

IMPLICAȚII PRACTICE ALE INDUCERII DE ENZIME ÎN CELULA DE DROJDIE

Șef lucrări ing. Rodica Stingheriu Rotar
Universitatea „Ștefan cel Mare” Suceava

Rezumat:

În industria berii calitatea drojdie este dependentă de viteza cu care aceasta se adaptează la condițiile din must și sintetizează maltază. Fermentarea succesivă se explică prin adaptarea treptată a celulei, prin inducerea enzimelor adaptive.

Calitatea drojdiei influențează direct calitatea berii, se regăsește în produsul finit determinând culoarea, limpiditatea, capacitatea de spumare și are un impact hotărâtor asupra aromei prin produșii secundari elaborați.

Abstract:

In brewery fermentations yeast quality depends on the rate of wort composition adaptation and the maltase synthesis. Gradual cells adaptation and inducing adaptive enzymes explain successive fermentations.

Yeast quality has a direct influence on beer quality, determines colour, clarity, foam and has a huge impact on flavor through its secondary products.

Cuvinte cheie: drojdie, metabolism, compuși de aromă, biosinteza.

Maltoza, principalul dizaharid prezent în must, este fermentată numai după o perioadă de inducție necesară pentru formarea enzimei maltaza (α -glucozidaza). Maltoza și maltotrioza pătrund în celula de drojdie sub influența unor permeaze specifice induse în prezența lor, enzime care se comportă ca sisteme active de transport. După pătrunderea în interiorul celulei maltoza, sub acțiunea α -glucozidazei induse, este hidrolizată în glucoză (2 moli) și are loc fermentarea rapidă.

Harris specifică existența a cinci gene distincte, responsabile pentru formarea α -glucozidazei și fermentarea de către *Saccharomyces cerevisiae*.

Controlul fermentării maltozei este realizat prin două mecanisme diferite și anume prin transcripție, când are loc transmiterea informației genetice de către gena structurală prin intermediul acidului ribonucleic care apoi efectuează translația.

Ca rezultat se produce reglarea genetică a biosintezei enzimelor adaptive, respectiv a maltopermeazei și a maltazei (α -glucozidazei). În schema prezentată (a și b) este ilustrat rolul de inductor al maltozei în biosinteza enzimelor care fac posibilă fermentarea acesteia (maltaza, maltozopermeaze) (figura 1).

În decursul fermentației alcoolice, ca rezultat al metabolismului celulei de drojdie, pe lângă alcool etilic și dioxid de carbon ca produse principale, se formează și o serie de compuși chimici implicați în aroma berii, denumiți generic, produse secundare sau congenerici ai fermentației alcoolice. Principalele substanțe ce se formează ca produse secundare ale metabolismului drojdie în condițiile fermentației alcoolice a mustului de bere sunt glicerina, alcooli superiori, aldehide, esteri, acizi organici, dicetone vicinale și produși volatili cu sulf.

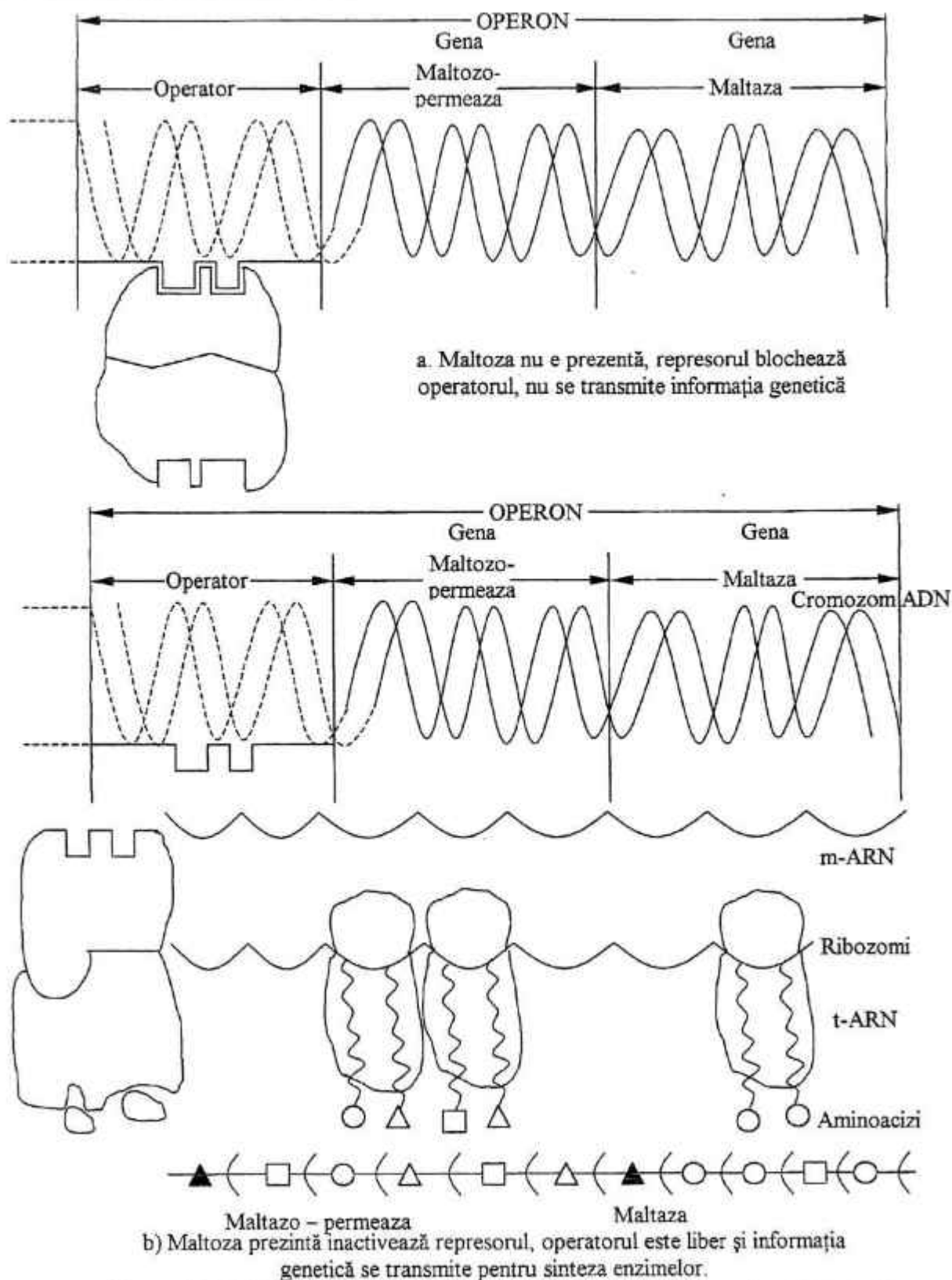


Figura 1. Rolul inductor al maltozei în biosinteza de enzime (maltaza, maltozo-permeaze)

Celule de drojdii suspendate în must asimilează hidrați de carbon, substanțe cu moleculă mică și ioni anorganici. Substanțele nutritive sunt introduse în celulă prin difuzie simplă, difuzie catalizată de enzime sau prin transport cu participarea unei permeaze specifice.

Hidrații de carbon sunt degradați în celula de drojdie în funcție de condițiile de anaerobioză sau aerobioză pe trei căi, în acest mod celula procurându-și energia necesară întreținerii și multiplicării și anume pe calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), prin ciclurile pentozo-fosfat și Krebs.

Degradarea hexozelor în condiții de anaerobioză pe calea EMP conduce la acid piruvic ca produs intermediar. Cea mai mare parte a acidului piruvic este decarboxilată la aldehida acetică prin reducerea căreia se formează alcoolul etilic. O cantitate mică din acidul piruvic este transformat în acetil-CoA și sub această formă participă la sinteza lipidelor și a esterilor.

O cantitate foarte mică de acid piruvic este transformată în α -acetolactat, α -acetohidroxiacetat și acetoină. Aceștia din urmă compuși se pot oxida formând așa numitele dicetone vicinale: diacetilul și 2,3-pentadiona. α -Acetolactatul se poate forma prin mecanismul sintezei valinei de către drojdie. Un exces de valină în must inhibă formarea α -acetolactatului și prin aceasta și a diacetilului.

Acidul piruvic reprezintă cel mai important produs intermediar în degradarea glucidelor de către drojdie, el fiind, în condiții aerobe de dezvoltare a drojdiei, punctul de plecare în ciclul lui Krebs, ciclu care prin α -cetoacizii componenți face legătura între metabolismul glucidelor și cel al substanțelor cu azot. La rândul lor, α -cetoacizii rezultați din ciclul lui Krebs ca și din metabolismul azotat, ca umare a dezaminării aminoacizilor, rămân parțial în mustul fermentat și parțial iau parte la reacții de transaminare și formare de noi aminoacizi. Ei reprezintă un punct nodal între metabolismul glucidelor și cel azotat, un precursor comun al formării de α -aminoacizi

sau de alcooli superiori prin decarboxilarea lor de la aldehide și reducerea ulterioară a acestora.

În condiții normale, în decursul fermentației mustului de bere, drojdia de bere consumă 98% din glucidele asimilabile prin fermentație și 2% prin respirație.

Aldehidele apar ca intermediari în formarea alcoolilor, considerându-se astăzi că există în mediile fermentate pentru fiecare alcool un corespondent carbonilic. Aldehidele provin din decarboxilarea α -cetoacizilor. Sub aspect dinamic, formarea aldehidelor este mai intensă la începutul fermentației.

Pe parcursul fermentației și maturării berii conținutul în aldehide scade. În bere au fost identificate aldehida acetică, ca predominantă (98% din aldehide), și aldehide cu 3-5 atomi de carbon (aldehidele propionică, butirică, izobutirică, valerianică). Conținutul de aldehide al berilor din comerț este foarte variabil, domeniul de variație fiind între 1 și 24 mg/l, pragul de sensibilitate pentru aldehida acetică fiind de 25 mg/l. Un conținut ridicat de aldehide dă berii o aromă puțin plăcută, un caracter imatur. Formarea unei anumite cantități de acetaldehidă este o însușire specifică tulpinii de drojdie, cantitatea formată de o tulpină însă fiind mult influențată de condițiile de fermentare (temperatură, presiune, etc). S-a constatat prin determinări gaz-cromatografice de aldehide că drojdiile de fermentație inferioară formează cantități mai mari de aldehidă decât cele de fermentație superioară.

Diacetilul, acetoina și 2,3-pentadiona sunt produși ai metabolismului drojdiei și al unei serii de bacterii care se pot dezvolta în bere (*Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus pastorianum*, *Streptococcus diacetylactis* și anumite varietăți de *Acetobacter*). Aceste substanțe sunt cunoscute sub denumirea de dicetone vicinale. Aceste substanțe elaborate de drojdia de bere prezintă importanță deoarece în concentrații peste pragul lor de sensibilitate imprimă berii o aromă neplăcută, străină, de unt sau de miere. Așa cum s-a mai arătat, drojdia transformă o parte din acidul

piruvic format prin glicoliză în acid α -acetolactic
Printr-un mecanism asemănător din hidroxietil-TPP (tiampirofosfat) și acid α -cetobutiric se formează în celulă acid α -acetohidroxibutiric.

cu ajutorul acetohidroxiacid – sintetazei. Ambii acetohidroxiacizi sunt eliminați din celulă în mediu și transformați neenzimatic în dicetone vicinale, la un pH peste 10, conform figuri 2.

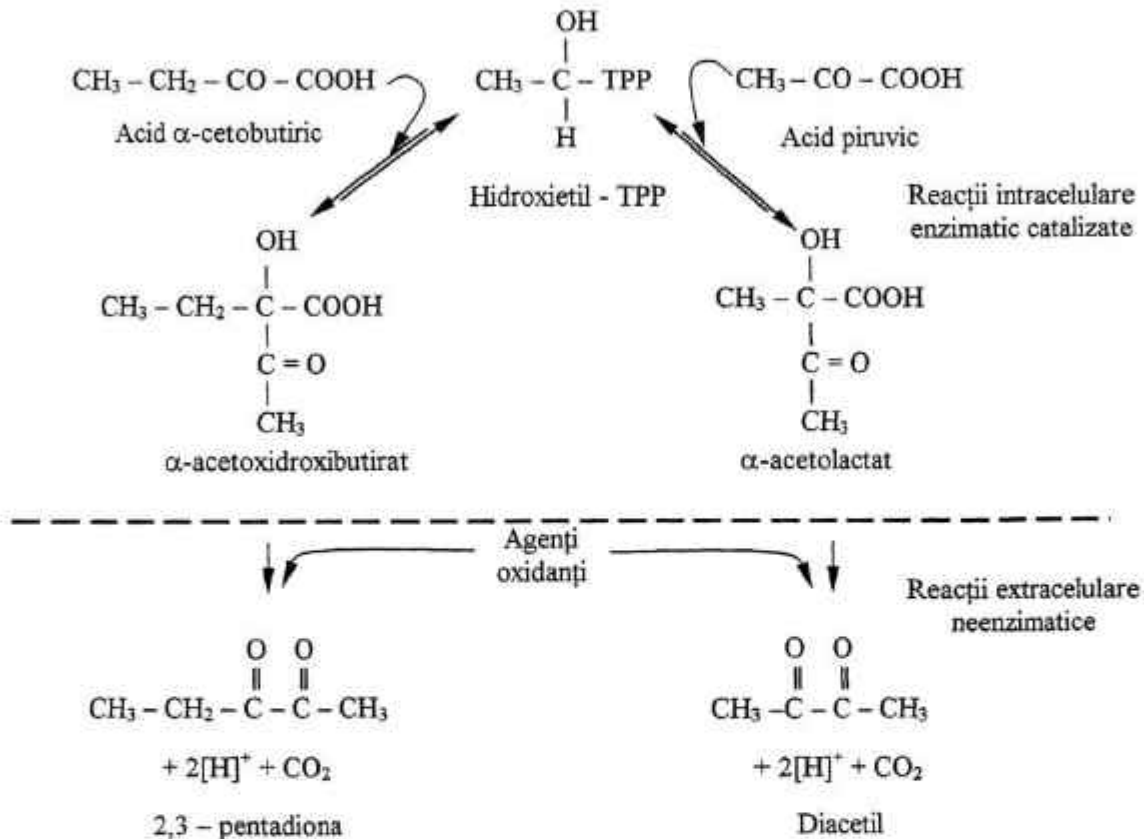


Figura 2. Formarea acetohidroxiacizilor în drojdia de bere și transformarea lor neenzimatică la diacetil și pentadionă

Mecanismul acestor reacții de oxidare nu este precis cunoscut dar ele necesită un agent oxidant ca Fe^{3+} , Ca^{2+} sau Al^{3+} . Transformarea acidului α -acetolactic la diacetil este intensificată de fermentarea la temperaturi mai ridicate și de contactul berii cu oxigenul. Formarea diacetilului este puternic inhibată de adaosul de valină și se consideră că diacetilul se formează ca produs secundar al sintezei valinei din acid piruvic prin intermediul acidului α -acetolactic. Formarea diacetilului poate fi inhibată cu un produs final, conform schemei din figura 3.

Proprietățile tulpinii de drojdie și în special capacitatea de fermentare și de floculare sunt cei mai importanți factori care influențează formarea dicetonelor vicinale în timpul fermentației. Aptitudinea drojdiei de a absorbi valina din mediu se consideră a fi un factor important în capacitatea ei de a forma diacetil. În condiții identice, *Saccharomyces carlsbergensis* formează mai mult diacetil decât sușele de *Saccharomyces cerevisiae*. Mutanții de drojdie cu deficiență respiratorie, ce pot să apară în drojdia de însămânțare, produc mult mai mult diacetil decât drojdia din care

au provenit, ceea ce impune un control regulat al drojdiei de însămânțare sub

aspectul apariției unor astfel de mutații.

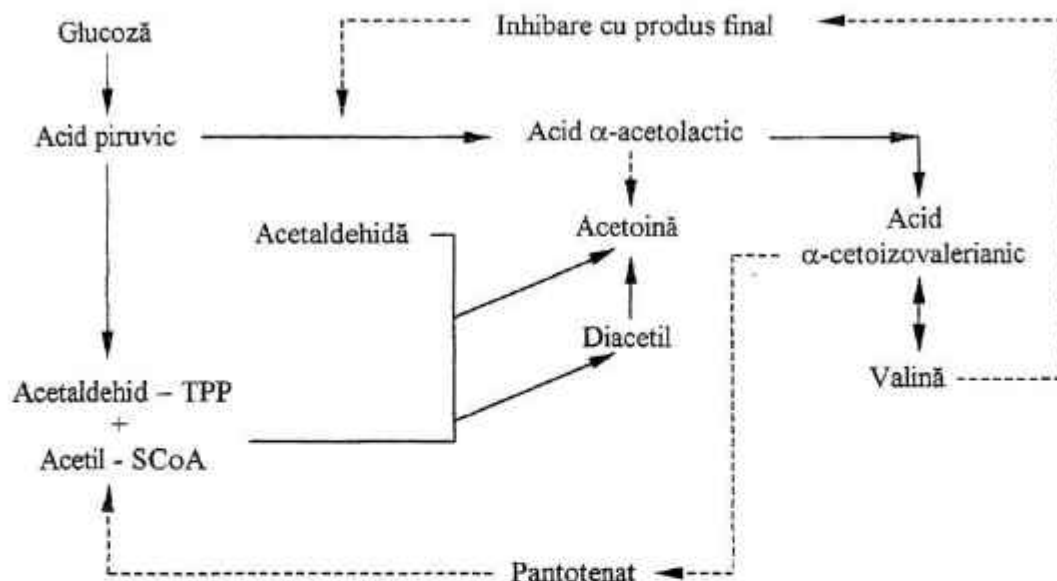


Figura 3. Reglarea formării diacetilului de către drojdia de bere

Se consideră că formarea diacetilului poate fi influențată și de metoda de obținere a culturii de drojdie. Există și alți factori care stimulează formarea de dicetone vicinale de către drojdie: conținutul scăzut în azot asimilabil și îndeosebi în valină, o multiplicare intensă a drojdie la începutul fermentației, temperatură ridicată, șocuri de temperatură în timpul fermentației, conținut ridicat în nitrați și nitriți în apa de brasaj.

În ceea ce privește acetoina, ea este formată pe cale enzimatică de către drojdie din acetaldehidă și hidroxietyl-TPP. Acest compus are un prag de sensibilitate mai ridicat (6-10 mg/l) decât al diacetilului (0,17-0,2 mg/l); când este prezentă în bere peste acest prag, acetoina îi imprimă un miros de mușcăi.

Dicetonele vicinale se formează și se acumulează în mustul în fermentație progresiv cu creșterea drojdiei și cu amorsarea fermentației, cu atât mai mult cu cât mustul este mai bine aerat. Viteza de formare crește mult cu creșterea temperaturii de fermentare de la 8,5 la 20°C, dar crește și trecerea dicetonei, prin reducere, în compuși cu prag mare de sensibilitate (2,3-butandiol, 2,3-pentandiol). Aerarea pe parcursul fermentației și menținerea

unui potențial redox ridicat favorizează trecerea α-hidroxiacizilor în diacetil și 2,3-pentandionă. În practica industrială, cupajările la începutul fermentației, umplerea unui lin din 6-7 fierberi succesive, duc la acumularea masivă de α-acetolactat care ulterior, printr-o favorizare a oxidării, se transformă în diacetil. Excesul de acid α-acetolactic a constituit unul din elementele de frânare în dezvoltarea metodelor continue de fermentare. Într-o fermentație corect condusă, fără pătrunderea târzie a oxigenului în berea tânără, în prezența unei cantități suficiente de drojdie activă, dicetonele sunt reduse. Din punct de vedere tehnologic prezintă un interes deosebit timpul necesar pentru reducerea dicetonei vicinale, acesta corespunzând timpului minim necesar pentru maturarea berii. Drojdia are rolul decisiv în reducerea dicetonei vicinale în această fază a procesului. Trecerea berii peste un strat gros de drojdie duce la o reducere rapidă a dicetonei.

Alcoolii superiori reprezintă produse secundare care însoțesc întotdeauna formarea alcoolului etilic prin fermentație și au o contribuție determinantă la formarea aromei berii. Alcoolii superiori, denumiți global și „ulei de fuzei”, sînt constituiți din propanol,

izobutanol, 2-metil butanol care reprezintă 20—25% din alcool amilic și 3-metilbutanol reprezentând 70% din alcoolii superiori totali ca

Cei mai importanți sub aspectul contribuției la aroma berii sunt alcoolii amilici și β-feniletanolul. Alcoolii superiori trebuie priviți și din punct de vedere farmacologic, efectul lor fiind mult mai important decât al etanolului. Un șir lung de cercetători au studiat influența tulpinii de drojdie asupra formării alcoolilor superiori și s-a ajuns la concluzia că drojdiile produc relativ aceiași alcoolii superiori dar sunt întâlnite variații considerabile în cantitatea și raportul între diferiții alcoolii formați. Astfel, cercetătorii au constatat o variație mare a n-propanolului cu tulpina de drojdie. S-a constatat că berile de fermentație superioară conțin mai mulți alcoolii decât cele de fermentație inferioară. Tulpina de drojdie constituie un factor de influență asupra formării alcoolilor superiori, ceea ce impune cunoașterea sub acest aspect al însușirilor unei tulpini industriale, pentru ca aceasta să corespundă cât mai bine tipului și sortimentului de băutură fabricată. Primul mecanism privind formarea alcoolilor

și mici cantități de alcoolii aromatici (β-feniletanol, triptofol și tirozol).

superiori a fost propus pornind de la dezaminarea aminoacizilor. Ulterior s-a stabilit experimental că acest mecanism nu poate explica formarea întregii cantități de alcoolii superiori dintr-o băutură și au fost dovedite experimental alte mecanisme de formare. Astfel, alcoolii superiori sunt formați prin decarboxilarea α-cetoacizilor și reducerea aldehydelor formate în reacția de decarboxilare. α-Cetoacizii provin din biosinteza aminoacizilor de către drojdiile precum și din aminoacizii exogeni supuși reacțiilor de transaminare. Unii autori au emis ipoteza formării alcoolilor superiori din zaharuri, pe un drum lateral al neosintezei aminoacizilor.

O serie de cercetători consideră astfel că α-cetoacizii ocupă o poziție centrală, nodală, între metabolismul hidraților de carbon, biosinteza aminoacizilor, formarea aldehydelor și alcoolilor superiori conform schemei din figura 4.

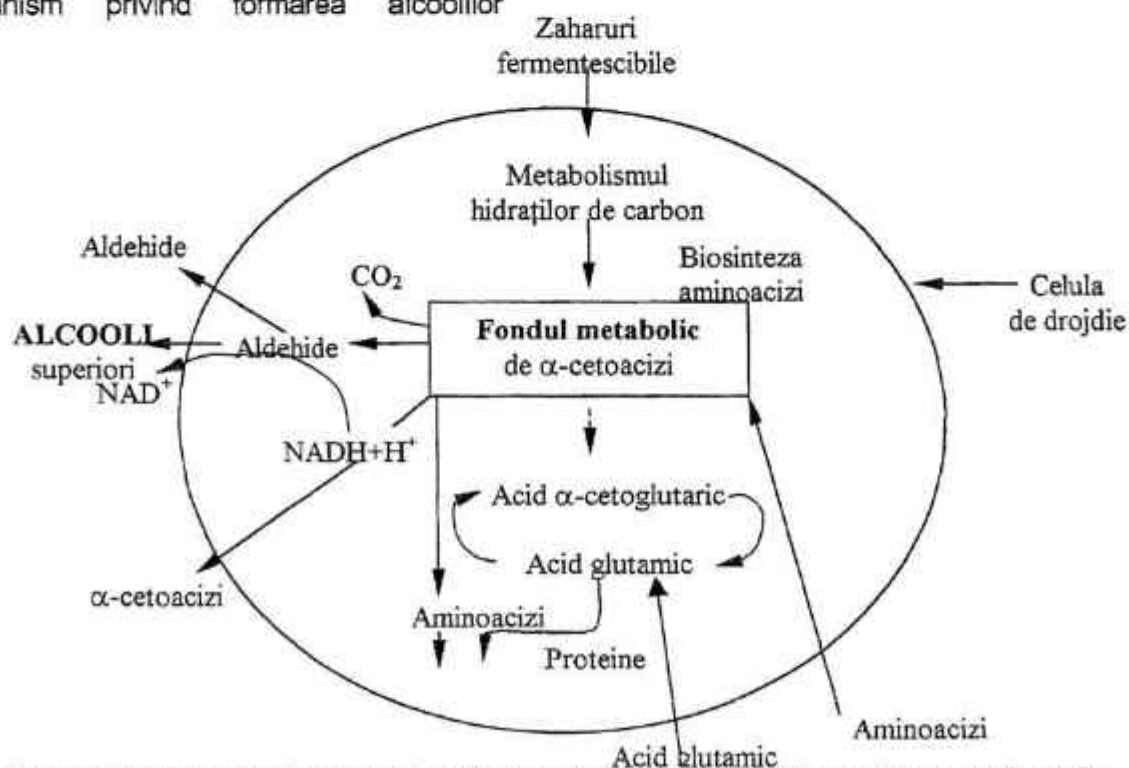


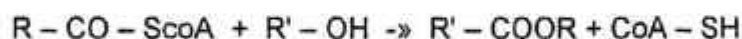
Figura 4. Mecanismul de formare a alcoolilor superiori în celula de drojdie și eliberarea lor în mediu

Mecanismele de control metabolic al căilor de formare a alcoolilor superiori sunt insuficient cunoscute, formarea lor fiind influențată din punct de vedere calitativ și cantitativ de numeroși factori. Cantitatea de alcoolii superiori formați de diferite tulpini, în aceleași condiții, depinde în mare măsură de tulpină, ca o consecință a variațiilor determinate genetic, variații ce se manifestă prin capacitatea și intensitatea drojdiei de a elabora cantități mai mari sau mai mici de enzime importante, ca de exemplu alcooldehidrogenaze. Pentru cele mai multe tulpini s-a putut observa o strânsă legătură între cantitatea de alcoolii superiori formată și capacitatea lor alcooligenă. Pentru aceeași tulpină de drojdie, cantitatea totală de alcoolii superiori formată cât și raportul între diferiții alcoolii este puternic influențată de toți acei factori de mediu la care drojdia este sensibilă: compoziția mediului, temperatura, presiunea, cantitatea de inocul (în strânsă legătură cu intensitatea

multiplicării drojdiei), cantitatea de oxigen din malt etc.

Esterii sunt produși secundari ai fermentației alcoolice care au un rol important în formarea aromei berii și în general a băuturilor alcoolice. Conținutul berilor în esteri este variabil cu tipul și sortimentul de bere, în limite destul de largi. Ei posedă și conferă berii, la conținuturi medii, o aromă plăcută de fructe. O cantitate prea mare de esteri, îndeosebi de acetat de etil, intensifică mult amăreala și caracterul de hameiat. Predominant (circa 50%) între esteri este acetatul de etil, alături de care se găsește o varietate mare de esteri între alcoolii superiori și acidul acetic și respectiv între alcoolul etilic și omologii superiori ai acidului acetic.

Formarea esterilor este astăzi explicată, conform teoriei lui Nordstrom, printr-un mecanism biochimic în interiorul celulei de drojdie, care corespunde ecuației:



Nordstrom consideră că există o cale comună de formare a esterilor cu cea

a biosintezei acizilor grași în celula de drojdie (figura 5).

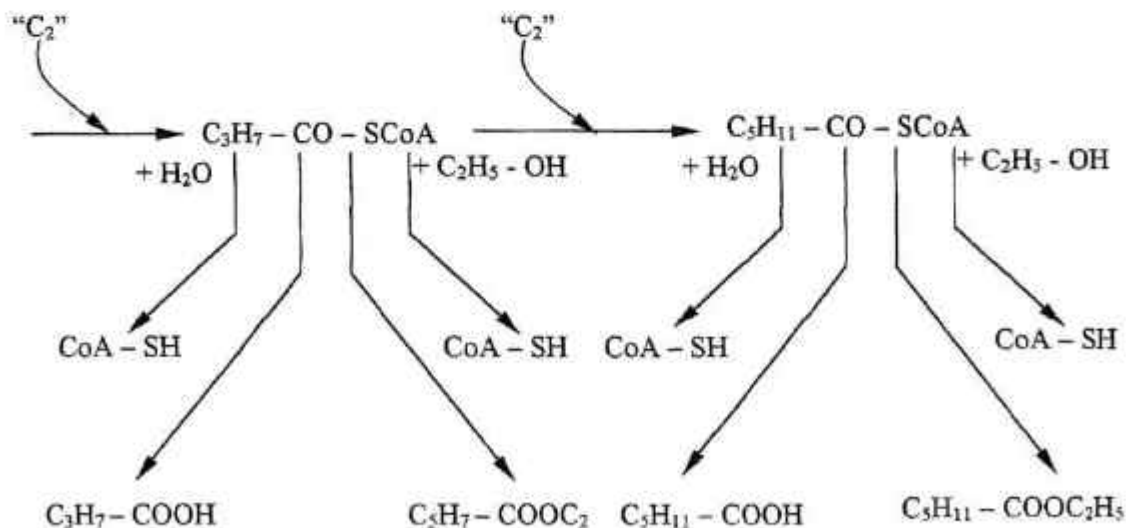


Figura 5. Mecanismul de biosinteză a unor esteri în drojdia de bere

Mecanismul chimic, neenzimatic, desigur are loc, dar viteza cu care are loc este mult inferioară celui biochimic și nu poate justifica întreaga cantitate de esteri acumulată în bere la fermentare.

Acil-S-CoA poate deriva pe diferite căi: prin activarea acizilor grași preluați din mediu, din α -cetoacizi prin decarboxilare oxidativă, din biosinteza acizilor grași sau din catabolismul lipidelor. Rolul CoA în formarea esterilor este dovedit și de influența pe care o are adaosul de acid pantotenic (precursor al CoA) în mediul de fermentație, adaosul făcând să descrească sinteza acizilor grași și să se intensifice cea a esterilor. Esterazele responsabile de sinteza esterilor necesită participarea coenzimei A și sunt localizate în celula de drojdie în membrana celulară și pe suprafața ei exterioară.

Formarea esterilor are loc în cursul fermentației, cea mai mare parte din cantitatea existentă în bere acumulându-se în decursul creșterii intense a drojdiei, la începutul fermentației primare și numai în mică parte în timpul maturării berii.

Cantitatea de esteri formată prin mecanism biochimic depinde în cea mai mare măsură de tulpina de drojdie și este intensificată și de toți factorii de mediu care favorizează multiplicarea drojdiei: aerarea mustului, fermentarea la temperaturi mai ridicate, doza de drojdie de însămânțare, conținutul în substanțe asimilabile cu azot al mustului. Astfel, berile de fermentație superioară conțin cantități mai mari de esteri decât cele de fermentație inferioară. Deoarece formarea alcoolilor poate fi în mai mică măsură influențată prin factori tehnologici decât prin tulpina de drojdie, se impune alegerea cu grijă a celei mai adecvate tulpini.

Compușii volatili cu sulf sunt prezenți în bere sub formă de hidrogen sulfurat, dioxid de sulf, metil- și etil-mercaptan, sulfură de dimetil (DMS), tioformaldehidă, ditioformaldehidă și alți compuși ca urme. Cea mai mare semnificație o au H_2S , SO_2 și mercaptanii,

datorită efectului lor defavorabil asupra aromei berii. Compușii volatili cu sulf sunt mai mult sau mai puțin responsabili de defecte de gust și aromă: buchetul de bere tânără, gustul de autoliză, gustul de lumină. Efectul este datorat unui prag de sensibilitate foarte scăzut, pentru mulți din acești compuși (metantiolul), 2 $\mu g/l$, de exemplu, și unei arome potențiale puternice. O serie de compuși volatili cu sulf sunt conținuți în materiile prime și ajung în must, dar sunt eliminați în timpul fierberii mustului.

În decursul fermentației, ca urmare a metabolismului compușilor cu sulf, în celula de drojdie se formează și sunt excretați în bere compuși cu sulf în mare măsură volatili.

Drojdia poate asimila și utiliza sulfu din compuși organici cu sulf sub forma de metionină, biotină, tiamină, peptide precure și în oarecare măsură din sulfati. O schemă pentru formarea unora dintre compuși volatili cu sulf este dată în figura 6.

Sulfura de dimetil (CH_3-S-CH_3) compus important în aroma berii, poate proveni din precursori prezenți în mal formați sub acțiunea temperaturii, dar ea se formează și de către drojdie în cursul fermentației, din reducerea pe cale enzimatică a dimetilsulfoxidului (DMSO) format la uscarea malțului și la fierberea mustului. Conversia DMSO la DMS depinde de tulpina de drojdie, temperaturi de fermentare și compoziția mustului. O cantitate mai mare de DMS se formează în fermentarea la temperaturi mai scăzute.

Formarea compușilor volatili cu sulf este cu atât mai intensă cu cât fermentația este mai intensă, excreția de H_2S fiind considerată o caracteristică a drojdiilor cu capacitate de fermentare mare, deoarece ioniul sulfat pot fi reduși numai la un potențial redox scăzut și la un pH scăzut. Drojdiile de fermentație superioară produc mai mult H_2S decât cele de fermentație inferioară. Drojdiile floculante formează mai puțin H_2S în bere decât cele pulverulente. Îndepărtarea la timp

drojdiei din bere conduce la beri cu

Conținutul de H_2S în berea finită este foarte scăzut, datorită faptului că este intens eliminat, îndeosebi la fermentația secundară, o dată cu oxidul de carbon. În ceea ce privește dioxidul de sulf (SO_2), prezent în bere în cea mai mare parte în formă legată, se găsește în cantitate mai

conținut mai scăzut în H_2S .

mică în berile de fermentație superioară și în cantitate mai mare în berile de fermentație inferioară, îndeosebi în cele tari. Un conținut redus al mustului în acid pantotenic determină drojdia să producă mai mult H_2S .

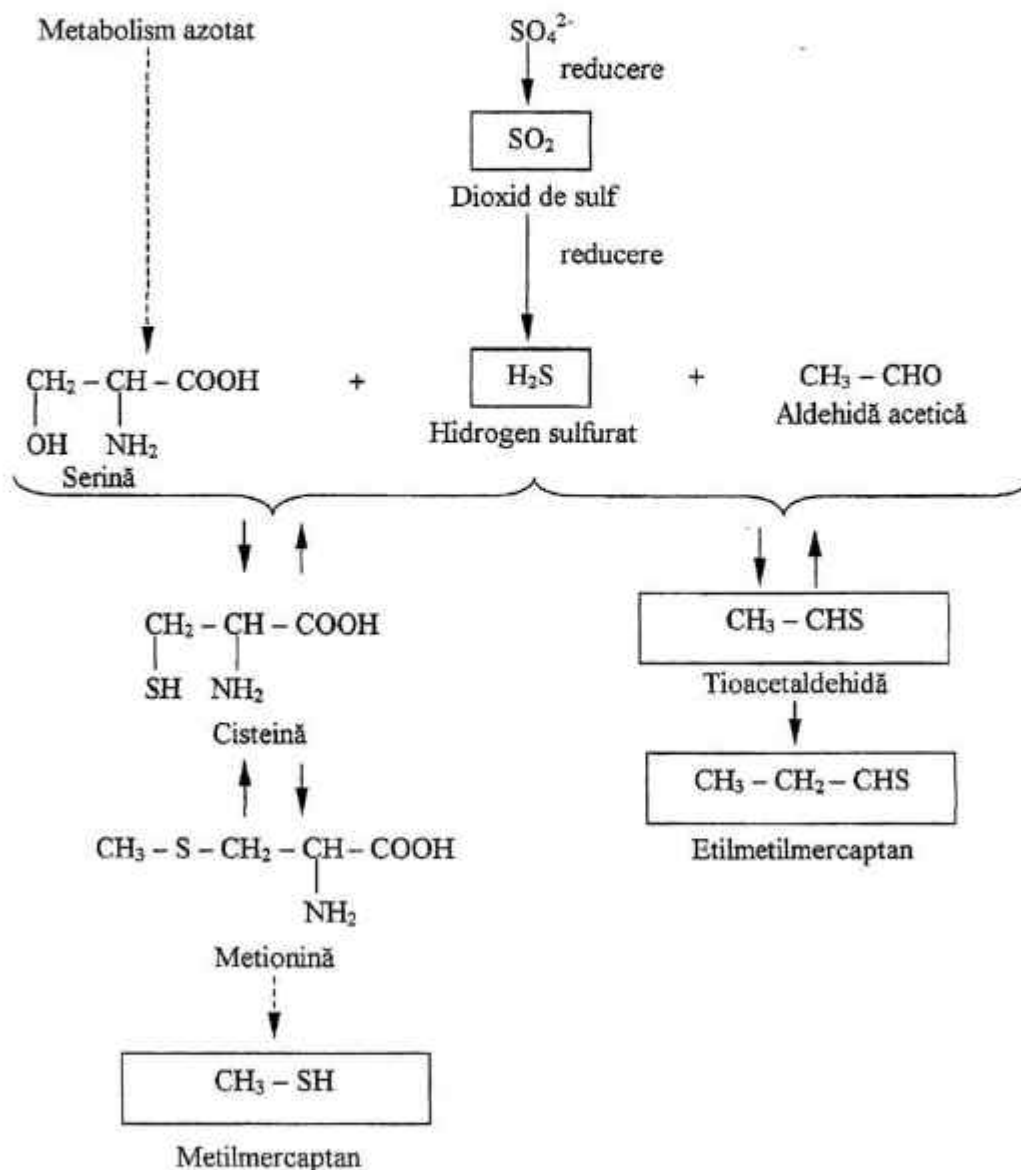


Figura 6. Formarea compușilor cu sulf în timpul fermentației alcoolice

În ultimii 20 de ani, progresele tehnologice și presiunile economice au

condus la reducerea timpului de fermentare și de maturare a berii. Totuși

numeroase exemple de modificare a profilului organoleptic demonstrează că

este de necesară stabilirea cu prudență a fiecărui parametru de fermentație.

Bibliografie:

1. Anghel, I., ș.a., Biologia și tehnologia drojdiilor, vol. I, Editura Tehnică, București, 1989
2. Anghel, I., ș.a., Biologia și tehnologia drojdiilor, vol. II, Editura Tehnică, București, 1991
3. Banu, C., ș.a., Biotehnologii în industria alimentară, Editura Tehnică, București, 1987
4. Bergander, E., Biologie der Hefen, Leipzig, 1967, VEB Fachbuchverlag
5. Dan, Valentina, Microbiologie Industrială, Galați, 1975
6. Dan, Valentina, Microbiologia produselor alimentare, Note de curs, Galați, 1983
7. Debouge, A., The Developments of brewery fermentations the impact of new technologies, *Cerevisia*, 7, 1993, p. 14
8. Dumitru, I. F., Biochimie, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1981
9. Lehninger, A. L., *Osnovî Biohimii*, Mir, Moskova, 1985
10. Lehninger, A. L., Biochimie, vol. I, Editura Tehnică, București, 1987
11. Meacinicopschi, Gh., Biotehnologii în prelucrarea produselor agroalimentare, Editura Ceres, București, 1996
12. Raicu, P., Stoian, V., Gene și cromozomi, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1989
13. Raicu, P., Biotehnologii moderne, Editura Tehnică, București, 1990
14. Segal, Rodica, Biochimie, vol. II, Universitatea "Dunărea de Jos", Galați, 1990
15. Zarnea, G., ș.a., Bioingineria preparatelor enzimactice microbiene, Editura Tehnică, București, 1980
16. Zarnea, G., *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, Editura Academiei, București, 1984
17. Zarnea, G., ș.a., *Revoluția biologică*, Editura Academiei, București, 1985