

MODALITĂȚI DE CREȘTERE A POTENȚIALULUI INVERTAZIC

Șef lucrări ing. Gabriela Pop
Universitatea "Ștefan cel Mare" Suceava

Rezumat

Scindarea hidrolitică a zaharozei în glucoză și fructoză se poate realiza pe cale enzimatică cu două tipuri de enzime α D-glucozidaza și β D-fructofuranozidaza.

În literatură sunt descrise mai multe procedee de obținere a preparatelor de invertază din drojdie destinate scopurilor industriale, precum și metode pentru obținerea de preparate de puritate avansată și foarte active.

Abstract

Zaharose's hydrolyze in glucose and fructose can be realized in enzymatic way with two types of enzymes α D- glycosidase and β D-fructofuranozidaza.

In technical literature are described many procedures to obtain invertase preparation for industrial scopes, as well as and methods to obtain a high purity preparation and very actives

Scindarea hidrolitică a zaharozei în glucoză și fructoză se poate realiza pe cale enzimatică cu două tipuri de enzime α D-glucozidaza și β D-fructofuranozidaza.

α D-glucozidaza atacă molecula de zaharoză prin hidroliza legăturii glicozidice de la capătul terminal al glucozei (legătura C₁ – O), iar β D- furanozidaza atacă zaharoza la capătul terminal al fructozei.

β D- furanozidaza, cunoscută și sub denumirea de invertază, zaharază sau sucrază, este o enzimă care poate hidroliza un număr mare de β -fructozizi, cu condiția ca aceștia să aibă intact un rest de β -D-fructofurozil terminal.

Invertaza este elaborată de diferite tulpini de microorganisme, dar dintre acestea drojdiile au căpătat cea mai largă utilizare pentru obținerea de preparate enzimactice.

În celulele de drojdie, invertaza este localizată atât în celule (în protoplaste), cât și legată de membrana celulară prin fosfomanani.

În prezent preparatele invertazice parțial purificate își găsesc o utilizare tot

mai mare în cadrul procedeeelor biotehnologice de obținere a produselor alimentare eficiente și cu un grad ridicat de inocuitate.

Preparatele invertazice se folosesc, cu deosebit succes, la obținerea siropurilor de zahăr invertit (destinat fabricării băuturilor răcoritoare, lichiorurilor și înghețatei), a mierii artificiale și a diferitelor sortimente de bomboane cu miez moale tras în ciocolată.

În literatură sunt descrise mai multe procedee de obținere a preparatelor de invertază din drojdie destinate scopurilor industriale, precum și metode pentru obținerea de preparate de puritate avansată și foarte active.

Ceea ce este foarte important în creșterea potențialului invertazic al drojdiilor este compoziția mediului de cultură precum și condițiile în care are loc propagarea drojdiilor.

Referitor, la compoziția mediului, s-a stabilit că formarea invertazei de către celule este foarte mult stimulată de prezența zaharozei.

Invertaza se eliberează din celule prin mai multe procedee, dar în general se

preferă autoliza lentă sau autoliza declanșată prin adăugare de solvenți organici, cum ar fi toluenul sau cloroformul.

În procesul tehnologic de fabricare a preparatelor de invertază din drojdie se deosebesc următoarele faze:

- îmbogățirea biomasei de drojdie în invertază;
- autoliza celulelor de drojdie;
- precipitarea enzimei din autolizat;
- uscarea și ambalarea produsului.

Ca materie primă pentru acest proces se folosește drojdia de bere rezultată după fermentația primară a berii sau drojdia de panificație presată.

Îmbogățirea masei de celule în invertază. În general, în literatura de specialitate se specifică două rețete:

- a) 200g de drojdie de panificație presată (cu 25% s.u.) se suspendă în 4 litri mediu nutritiv ce conține 8g fosfat de amoniu secundar $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 8g fosfat de potasiu primar KH_2PO_4 , 2g azotat de magneziu $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ și 2g azotat de potasiu KNO_3 . Amestecul se menține la $t = 28-30^\circ\text{C}$ și se alimentează în mod continuu cu o soluție de zaharoză de 12%, în așa fel ca pe oră să fermenteze 10-12 g zaharoză. La soluția de zahăr cu care se face alimentarea se adaugă de la început 10 ml NaOH 1N, pentru menținerea pH-ului în timpul fermentației între 4 și 5. În timpul fermentației, prin mediu se suflă aer între 300-500 l/h pentru 200g drojdie presată. După două ore și jumătate procesul se întrerupe. Concentrația în invertază crește în urma acestui tratament de cca. 12,5 ori.

- b) 100g drojdie presată (cu 25% s.u.) se suspendă în 2l mediu nutritiv care conține 4g fosfat de amoniu primar și fosfat de potasiu primat și 1g azotat de magneziu și azotat de potasiu. Amestecul se menține la $28-29^\circ\text{C}$ și la o ușoară suprapresiune de 30mmHg. Se alimentează în mod continuu cu o soluție de 20% zaharoză în așa fel ca pe oră să fermenteze 5g zaharoză. După 24 de ore concentrația de invertază crește de 9,4 ori.

În România, la Universitatea "Dunărea de Jos" Galați, cultivarea drojdiilor s-a făcut pe un mediu sintetic ce conține $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , acid citric, citrat de sodiu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extract de drojdie și zaharoză, în condiții cunoscute de temperatură (30°C) și timp (24 de ore) pe agitator, cu sau fără barbotare de aer steril și corectare pH.

Pentru determinări, au fost testate câteva tulpini de drojdie din colecția Laboratorului de tehnologia berii de la Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați, din speciile *Saccharomyces cerevisiae* (SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC9, SC12, SC13, SC16, SC17, SC18, SC19) și *Saccharomyces carlsbergensis* (SU15).

Activitatea invertazică a extractului de drojdie a fost stabilită pe o soluție de zaharoză 10%, pentru două regimuri de hidroliză: 60 minute la 30°C și 15 minute la 37°C .

Pentru separarea enzimei din biomasa de celule, colectivul de la I.A.A.P. Galați propune mai multe variante (figura 1).

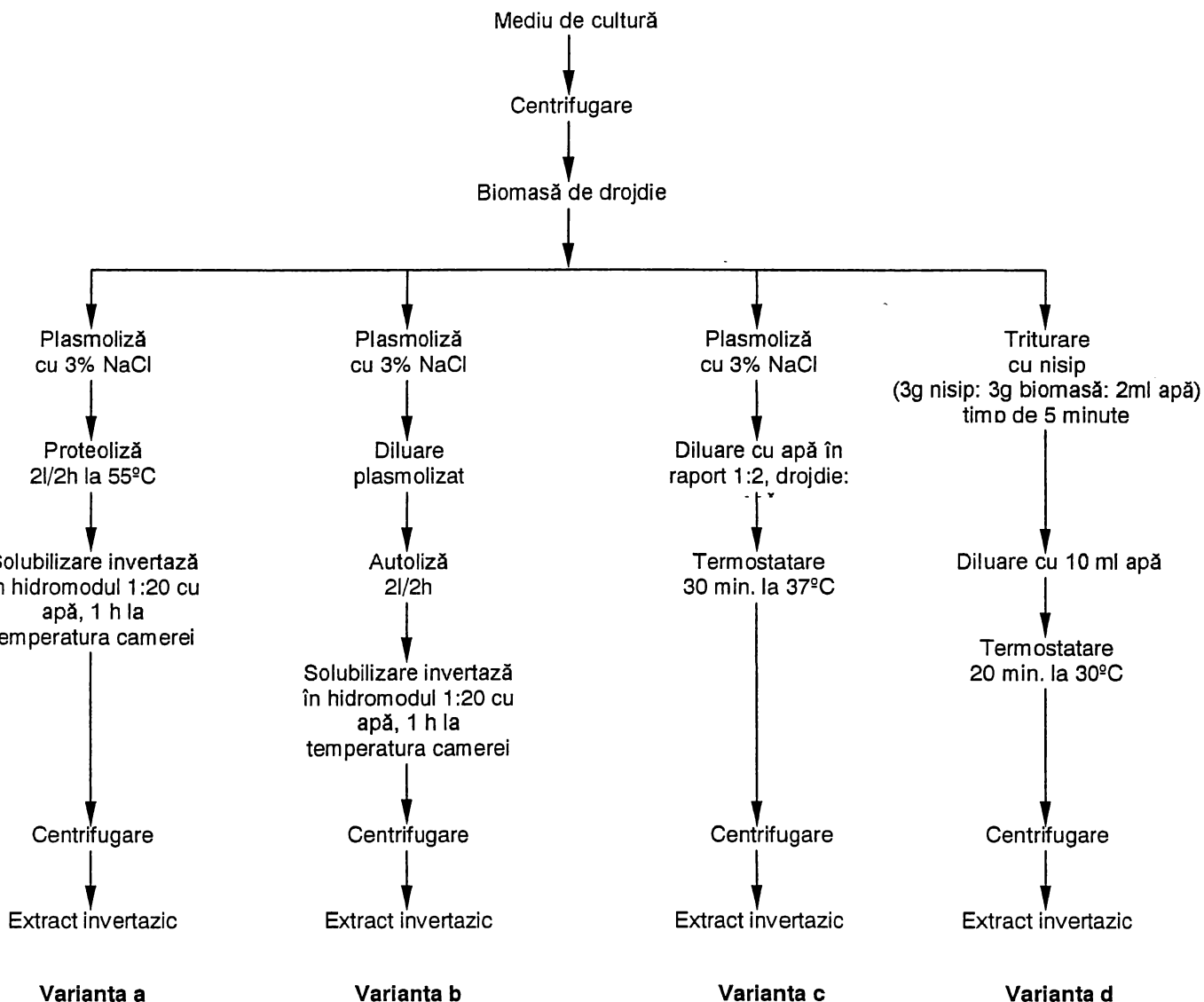


Fig. 1. Metode de solubilizare a invertazei.

În urma experiențelor s-a stabilit că la cel mai slab rezultat a dus varianta (d), care a implicat triturarea cu nisip a biomasei de drojdie, obținându-se cel mai slab randament de separare a enzimei din celulele producătoare.

În literatura de specialitate se recomandă următorul procedeu de

autoliză: la 1Kg drojdie îmbogățită în invertază se adaugă 100 ml toluen și se frământă bine timp de 2 ore.

Masa fluidă astfel obținută se diluează cu 1litru de apă și se neutralizează prin adăugarea încetă a 60 ml soluție de amoniac 2,5% până la pH = 5,8.

Produsul în această stare se menține la 30 °C timp de 20 de ore. După aceste timp se aduce cu acid acetic diluat la pH = 4,8.

Se separă apoi din autolizat resturile de celule prin centrifugare sau filtrare; se obține 1,5 litri de soluție care reține 80 – 90% din invertaza inițială prezentă în biomasa de drojdie.

Precipitarea enzimei din autolizat se poate face pe mai multe căi și anume:

⇒ Un volum autolizat cu pH = 4,7...4,8 se amestecă la temperatura de 0 °C cu 1,25 – 1,5 volume alcool etilic. În locul alcoolului etilic se pot folosi ca agenți de precipitare și care duc la inactivări mai mici, alcoolul izopropilic sau izobutilic și eterii solubili ai dioxanului. Precipitatul care se obține se usucă la temperatură scăzută.

⇒ Adsorbția invertazei pe fosfat tricalcic se face în momentul precipitării fosfatului prin adăugare de Na₂HPO₄ la autolizatul care conține cantitatea echivalentă de clorură de calciu. Precipitatul se spală cu apă până la îndepărtarea sărurilor și apoi se usucă la temperatură scăzută, pudra obținută fiind foarte activă. De menționat că adsorbția se poate face și pe bentonită.

⇒ 200ml autolizat se amestecă cu 300 ml soluție de hidroxid de stronțiu 2%, pH final de 8,0.

Precipitatul format se separă și se spală cu apă până când apa de spălare curge limpede. Se agită apoi precipitatul cu 25 ml apă și se mai adaugă 10 ml soluție de fosfat de amoniu primar 25%, pH final 5.3. După ce stă mai multe ore, precipitatul se centrifughează și se obțin 46 ml soluție de enzimă care reține 875 din activitatea existentă în autolizatul inițial.

⇒ Invertaza se poate separa din autolizat și prin precipitare cu acetat de plumb. Precipitatul se separă prin filtrare, iar excesul de plumb se îndepărtează prin adăugare de oxalat de potasiu. Excesul de oxalat se îndepărtează prin dializă. Din dializat invertaza se separă prin precipitare cu alcool.

Preparatele uscate de invertază se stabilizează pentru conservare prin adăugare de acid de potasiu, acid tartric și acid citric. Ambalarea se face în flacoane de sticlă închise etanș, iar păstrarea se face la rece.

Bibliografie

1. Anghel, I., *Biologia și tehnologia drojdiilor*, vol. I, Editura Tehnică, București, 1989
2. Banu, C. (coordonator). *Biotehnologii în industria alimentară*. Editura Tehnică, București, 1987.
3. Ionescu, A. ș.a. *Cercetări privind selecționarea unor tulpini de drojdie cu activitate invertazică ridicată*, Științe și tehnologii alimentare, vol. IV, 1997/1998, pag.36-39
4. ****, *Preparate enzimactice folosite în practică*, Editura Tehnică, București