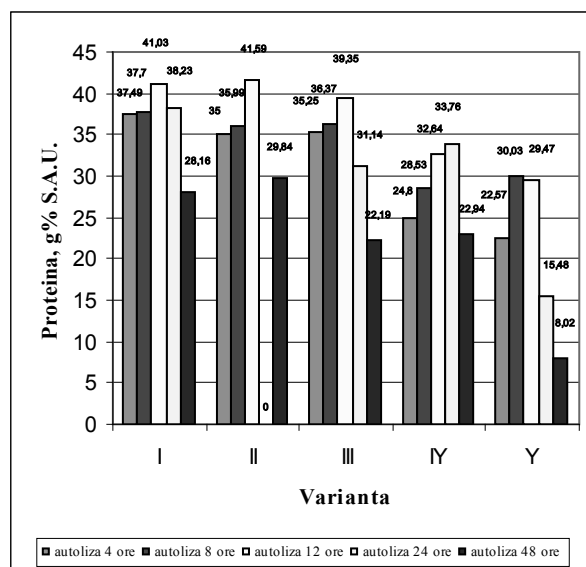


Fig.2. Dinamica valorilor azotului aminic (g% S.A.U.), în dependență de durata procesului de autoliză a drojdiilor de la vinul alb.

Datele obținute la analiza pH-ului autolizateelor variantelor experimentale nu au prezentat diferențe semnificative față de mărtoș (Fig.4).

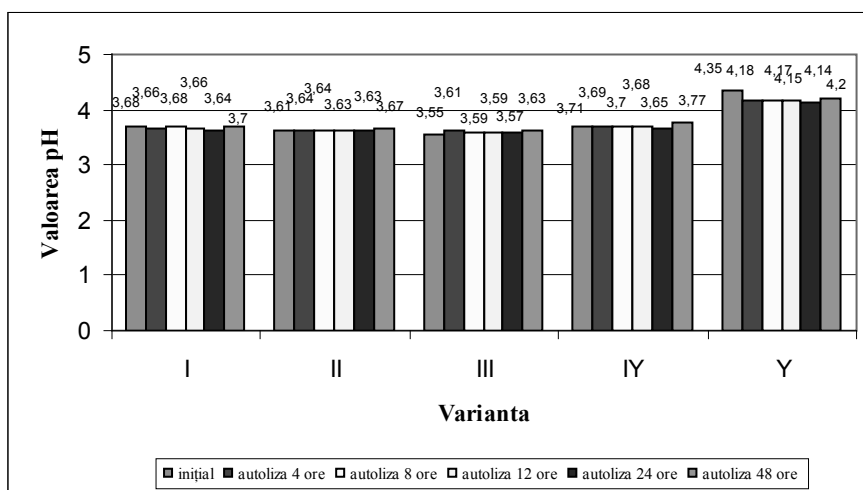


Fig.4. Dinamica valorilor pH-ului în dependență de durata procesului de autoliză a drojdiilor de la vinul alb.

Reieșind din sinteza rezultatelor obținute, în conformitate cu informația existentă, putem aprecia că variantele optime de obținere a autolizatului din drojdiile vinicole sunt variantele cu utilizare a 3 și 5 ml acid acetic glacial și a temperaturii de +55°C timp de 4 și 8 ore.

Optimizarea condițiilor de uscare și obținere a concentratului de celule din drojdiile de la vinul roșu și alb

Pentru a standardiza produsul finit după conținutul de substanță uscată a fost utilizat procedeul de uscare în dulapul de uscare cu vid (SPT-200).

În acest scop, au fost cercetate 3 variante:

1) concentrarea prin evaporarea lichidului din fugatul autolizei la temperatura de 65°C timp de 4, 8, 12 ore, urmată de filtrarea și sterilizarea în autoclav, în regim moderat, câte 30 min. 3 zile consecutiv, pentru a putea fi propus ca produs lichid bogat în substanțe biologice active;

2) uscarea fracției pereților celulari la temperatura de 65 și 105°C, timp de 12-24 ore;

3) uscarea autolizatului integral la temperatura de 65 și 105°C, timp de 12-24 ore.

Gradul de uscare a fracției pereților celulari și autolizatului integral s-a evaluat după conținutul de substanță uscată (greutatea părții solubile a autolizatului) în raport cu valorile inițiale.

Cercetările au demonstrat că conținutul de substanță uscată de 90% de la masa inițială s-a obținut în regimul de uscare pentru:

a) concentrarea **fugatului autolizei** prin evaporare (pentru a spori conținutul de principii bioactive la o unitate de produs finit) la temperatura de +65°C, timp de 4-8 ore.

b) **pereții celulari** la temperatura de +105°C, timp de 12 ore.

c) **autolizatului integral** la temperatura de +105°C, timp de 12-18 ore.

Concluzii

1. Pentru purificarea sedimentelor de drojdii vinicole de impurități, în dependență de scopul utilizării produsului finit, se propun procedeele ce includ: spălarea biomasei de drojdii cu apă în proporție de 1:3 sau cu soluție de bicarbonat de sodiu de 1 sau de 5% în proporție de 1:2, timp de 10-15 minute, urmată de separarea biomasei de la supernatant prin decantare.

2. Sporirea gradului de autoliză a sedimentelor de drojdii vinicole se obține la aplicarea procedurii ce include utilizarea a 3 sau a 5 ml acid acetic glacial la 1 l suspensie de drojdii și autoliza la temperatura de +55°C timp de 4-8 ore, cu agitare periodică. Avantajul procedurii constă în sporirea valorilor azotului aminic până la 3,0-3,52 g% S.A.U., ceea ce depășește maritorul cu 20,0-44,9%.

3. Conținutul de substanță uscată de 90% de la masa inițială a drojdiilor se obține în regimul de uscare pentru:

a) concentrarea **fugatului autolizei** la temperatura de +65°C, timp de 4-8 ore;

b) **pereții celulari** la temperatura de +105°C, timp de 12 ore;

c) **autolizatului integral** la temperatura de +105°C, timp de 12-18 ore.

Referințe:

- Pretorius Isak S., du Toit Maret, van Rensburg Pierre. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century // Food Technol. and Biotechnol. - 2003. – Vol.41. - No1. - P.3-10.
- Яшин Т.А., Волфович Д.И., Куликова В.П. Биологически активные пищевые добавки на основе дрожжевых автолизатов // III Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 14-18 марта, 2005: Материалы конгресса. Ч.2. - Москва, 2005, с.173.
- Луканин А.В., Кривой Б.А., Вышелесский А.Б. Автолизаты – белково-витаминные и кормовые добавки // III Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 14-18 марта, 2005: Материалы конгресса. Ч.2. - Москва, 2005, с.268.
- Дмитриев А.Д., Дмитриев С.А., Кочкина И.Б. и др. Способ получения биологически активной пищевой добавки / Авторское свидетельство RU 2 105 503 от 27.02.1998.
- Зотов Е.А., Борисов О.А., Никульшин В.Н. и др. Способ получения биологически активных добавок / Авторское свидетельство RU 2 070 399 от 20.12.1996.
- Крылов И.А., Иванова Н.Г., Эль-Регистан Г.И., и др. Способ получения биологически активных веществ / Авторское свидетельство RU 2 136 172 от 10.09.1999.
- Латов В.К., Бабаян Т.Л., Батурина Е.Н. и др. Способ получения пищевого биологически-активного продукта переработки дрожжей / Авторское свидетельство RU 2 087 531 от 20.08.1997.
- Lowry O.H., Rosebough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. - Vol.193. - P.265-275.
- Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Пер. Овчиникова Ю.А. - Москва, 1974. - 103 с.
- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – Москва: Изд-во МГУ, 1995. - 244 с.
- Зотов Е.А., Борисов О.А., Никульшин В.Н. и др. Способ получения биологически активных добавок / Авторское свидетельство RU 2 070 399 от 20.12.1996.
- Луканин А.В., Кривой Б.А., Вышелесский А.Б. Автолизаты – белково-витаминные и кормовые добавки // III Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 14-18 марта, 2005: Материалы конгресса. Ч.2. - Москва, 2005, с.268.
- Садовой В.В., Васюкова О.Н. Способ получения пищевой добавки-обогапителя / Авторское свидетельство RU 2 248 137 от 20.03.2005.

Notă: Investigațiile au fost îndeplinite cu suportul Consiliului Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică. Proiect independent 07.411.11. INDA „Evaluarea principiilor bioactive a levurilor de la vinificație ca sursă pentru obținerea biopreparatelor”.

Prezentat la 17.02. 2009