

ESTRAZIONE DEL GLUTATIONE RIDOTTO DAL LIEVITO IN ESUBERO DAL PROCESSO DI PREPARAZIONE DELLA BIRRA

Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Università degli Studi di Napoli Federico II, Via
Università 133, Parco Gussone, 80056 Portici (NA)

INTRODUZIONE

Dato il suo contenuto in proteine di elevato valore biologico e in vitamine del gruppo B, il lievito di birra è destinato a un posto di altissimo privilegio come alimento ed integratore. L'utilizzo del lievito, indispensabile nella produzione della birra ha portato ad analizzare i suoi attuali impieghi a livello industriale.

Il lievito fresco prodotto dalla birreria può seguire diverse strade:

- essiccato fino al 96% di s.s. (destinato all'alimentazione del bestiame);
- trattato con acido propionico e utilizzato nell'alimentazione di suini, bovini e caprini;
- distillato sotto vuoto per recuperare l'alcool etilico.

Lo studio sperimentale ha avuto come obiettivo quello di proporre un'alternativa diversa da quelle fin ora impiegate, per il recupero industriale e rivalutazione del lievito fresco di birra mediante l'estrazione del glutatione (3). Il glutatione è un tripeptide, costituito da acido glutammico, cisteina e glicina ed è il più potente ed importante fra gli antiossidanti biologici.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta sul lievito di birra refrigerato prelevato presso un'azienda del settore durante un periodo di 6 mesi. 20 g di lievito fresco (12% s.s) sono stati centrifugati (8.000 rpm per 15 min) per allontanare il surnatante. Il sedimento è stato trattato con acetone in rapporto solido-liquido di 1:2 per circa 50 min.

Il solvente è stato allontanato tramite flusso d'azoto, ed il campione è stato ridisciolto in una soluzione di acido trifluoroacetico 0,2% in rapporto 1:1, centrifugato a 10.000 rpm per 25 min ed infine purificato tramite HPLC, (Jasco 1510 rivelatore UV Multiwavelegth, colonna C-18 Water Spherisorb ODS 2 250 x 4,60 mm; colonna C-30 Phenomenex Ultracarbon 250 x 4,60 mm).

Successivamente il glutatione è stato determinato e purificato tramite cromatografia liquida con eluenti: acqua allo 0,01% in TFA (A) e Acetonitrile (B). Il flusso impiegato era di 0,750 ml/min con programma di eluizione: %B (0, 5, 20, 50, 60, 40), tempo

(0, 8, 15, 20, 25 min). La rilevazione degli spettri è stata effettuata tra i 200 e 300 nm (9). L'identificazione è stata effettuata attraverso soluzioni standard di GSH. L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando una curva di taratura costruita con 8 soluzioni standard di GSH nell'intervallo 0-60 ppm.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La procedura di estrazione del glutatione dal lievito di birra ha previsto diversi passaggi: Il lievito fresco, centrifugato è stato trattato con acetone come agente lisante: solvente che può essere allontanato facilmente e a basso impatto ambientale. La migliore capacità estrattiva è stata osservata utilizzando un rapporto solido-liquido di 1/2. Il concentrato è stato addizionato di una soluzione allo 0,2% in TFA in un rapporto 1:1 (S/L). La soluzione estratta è stata filtrata mediante filtri da 0,45 μ m e purificata via cromatografia liquida. La procedura HPLC messa a punto presenta il vantaggio di rilevare il glutatione tal quale nell'UV senza preventiva derivatizzazione (Winter, 1995). In fig. 1 è riportato un tipico cromatogramma del filtrato.

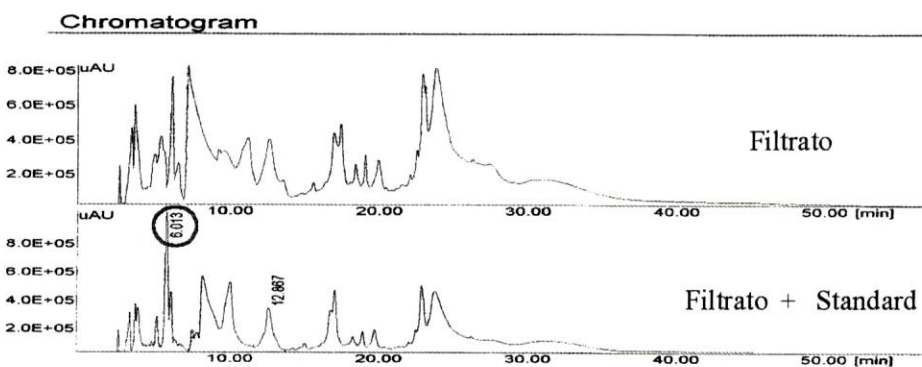


Fig. 1 - Confronto cromatogramma filtrato con campione aggiunto di GSH.

È possibile osservare la presenza del glutatione ad un tempo di ritenzione di circa 6'. L'identificazione del GSH è stata condotta mediante aggiunta nota di glutatione come standard puro.

Recuperando l'eluato nell'intervallo 5,5-7 min è stato possibile successivamente concentrare la soluzione di circa 10 volte per aumentare la sensibilità del rilevatore. La concentrazione è stata effettuata sotto flusso d'azoto. In fig. 2 viene mostrato un tipico cromatogramma HPLC ottenuto dopo purificazione confrontato con un cromatogramma di un campione ad aggiunta nota.

La scarsa presenza di molecole che interagiscono con la fase stazionaria porta ad uno slittamento dei tempi (7.3 min). Dopo la purificazione l'interazione reversibile GSH-fase stazionaria risulta più forte.

Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa è stata condotta mediante preparazione di una curva di calibrazione. Sono state preparate 8 soluzioni a titolo noto di standard di GSH.

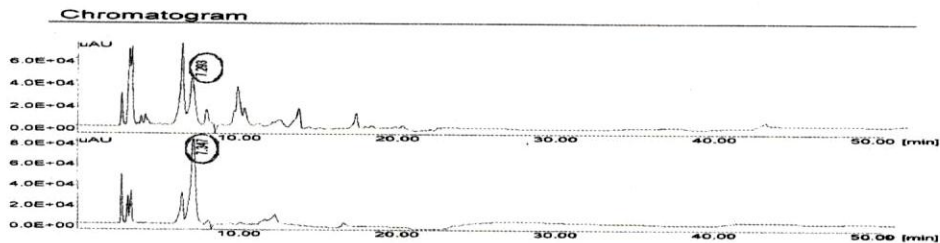


Fig. 2 - Cromatogramma di un estratto con aggiunta di GSH.

L'intervallo di concentrazione scelto è stato 0÷60 ppm, dall'equazione della retta ottenuta è stato possibile calcolare la quantità di glutatione presente nelle cellule di lievito. La quantità di GSH estratta è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{mg GSH/kg (lievito)} = \frac{P}{(A + 157985) / 58790 * \text{f.d.} * V * 1000}$$

P= peso lievito (g); A= area picco; f.d.= fattore di diluizione (5); V= volume surnatante (litri).

In tab. 1 viene riportata la concentrazione di GSH in relazione sia al peso del lievito tal quale sia alla sostanza secca.

Tabella 1 - Valutazione della concentrazione del GSH estratto.

Campioni	GSH	
	mg/K g (t.q.)	g/K g (s.s.)
1	45 ± 2,24	0,407 ± 0,020
2	98 ± 4,89	0,890 ± 0,038
3	44 ± 2,21	0,401 ± 0,017
4	42 ± 2,10	0,381 ± 0,016
5	76 ± 3,79	0,690 ± 0,029
6	64 ± 3,21	0,583 ± 0,025
7	94 ± 4,70	0,855 ± 0,036
8	45 ± 2,26	0,411 ± 0,017
9	47 ± 2,35	0,427 ± 0,018
10	44 ± 2,20	0,400 ± 0,017
11	67 ± 3,36	0,611 ± 0,026
12	49 ± 2,44	0,443 ± 0,019
13	42 ± 2,10	0,382 ± 0,016
14	80 ± 4,01	0,730 ± 0,031
15	87 ± 4,37	0,795 ± 0,034
16	106 ± 5,29	0,962 ± 0,041
17	111 ± 5,56	1,011 ± 0,043
18	103 ± 5,14	0,935 ± 0,040
19	64 ± 3,22	0,586 ± 0,025
Valore medio	69	0,626
Min	42	0,381
Max	111	1,011

È possibile osservare che la concentrazione media ottenuta è stata di circa 70 ppm sul tal quale in accordo con i dati riportati in letteratura (7). È stata fatta un'aggiunta di 10 mL di standard puro 0,45 g/L prima di estrarre al solvente (acetone). Applicando la procedura è stato calcolato un recovery dell'81,7%.

In tab. 2 viene riportata la resa d'estrazione di diversi campioni.

Tabella 2 - Valutazione della resa di estrazione del GSH estratto.

Campioni	g di lievito	resa d'estrazione ‰
1	20	0,05
2	22,3	0,1
3	25,6	0,04
4	33,5	0,04
5	14,3	0,08
6	14,3	0,06
7	18,5	0,09
8	25,5	0,05
9	14,8	0,05
10	16,1	0,04
11	16,1	0,07
12	21	0,05
13	16,7	0,04
14	17	0,08
15	17	0,09
16	17	0,11
17	24,7	0,11
18	24,7	0,1
19	39	0,06
Media	21	0,07
Min	14,3	0,04
Max	39	0,11

CONCLUSIONI

La procedura d'estrazione ha utilizzato campioni di lievito con 15-20 giorni di conservazione a +4°C, che hanno mostrato la massima resa di estrazione di glutatione ridotto (GSH). La scelta del solvente è stata motivata dalla necessità di utilizzare un agente lisante che abbia adeguata capacità solubilizzante, una bassa temperatura di ebollizione per ridurre l'ossidazione del GSH nella fase di allontanamento solvente, sia economico e abbia un ridotto impatto ambientale.

I solventi testati sono stati: toluene, acetato di sodio, acido acetico, detergenti ionici e acetone. Tra questi il più idoneo è risultato l'acetone, che presenta anche il notevole vantaggio di essere facilmente recuperabile riutilizzandolo per successive estrazioni previa distillazione.

La migliore separazione del GSH dagli altri componenti cellulari è stata ottenuta utilizzando una miscela eluente composta da acqua (A) e acetonitrile (B). Il sistema proposto per l'estrazione del GSH rappresenta una valida alternativa al recupero e valorizzazione del lievito in esubero dal processo di fabbricazione della birra e s'inserisce agevolmente nell'attuale procedura di riutilizzazione del lievito.

BIBLIOGRAFIA

- Ciruzzi, B. Facoltà di medicina Veterinaria dell'Univ. di Bari. Birra e malto 20/1983-73
- Grant, C.M., Maciver, F.H. and Dawes, I.W. (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide Q-glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell.* 8:1699-1707
- Grant, C.M., Perrone, G. and Dawes, I.W. (1999) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893-898
- Hopkins, F. G., On glutathione. *J. Biol Chem.* 1929, 84, 269-290
- Maw G. A. Sulphur utilization by yeast proceeding of the symposium on chemistry and biochemistry of fungi and yeast Dublin 1963

- Piva G. (1981) Analisi sul lievito secco di birra condotte presso l'Università Cattolica Del Sacro Cuore, facoltà d'Agraria Piacenza
- Reed, D.J., Fariss, M. W., (1967) High performance liquid chromatography of thiol and disulfides. *Methods Enzymol.* 143: 101-169
- Tabor, H., Tabor, C. (1977) An Automated ion-exchange assay for glutathione. *Anal. Biochem.* 78: 543-553
- Winter R. A., Zukowski J. (1995) Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine and other biological thiols by HPLC following derivatization by N-(1-pyrenyl) melanimide. *Analytical biochemistry* 227:14-21
- Yoshida Toshiaki (1996) Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by HPLC with ultraviolet adsorbance detection. *Journal of chromatography B*, 678:157-164

RIASSUNTO

Lo studio ha avuto come obiettivo quello di proporre un'alternativa al recupero e valorizzazione del lievito di birra mediante una metodica d'estrazione rapida, economica, a basso impatto ambientale e con alte rese.

In letteratura non sono riportate procedure di facile applicazione industriale del glutathione ridotto, che è un tripeptide ad attività antiossidante formato da cisteina, acido glutammico e glicina.

La sperimentazione è stata condotta sul lievito di birra refrigerato prelevato presso un'azienda del settore durante un periodo di 6 mesi. I campioni, preparati preventivamente mediante centrifugazione, sono stati estratti al solvente (acetone) e purificati via HPLC. La scelta del solvente è stata motivata dalla necessità di utilizzare un agente lisante che abbia adeguata capacità solubilizzante, una bassa temperatura di ebollizione per ridurre l'ossidazione del GSH nella fase di allontanamento solvente, sia economico e abbia un ridotto impatto ambientale. L'identificazione UV è stata effettuata senza preventiva derivatizzazione. I risultati ottenuti hanno mostrato un recovery dell'81% ed una quantità media estratta di glutathione pari a 0,6 g/kg di lievito secco.

SUMMARY

The aim of this work is the creation of a suitable method of extraction of reduced Glutathione from beer yeast. It is a tripeptide (Glu-Cys-Lys) and plays an essential role against reactive oxygen species. It is well known that it hasn't toxic effect after assumption. The experimentation has been lead on cooled beer yeast, took from a company of the field during a period of 6 months.

The sample was centrifuged and extracted with acetone, purified by HPLC with UV detector. The choice of this solvent was justify by its high lyses property and low boiling point, in order to reduce GSH oxidation and also for its low cost and ecological impact. Identification and quantitative analysis were carried out with a standard solutions of GSH. The HPLC purification method that was found has the advantage of find GSH without derivatisation.

The results obtained showed a recovery of 81% and 0.6 g/kg of GSH extracted of dry yeast.