

PROCEDEE DE EXTRAGERE DIN LEVURI A MANOPROTEINELOR ȘI PROPRIETĂȚILE LOR FIZICO-CHIMICE

Ludmila BEJENARU

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

În lucrare se propun procedee eficiente de izolare a manoproteinelor din biomasa levuriană. Procedeele cu aplicarea autolizei biomasei celulare timp de 24 de ore în combinație cu tratarea alcalină sporește cu 23,3% manoproteinele extrase comparativ cu proba martor. Sunt descrise însușirile fizico-chimice ale manoproteinelor izolate din pereții celulari levurieni.

Cuvinte-cheie: manoproteine, levuri, metode de extragere, proprietăți fizico-chimice.

PROCEDURES OF EXTRACTION OF MANOPROTEINS FROM YEAST AND THEIR PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

In the current work we propose efficient methods of manoproteins extraction from yeast biomass. The method of application of cellular biomass autolysis for 24 hours combined with alkaline treating increases the manoproteins extraction with 23.3%, compared to the control sample. Physical and chemical attributes of the isolated manoproteins from yeast cell walls are described.

Keywords: manoprotein, yeast, methods of extraction, physico-chemical properties

Introducere

Studiile privind localizarea manoproteinelor la levurile din diferite genuri au arătat că acestea reprezintă învelișul exterior al peretelui celular și susțin legături de diferită natură cu proteinele, fosfații, piruvații, acizii glucuronici [6]. Caracteristicile importante ale manoproteinelor izolate din pereții celulari de levuri, cum ar fi solubilitatea înaltă în apă, greutatea moleculară relativ mică (15-30 kDa), proprietățile antioxidante, bazate pe reducerea radicalilor reactivi de oxigen, sunt promițătoare pentru utilizarea lor în cosmetologie [7,11]. Datorită proprietăților lor specifice, manoproteinele pot fi utilizate în calitate de stabilizatori și agenți de îngroșare, înlocuindu-i astfel pe cei de origine bacteriană și vegetală [3]. O utilizare largă a manoproteinelor se reliefează în domeniul vinificației. Manoproteinele au proprietatea de a se combina cu compușii fenolici, diminuând astfel indicele total al polifenolilor. De asemenea, favorizează desfășurarea expresiei aromatice – prin mărirea senzațiilor de volum gustativ, îmbunătățind astfel caracteristicile organoleptice ale vinului. În plus, polizaharidele parietale contribuie la stabilitatea tartrică, împiedicând cristalizarea sărurilor de acid tartric [4].

Condițiile de extragere din diferite obiecte biologice a manoproteinelor pot degrada structura și compoziția acestora. Denaturarea structurii are loc la temperaturi și pH-ul ridicat, factori chimici specifici procesului de extragere. Izolarea eficientă a manoproteinelor din pereții celulari levurieni ce posedă o structură rigidă este posibilă numai prin selectarea metodelor eficiente de distrugere suplimentară a acestora. În majoritatea cazurilor, pentru dezintegrarea pereților celulari se aplică procedee legate de aplicarea ultrasunetului, congelare-decongelare, autoliză, agitare intensă cu bile de sticlă, tratare enzimatică [12].

În legătură cu cele expuse, scopul cercetărilor a constat în eficientizarea metodelor de extragere din biomasa levuriană a manoproteinelor izolate din pereții celulari ai levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 și în caracterizarea lor fizico-chimică.

Material și metode

Obiectul de studiu, medii de cultură, condiții de cultivare. A fost utilizată cultura de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 – producătoare de manoproteine, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei [5].

Cultivarea în profunzime a levurii s-a realizat pe mediul YPD (g/L): extract de levuri – 10,0; peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, pe agitator rotativ cu viteza 200 rpm., la temperatura de 25°C, gradul de aerare 80,0...83,0 mg/L, durata de cultivare submersă 120 ore. Pentru însămânțare a fost utilizat inocul în volum de 5% (2×10^6 celule/ml) [1].

Metode de cercetare. Cantitatea de biomasă a fost determinată gravimetric [8]. Viabilitatea celulelor a fost stabilită prin însămânțarea suspensiei de celule pe mediul agarizat YPD, exprimată în UFC/g (unități de

colonii formate la 1 gram biomasă). Examinarea celulelor s-a efectuat la microscop cu contrast Biolar, ocular (WF16x obiectiv 40x/0,65). Carbohidrații totali în biomasa de levuri au fost determinați spectrofotometric (UV VIS Spectrophotometer) la lungimea de undă 620 nm, cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [2]. Manoproteinele au fost determinate gravimetric conform [9]. Proteina a fost determinată spectrofotometric potrivit metodei Lowry [10]. Omogenizarea biomasei levuriene s-a efectuat la aparatul Silent Crusher M, Heidolph (2010). Conținutul de oxigen pe parcursul cultivării levurii s-a măsurat cu oximetrul portabil – Oxi-315i/SET (2008). Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a realizat computerizat cu utilizarea programului Excel, cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii ale pragului de semnificație $P \leq 0,05$.

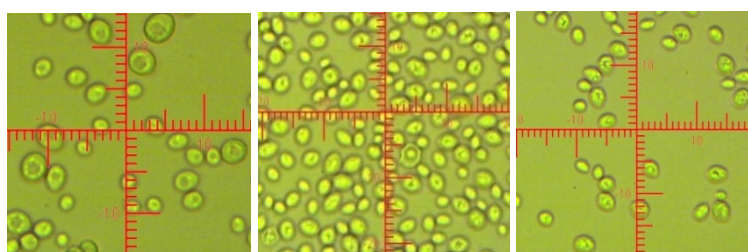
Rezultate și discuții

Inițial, s-a efectuat studiul comparativ al procedeelor de dezintegrare a pereților celulari ai levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18. Pentru realizarea acestui proces au fost utilizate diverse metode de fragmentare:

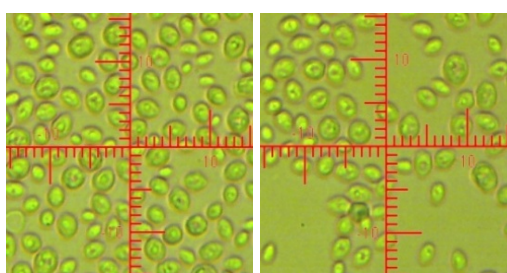
- Biomasa celulară integrală (martor)
- Autoliza la 50°C timp de 24 ore
- Autoliza la 50°C timp de 8 ore
- Omogenizare la 15000 rpm., 10 min.
- Congelare/decongelare (3 cicluri +20°C/-20°C)

Eficiența metodelor de fragmentare s-a apreciat prin următoarele analize: studierea sedimentelor prin microscopie optică, determinarea viabilității celulelor de levuri din sediment, a conținutului de carbohidrați totali în sediment, a conținutului de manoproteine în sediment.

Analiza sedimentelor prin microscopie optică a demonstrat că, practic, în toate variantele de distrugere a pereților celulari se observă celule de diverse dimensiuni, ceea ce dovedește că citoplasma este eliminată parțial (Fig.1). Informația dată necesită studii suplimentare în vederea constatării gradului de dezintegrare a peretelui celular. Viabilitatea celulelor s-a stabilit prin însămânțarea pe mediu YPD agarizat a 0,1 ml suspensie (20 mg pereți celulari + 2 ml apă distilată sterilă) din sedimentele obținute după procedura de centrifugare.



Martor Autoliză 24 ore Autoliză 8 ore



Omogenizare 10 min. Congelare/decongelare (3 cicluri)

Fig.1. Sedimente de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 supuse diferitelor procedee de dezintegrare a pereților celulari (16x40).

Rezultatele obținute după aplicarea diferitelor metode de dezintegrare sunt reflectate în Figura 1, din care concluzionăm că gradul de rupere a pereților celulari este foarte înalt la aplicarea autolizei și omogenizării, probe în care nu s-au observat colonii la însămânțarea pe mediul agarizat.

Procedeul congelare-decongelare este mai puțin eficient, gradul de distrugere a celulelor este de 94,6% (viabilitatea constituie 5,4% comparativ cu varianta martor).

În continuare, în vederea izolării manoproteinelor din pereții celulari au fost aplicate variante de lucru, în care au fost modificate procedeele de dezintegrare a peretelui celular și de tratare alcalin-acidă. În calitate de **martor (I)** a servit procedeul descris de Hong Zhi Liu [9].

Variante experimentale:

II. Autoliză cu durată de 24 ore

Amestecul din 10 g drojdie (30% s.u.) și 10 ml apă distilată se supune autolizei la 50°C timp de 24 h, apoi amestecul se încălzește la 80°C timp de 15 min., se răcește, se centrifughează. Depozitul (pereții celulari) se tratează cu 5 volume 1N NaOH timp de 2 h la temperatura de 80±5°C; supernatantul se colectează. Supernatantul se concentrează la 1/5 din volumul inițial, se adaugă etanol absolut în volum triplu pentru precipitarea manoproteinelor. Sedimentul alb se spală de 2 ori cu etanol absolut, se usucă la 50±5°C. Produsul obținut sunt manoproteinele.

III. Autoliză cu durată de 8 ore

Amestecul din 10 g drojdie (30% s.u.) și 10 ml apă distilată se supune autolizei la 50°C timp de 8 h, apoi se încălzește la 80°C timp de 15 min., se răcește, se centrifughează. Procedeul de extragere a manoproteinelor din pereții celulari prin tratare alcalină se desfășoară conform procedurii descris în varianta II.

IV. Omogenizare

Amestecul din 10 g drojdie (30% s.u.) și 20 ml apă distilată se omogenizează 10 min. la viteza de rotație 15000 rot.p.m. (6F volum 30 ml), umiditatea relativă 85%. Amestecul se încălzește la 80°C timp de 15 min., se răcește, se centrifughează. Procedeul de extragere a manoproteinelor din pereții celulari prin tratare alcalină se desfășoară conform procedurii descris în varianta II.

V. Congelare-decongelare

Amestecul 10 g drojdie (30% s.u.) se supune congelării/decongelării la -20°C / +20°C (3 cicluri), amestecul se încălzește la 80°C timp de 15 min., se răcește, se centrifughează. Procedeul de extragere a manoproteinelor din pereții celulari prin tratare alcalină se desfășoară conform procedurii descris în varianta II.

La analiza conținutului de carbohidrați totali se observă că randament superior s-a determinat în varianta II (autoliza 24 h), în celelalte variante diferențele fiind ne semnificative (Fig.2).

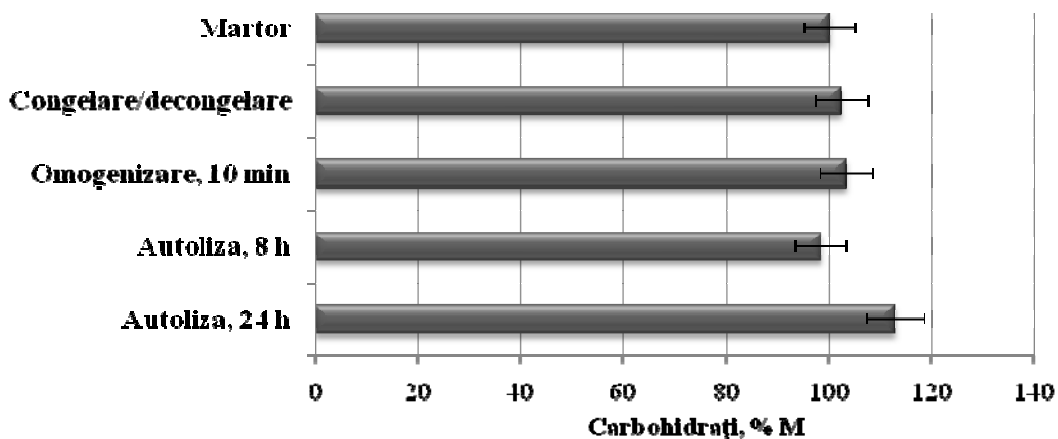


Fig.2. Conținutul de carbohidrați obținuți din levura *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 prin aplicarea diferitelor metode de dezintegrare a pereților celulari.

Eficiența metodelor a fost apreciată prin determinarea conținutului de manoproteine extrase din pereții celulari. În urma analizei rezultatelor obținute s-a stabilit că condițiile optime de extragere a manoproteinelor sunt create la aplicarea variantei II (autoliza biomasei celulare timp de 24 h cu tratarea alcalină). La utilizarea acestei metode se obțin cu 23,3% mai multe manoproteine comparativ cu proba martor. Metodele de distrugere a peretelui celular, care prevăd autoliza 8 h, omogenizarea 10 min. sau congelarea/decongelarea în 3 cicluri, au prezentat rezultate la nivelul probei martor (Fig.3).

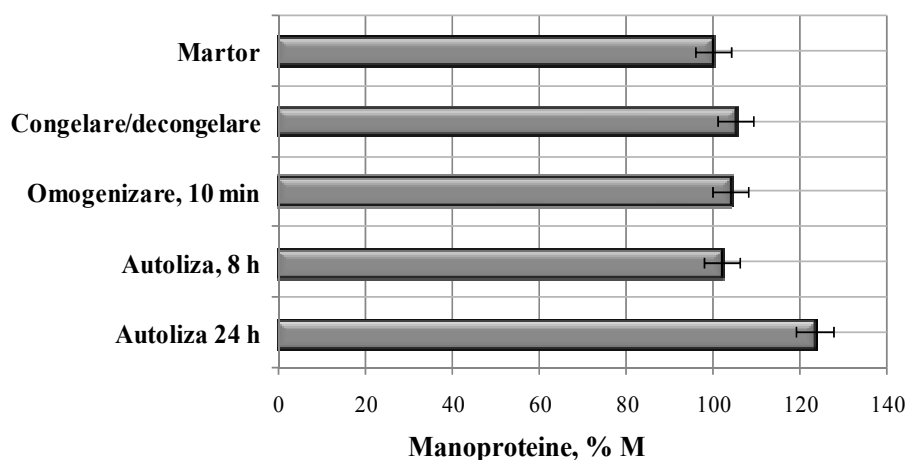


Fig.3. Eficiența procedeeilor de extragere a manoproteinelor din pereții celulari ai *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.

Astfel, în rezultatul cercetărilor se propune un procedeu eficient de extragere a manoproteinelor din biomasa levuriană, care este descris în varianta II (autoliza biomasei celulare timp de 24 h cu tratarea alcalină).

Următoarea etapă a studiului a constat în caracterizarea fizico-chimică a manoproteinelor izolate din pereții celulari ai levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18. Particularitățile fizico-chimice ale manoproteinelor prezintă criterii importante în aprecierea materialului vizat pentru utilizare în diferite domenii.

Din caracteristicile fizice cercetate putem menționa că manoproteinele obținute din pereții celulari ai levurii reprezintă un granulat, de culoare bej, fără miros (Fig.4).

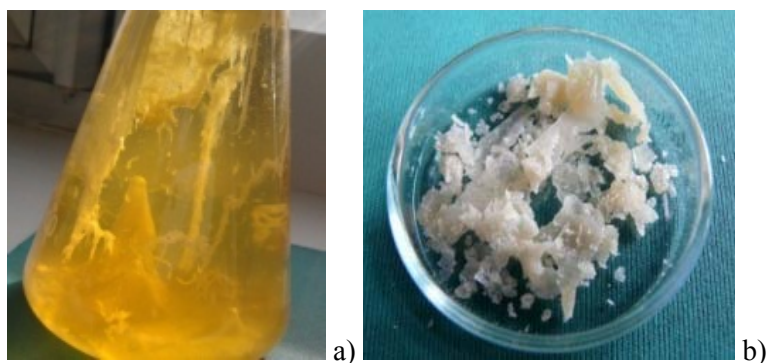


Fig.4. Manoproteine izolate din pereții celulari ai levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, etapa sedimentării cu alcool (a), produs uscat (b).

Compoziția chimică este exprimată printr-un conținut de manoproteine 85-95%, proteine 5-15%, umiditate 5-8%; produsul este solubil în apă și insolubil în etanol.

Prin urmare, în rezultatul studiului de eficientizare a metodelor de extragere a manoproteinelor din levura *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, se propune un procedeu original cu aplicarea autolizei biomasei celulare în combinație cu tratament alcalin.

Concluzie

Procedeu cu aplicarea autolizei biomasei celulare timp de 24 ore și tratare alcalină sporește cu 23,3% manoproteinele extrase comparativ cu proba martor.

Bibliografie:

1. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, no.37, p.268-274.

2. DEY, P., HARBORNE, J. *Methods in Plant Biochemistry*. Carbohydrates Academic Press, 1990. 657 p.
3. DIKIT, P., MANEERAT, S., MUSIKASANG, H., et al. Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. In: *Science Asia*, 2010, vol.36, p.312-318.
4. Faculté D'Oenologie 33400 Talence (FR). Produit biologique pour la stabilisation physico-chimique des vins. Patent EP 0 789 750 B1. Inventeur: Moine, Virginie F-33600 Pessac (FR) Dubourdiu, Denis F-33410 Beguey (FR); Publ: 20.08.1997, Bulletin 34/1997.
5. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. *Tulpină de drojdii Saccharomyces cerevisiae – producătoare de manani*: brevet MD nr. 4216, Inventatori: USATÎI, A., MOLODOI, E., EFREMOVA, N., CHISELIȚA, N., BORISOVA, T., FULGA, L. C12N 1/16, C12R 1/865 Publ. 15.08.2012, BOPI, 2013, nr.4.
6. KOLLAR, R., REINHOLD, B.B., PETRAKOVA, E., et. al. Architecture of the yeast cell wall. β (1-6), glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)- glucan, and chitin. In: *Journal of Biological Chemistry*, 1997, nr.28, p.17762–17775.
7. KRIZKOVA, L., ZITNANOVA, I., MISLOVICOVA, D., et. al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. In: *Mutat. Res.*, 2006, no.1-2, p.72-79.
8. LIU, H.Z., WANG, Q., LIU, Y., et al. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, no.14, p.577-583.
9. LIU, H.Z., WANG, Q., YIN, H.E. Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein. In: *Carbohydrate Polymer*, 2011, vol.83, p.1690-1695.
10. LOWRY, O., ROSEBOUGH, N., FARR, A. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.
11. Societe Industrielle Limousine D'Application Biologique, Ditesilab Société par Actions Simplifiée. *Utilization cosmetique d'un extrait de pichia pour restructurer la peau, principe actif, procede d'obtention et compositions*. Patent FR 2 938 768 B1. Inventeur: PAUFIQUE JEAN. Publ: 11.02.11, Bulletin 11/2006.
12. ШАПХАЕВ, Э.Г., ЦЫРЕНОВ, В.Ж., ЧЕБУНИНА, Е.И. *Основы биотехнологии. Дезинтеграция микробных клеток*. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005, с.96.

Prezentat la 4.05.2015