
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Otimização da autólise de *Saccharomyces cerevisiae*
de cervejaria e extração de RNA

ANTONIO MARTINS OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro de 2008

Otimização da autólise de *Saccharomyces cerevisiae*
de cervejaria e extração de RNA

ANTONIO MARTINS OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita
Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do
título de doutor em Ciências Biológicas (Área de
concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Setembo de 2008

Agradecimentos

A Deus.

Ao meu Orientador Dr. Pedro de Oliva Neto pela oportunidade, competência e dedicação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Unesp Rio Claro.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Pedro de Oliva Neto, Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte, Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, Dra. Eleonora Cano Carmona, Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe.

Ao Professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez.

A Professora Dra. Mary Leiva de Faria.

A Fundação Educacional do Município de Assis.

A minha família.

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. Histórico	03
2.1.1. A participação das leveduras e de seus derivados na dieta humana	03
2.1.2. Perspectivas sobre a produção de alimentos e o problema da fome no mundo	04
2.1.3. O termo proteína monocelular e suas restrições na alimentação humana	05
2.1.4. Aspectos tecnológicos relacionados à biomassa de leveduras	05
2.2. A composição química da biomassa de leveduras	08
2.2.1. O valor nutricional da proteína de levedura	10
2.3. O extrato de levedura	13
2.3.1. A composição química do extrato de levedura	13
2.3.2. O mercado de extratos de levedura autolisada	15
2.3.3. Processo de obtenção industrial	17
2.3.4. Fundamentação do processo de autólise	19
2.3.4.1. Efeito da temperatura, pH e etanol	19
2.3.4.2. Efeito do NaCl na liberação dos compostos intracelulares	21
2.3.4.3. Mecanismos autolíticos de ruptura celular	23
2.4. Aspectos gerais sobre os ácidos nucléicos, nucleotídeos e nucleosídeos	27
2.4.1. Metabolismo e importância dos nucleotídeos na dieta alimentar	29
2.4.2. Aplicação industrial dos nucleotídeos	35
2.4.3. Métodos de produção de nucleotídeos	37
2.4.3.1. Hidrólise química do RNA	37
2.4.3.2. Hidrólise enzimática do RNA	37
2.4.3.3. Fermentação direta	40
2.4.3.4. Estabilidade físico química dos nucleotídeos	42
2.4.3.5. Segurança alimentar	43
2.4.4. Extração e recuperação de RNA	45
2.4.4.1. Razões da extração dos ácidos nucléicos de levedura	45
2.4.4.2. Extração do RNA de leveduras	45
2.4.4.3. Recuperação do RNA da biomassa	51

	página
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Material	52
3.1.1. Matéria-prima	52
3.1.2. Reagentes	52
3.1.3. Equipamentos	52
3.2. Métodos analíticos	53
3.2.1. Viabilidade celular	53
3.2.2. Umidade e sólidos totais	53
3.2.3. Nitrogênio total (proteína bruta)	53
3.2.4. Cinzas	53
3.2.5. Fibra alimentar	53
3.2.6. Lipídios	53
3.2.7. Ácido ribonucléico	54
3.2.7.1. Extração do RNA da biomassa íntegra de levedura	54
3.2.7.2. Preparo da curva-padrão de RNA purificado de levedura	56
3.2.8. Determinação de nucleotídeos (GMP e IMP)	56
3.3. Planejamento experimental	57
3.3.1. Avaliação do pH em diferentes temperaturas	58
3.3.2. Avaliação do efeito do NaCl em diferentes temperaturas	59
3.3.3. Avaliação dos efeitos do NaCl e NH ₃ em diferentes temperaturas	60
3.3.4. Otimização das variáveis independentes na extração de RNA	61
3.4. Métodos experimentais	62
3.4.1. Avaliação dos processos combinados (Ensaio V)	62
3.4.2. Limpeza e desamargamento da biomassa	62
3.4.3. Autólise	63
3.4.4. Recuperação da biomassa de RNA	64
3.4.5. Precipitação e recuperação do RNA do sobrenadante	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Caracterização química da levedura íntegra de cerveja	66
4.2. Otimização da extração de RNA	67
4.2.1. Ensaio I: avaliação do efeito do pH de autólise em diferentes temperaturas	67

	página
4.2.2. Ensaio II: avaliação do efeito do NaCl em diferentes temperaturas de autólise	73
4.2.3. Ensaio III: avaliação do efeito da amônia na extração de RNA	76
4.2.4. Ensaio IV: otimização do processos de autólise, plasmólise e hidrólise	79
4.2.5. Ensaio V: avaliação cinética nas condições otimizadas	87
4.2.6. Caracterização química e balanço de massa do extrato de levedura autolisado	91
4.2.7. Recuperação do RNA da biomassa autolisada	90
5. CONCLUSÕES	94
6. BIBLIOGRAFIA	95
ANEXO	105

LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 01.	Produção de cerveja no Brasil e em alguns países do mundo	07
Tabela 02.	Composição química típica de leveduras de cervejaria e destilaria	08
Tabela 03.	Teores de RNA em algumas espécies de levedura	09
Tabela 04.	Composição de ácidos nucleicos em microrganismos comparados à tecidos animais	09
Tabela 05.	Concentração de vitaminas em leveduras	10
Tabela 06.	Composição de aminoácidos essenciais em células íntegras de levedura de cerveja (CLC) e isolado protéico de soja (IPS) comparado ao padrão de referência da FAO/WHO/UNU (1985)	11
Tabela 07.	Índices nutricionais de proteína da levedura de cerveja após rompimento mecânico (PLC) comparados à proteína de soja (PS)	12
Tabela 08.	Composição química de derivados de levedura de cerveja obtida por autólise	14
Tabela 09.	Composição aminoacídica de alguns derivados da levedura de cervejaria	14
Tabela 10.	Composição mineral de autolisado total (AT), extrato de levedura (EX), parede celular (PC) de levedura de cerveja (<i>Saccharomyces</i> sp.)	15
Tabela 11.	O consumo de flavorizantes sabor carne na Europa em 1996	15
Tabela 12.	Consumo per capita domiciliar de realçadores de sabor por classe de produtos industrializados no ano de 2000	16
Tabela 13.	O mercado de extratos de leveduras no Brasil	16
Tabela 14.	O uso da biomassa protéica de levedura no preparo de alimentos nos Estados Unidos	17
Tabela 15.	Fracionamento dos componentes da parede celular de levedura semi-purificada, obtida por processo de autólise industrial	23
Tabela 16.	Porcentagem de GMP e IMP em extrato de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> autolisado por 40 horas em diferentes temperaturas	28

	página
Tabela 17. Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem animal	34
Tabela 18. Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem vegetal	34
Tabela 19. Produção e aplicação de nucleotídeos e nucleosídeos	35
Tabela 20. Níveis de aplicação de nucleotídeos em alguns alimentos	36
Tabela 21. Porcentagem de redução de RNA por ativação da ribonuclease endógena em presença de NaCl em <i>C. Utilis</i> , <i>S. Cerevisiae</i> e <i>K. Fragilis</i> .	39
Tabela 22. Tempo de meia vida de nucleotídeos GMP e IMP em diferentes condições de pH a 100°C	43
Tabela 23. Toxicidade aguda de 5'-nucleotídeos observada em camundongos e ratos	44
Tabela 24. Composição do padrão de RNA	56
Tabela 25. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio I)	58
Tabela 26. Ensaio (I) decodificado	58
Tabela 27. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio II)	59
Tabela 28. Ensaio (II) decodificado	59
Tabela 29. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio III)	60
Tabela 30. Ensaio (III) decodificado	60
Tabela 31. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio IV)	61
Tabela 32. Ensaio (IV) decodificado	61
Tabela 33. Resultados da composição química da biomassa de levedura de cerveja	66
Tabela 34. Curva-padrão de RNA (absorbâncias x concentração do padrão)	68
Tabela 35. Taxa de extração do RNA da biomassa íntegra de levedura em função do pH em diferentes temperaturas (Ensaio I)	68
Tabela 36. Análise de variância (Ensaio I)	68
Tabela 37. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura e concentração de NaCl (Ensaio II)	70

	página
Tabela 38. Análise de variância (Ensaio II)	71
Tabela 39. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura, porcentagem de NaCl e NH ₃ (Ensaio III)	74
Tabela 40. Análise de variância (Ensaio III)	75
Tabela 41. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura, % de NaCl e %NH ₃ (Ensaio IV)	79
Tabela 42. Análise de variância (Ensaio IV)	80
Tabela 43. Valores observados e preditos pelo modelo otimizado	84
Tabela 44. Níveis otimizados para o processo de extração de RNA com o uso de amônia	86
Tabela 45. Taxa de extração de RNA pelos processos de autólise/plasmólise e hidrólise com NH ₃ (Y%)	87
Tabela 46. Composição química da biomassa de levedura de cerveja e balanço das frações de extrato e parede celular obtido por autólise/plasmólise	92
Tabela 47. Recuperação do RNA obtido por diferentes métodos de extração: (1) autólise, (2) choque térmico/autólise, (4) hidrólise alcalina	90
Tabela 48. Porcentagens de extração e recuperação do RNA da biomassa de levedura por precipitação fracionada no pH _i e etanol 2(v/v)	91

LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 01.	Hidrólise enzimática da β -1,3 glucana	25
Figura 02.	Hidrólise enzimática da quitina	25
Figura 03.	Hidrólise enzimática da manoproteína	26
Figura 04.	Estrutura genérica de um nucleotídeo	27
Figura 05.	Estruturas químicas das bases nitrogenadas	27
Figura 06.	Estrutura química do nucleosídeo	28
Figura 07.	Vias de degradação dos ácidos nucleicos no sistema digestivo humano	29
Figura 08	Mecanismo de formação do ácido úrico no organismo humano	30
Figura 09.	Mecanismo de degradação do ácido úrico a uréia	31
Figura 10.	Deaminação enzimática do AMP a IMP	36
Figura 11.	Conversões bioquímicas do IMP a AMP e GMP	41
Figura 12.	Degradação térmica de nucleotídeos	43
Figura 13.	Hidrólise alcalina do RNA a 2' e 3'-monofosfato	46
Figura 14.	Mecanismo de fosforilação da proteína	50
Figura 15.	Reação de complexação da ribose (RNA) com orcinol	54
Figura 16.	Fluxograma da extração de RNA da biomassa íntegra de levedura	55
Figura 17.	Fluxograma da limpeza e desamargamento da biomassa	62
Figura 18.	Fluxograma de autólise	63
Figura 19.	Recuperação da biomassa de RNA	64
Figura 20.	Fluxograma de precipitação e purificação do RNA de levedura	65
Figura 21.	Efeito do pH e da temperatura na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio I)	69

	página
Figura 22. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função do pH e temperatura (Ensaio I)	69
Figura 23. Efeito da temperatura e do cloreto de sódio na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio II)	71
Figura 24. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio (Ensaio II)	72
Figura 25. Efeito da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III)	75
Figura 26. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio (Ensaio III)	76
Figura 27. Efeito da temperatura e porcentagem de amônia extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III)	77
Figura 28. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de amônia (Ensaio III)	77
Figura 39. Efeito da porcentagem de NaCl e amônia na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III)	78
Figura 30. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da porcentagem de NaCl e amônia (Ensaio III)	78
Figura 31. Efeito da temperatura e porcentagem de NaCl na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV)	80
Figura 32. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função temperatura e porcentagem de NaCl (Ensaio IV)	81
Figura 33. Efeito da temperatura e porcentagem de amônia na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV)	82
Figura 34. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio (Ensaio IV)	82
Figura 35. Efeito da porcentagem de NaCl e amônia na extração de RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV)	83
Figura 36. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da porcentagem de NaCl e amônia (Ensaio IV)	83
Figura 37. Valores observados e preditos	85

	página
Figura 38. Gráfico de Pareto (efeitos lineares e quadráticos para $p < 0,05$	85
Figura 39. Avaliação cinética da extração de RNA nas condições otimizadas	87
Figura 40. Eficiência da extração de RNA por processos combinados em função do tempo	88
Figura 41. Coloração do extrato autolisado sem utilização de amônia	89
Figura 42. Coloração do extrato autolisado com utilização de amônia	89
Figura 43. Precipitação do pH com etanol em $\text{pH}=2,0$	91
Figura 44. Curva padrão de IMP/250ppm (tempo de retenção 3,7 minutos)	92
Figura 45. Curva padrão de GMP /250ppm (tempo de retenção 3,8 minutos)	92
Figura 46. Análise de GMP + IMP (Método 1)	93
Figura 47. Análise de GMP + IMP (Método 2)	93
Figura 48. Análise de GMP + IMP (Método 3)	93

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo otimizar a autólise de levedura fresca de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), visando a extração máxima de ácido ribonucléico da biomassa na produção do extrato de levedura. As variáveis estudadas foram pH, temperatura, % de NaCl, % de NH₃, tempo de processo e, métodos de recuperação de RNA do autolisado. Os experimentos foram realizados por meio de quatro ensaios delineados segundo Box & Benken (1989) e avaliado pela Metodologia da Superfície de Resposta, utilizando-se o Software Estatística 5.1 e a análise estatística ANOVA. A otimização foi concluída por meio do quinto ensaio com a produção do extrato nas condições otimizadas (55,2°C, 9,8% de NaCl em pH=5,1 por 24 horas e, 12,2% de NH₃ a 60°C sob agitação a 200 rpm/15minutos. Três métodos foram avaliados para recuperação do RNA e das frações de extrato e parede celular: 1) autólise/plasmólise; 2) choque térmico por 1 minuto a 68°C seguido da autólise/plasmólise 3) hidrólise química alcalina. Pelo processo de autólise em combinação com 9,8% de NaCl, a taxa de extração de RNA em 24 horas foi de 89,7%, com um rendimento de 51,3% em massa de extrato com 57,9% de proteína e, 48,7% de parede celular desidratada com 21,7 % de proteína. A utilização de 12,2% de NH₃ em base seca de levedura permitiu o aumento na taxa de extração de RNA de 89,7 para 93,6%, mas um forte escurecimento foi verificado no extrato obtido. Na recuperação do RNA após precipitação protéica em pH 4,3 com posterior uso de 2 volumes de etanol em pH=2, recuperou-se 15,47%, 13,80% e 7,42% de RNA respectivamente com purezas de 49,85%, 51,70% e 38,70%. As taxas de extração de RNA da biomassa foram de 87,45% para o método 1; 91,40% para o método 2 e 78,80% para o terceiro método, indicando uma boa alternativa para redução do teor de RNA da biomassa e produção do extrato rico em nucleotídeos. As frações de extrato foram avaliadas quanto às concentrações de nucleotídeos e apresentaram 0,39%, 1,43% e 0,28% de GMP+IMP para os respectivos métodos.

Palavras-chave: Autólise. Extrato de levedura. Ácido ribonucléico..Cervejaria.

ABSTRACT

The present work had for objective to optimize the autolysis of fresh brewery's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), aiming the maximum extraction of ribonucleic acid of biomass in the yeast extract production. The studied variables were pH, temperature, % of NaCl, % NH₃, processing time and RNA recovering methods from autolysed. The experiments were accomplished by mean of four delineated assays according to Box & Benken (1989) and evaluated by Surface Methodology of Answer, utilizing the software Statistica 5.1. and the analysis statistics "ANOVA". The optimization was concluded by mean of the fifth assay with an extract production in the optimized conditions (55.2°C, 9.8% of NaCl in pH 5.1 for 24 hours and, 12.2% of NH₃ at 60°C under agitation at 200 rpm/15 minutes. Three methods were evaluated for RNA recovering and of the extract fractions and cell wall: 1) autolysis/plasmolysis; 2) thermic shock during 1 minute at 68°C followed of autolysis/plasmolysis; 3) alkaline chemical hydrolysis. The process of autolysis in combination with 9.8% of NaCl, the RNA extraction yield in 24 hours was of 89.7%, with a yield of 51.3% in extract mass with 57.9% of protein and, 48.7% of dehydrated cell wall with 21.7% of protein. The utilization of 12.2% of NH₃ in dried base of yeast allowed the increase in the RNA yield extraction from 89.7 to 93.6%, but a strong darkness was observed in the obtained extract. The RNA recovering after 4.3 pH proteic precipitation with posterior use of 2 ethanol volumes in pH 2.0, it was recovered 15.47%, 13.8% and 7.42% of RNA respectively with purities of 49.85%, 51.70% and 38.70%. The RNA extraction yields of biomass were of 87.45% for the method 1; 91.40% for the method 2 and 78.80% for the third method, indicating a good alternative for RNA content reduction of biomass and rich extract production in nucleotides. The extract fractions were evaluated in nucleotide concentrations and they presented 0.39%, 1.43% and 0.28% of GMP + IMP for the respective methods.

Key words: Autolysis. Yeast extract. Ribonucleic acid. Brewery's.

1. INTRODUÇÃO

O extrato de levedura é um aditivo protéico natural amplamente utilizado em substituição ou combinação com o caldo de carne para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos. É constituído em maior parte por proteínas, aminoácidos, fibras, lipídeos, vitaminas do complexo B, ácidos ribonucléicos, nucleotídeos e nucleosídeos. É obtido industrialmente pelo processo de autólise e secagem da fração solúvel por *spray drier*, a partir de uma cultura pura de leveduras ou biomassa recuperada de processos fermentativos.

A levedura de cervejaria é constituída por cerca de 45 a 48% de proteínas, e 8 a 12% de ácidos nucleicos. A extração do RNA de levedura se justifica tecnologicamente pela obtenção da biomassa isenta de ácidos nucleicos, produção de extratos ricos em nucleotídeos ou como matéria-prima para produção de enaltecedores de sabor, guanosina-5'-monofosfato e inosina-5'-monofosfato.

Na produção do extrato de levedura, a otimização dos parâmetros de autólise é fundamental, uma vez que os efeitos e as interações entre as variáveis e uso de produtos auxiliares poderão refletir de forma positiva ou negativa nos resultados esperados e/ou constituição química do produto.

O presente trabalho apresentou como objetivo geral a otimização da autólise de *Saccharomyces cerevisiae* de cervejaria e extração de RNA, visando como objetivos específicos a otimização das variáveis pH, temperatura, % de NaCl e NH₃. Os ensaios foram construídos por meio de delineamentos fatoriais segundo BOX & BENKEN (1989) e as respostas experimentais foram avaliadas pela Metodologia da Superfície de Resposta, utilizando-se o Software Statistica 5.1. Os níveis das variáveis investigadas preliminarmente

foram baseados na literatura científica e em alguns parâmetros aplicados industrialmente. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos e suas respectivas interações sobre a resposta do sistema, definido como a taxa de extração de RNA, o qual foi validado estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).

A otimização foi realizada por meio de quatro ensaios, constituídos em três e quatro níveis estatísticos mediante o estudo dos processos de autólise, plasmólise e hidrólise alcalina pelo uso da amônia. Os experimentos foram realizados em triplicata e a caracterização das frações de extrato, parede celular e RNA nas condições otimizadas foi concluída por meio do quinto ensaio com o balanço de massa, composição química das frações e análise de nucleotídeos.

A autólise foi eficaz para a extração do RNA e produção do extrato de levedura. O uso da amônia reduz o tempo de processo, porém, causa escurecimento do extrato. A extração do RNA pela técnica proposta neste trabalho abre uma perspectiva de utilização da biomassa isenta de RNA e produção de extratos ricos em nucleotídeos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

2.1.1. A participação das leveduras e de seus derivados na dieta humana

O uso de leveduras na alimentação humana data dos períodos mais antigos da humanidade. Sua utilização na panificação já era descrita em documentos babilônicos e egípcios, datando de 2300 a.C. (DZIEZAK, 1987).

No Oriente, fungos e leveduras são utilizadas há séculos na elaboração de alimentos saborosos como molhos, condimentos e outros. Entre os fungos destacam-se o *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, a bactéria láctica *Pediococcus halophylus* e as leveduras *Saccharomyces rouxii*, *Candida versatilis* e *C. etchellsii* (CORREA, 1992).

Embora a utilização atual da levedura compreenda em maior parte a indústria de panificação, bebidas fermentadas e álcool combustível, ao final da primeira Guerra Mundial, a Alemanha, buscando amenizar a crise provocada na produção de alimentos, faz a incorporação de 16.000 toneladas de *Candida utilis* na complementação da alimentação humana. Após a II Guerra Mundial houve uma redução da produção de torula, que continua apenas nos Estados Unidos, mas visando, em parte, o tratamento de efluentes da indústria de celulose (CORREA, 1992).

Mais tarde, mesmo com os avanços da indústria de fertilizantes, problemas sociais são agravados pela escassez de alimentos no Terceiro Mundo, devido ao crescimento populacional e à falta de acesso a tecnologias adequadas (SERZEDELLO et al., 1970).

2.1.2. Perspectivas sobre a produção de alimentos e o problema da fome no mundo

A décima quarta edição das perspectivas sobre a agricultura apresentada pela FAO/OCDE (2008) - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) fornece uma apreciação sobre as expectativas do mercado agrícola baseada em previsões até 2017, em termos de produção, consumo, comércio, ações e preços dos produtos-base das zonas agrícolas temperadas.

Neste relatório as organizações alertam para o previsível número de pessoas que sofrem de fome no mundo por causa da escassez e elevação dos preços dos alimentos. Em razão da demanda, urbanização, crescimento econômico e populações em expansão, têm-se impulsionado alterações de dietas, procura por alimentos alternativos e rações que continuam a ser as maiores fontes de crescimento no mercado. Os pobres, em particular dos países em desenvolvimento importadores de alimentos, são os que mais irão sofrer.

Em vários países de baixo poder aquisitivo, os gastos em alimentação correspondem a cerca de 50% do rendimento. Conseqüentemente, os preços elevados irão levar mais pessoas à desnutrição. As políticas de ajuda, bem como a elevação do preço do petróleo, vão influenciar fortemente a evolução da procura futura tanto de biocombustíveis como de matérias-primas de produtos-base para alimentação. Desta forma, a curto prazo, haverá necessidade urgente e imediata de fontes de alimentos alternativos e assistência humanitária para amenizar a fome no mundo.

De acordo com as projeções das duas organizações citadas, os preços agrícolas sofrerão uma elevação de 50 a 80% em relação aos registrados na década anterior. No caso dos óleos vegetais, cerca de um terço desse aumento será impulsionado pela produção de biocombustíveis.

Uma alternativa encontrada por empresários e pesquisadores para suprir a crescente demanda de alimentos é a viabilização e disponibilização de novos produtos por meio do aproveitamento total da matéria-prima e de seus subprodutos durante o processamento (FARFAN, 1998).

Estudos realizados com produtos de origem microbiana focalizam a caracterização desses derivados, especialmente em relação ao perfil nutricional, visando sua utilização como fonte alternativa para alimentação humana. Uma dessas fontes de grande potencial é a biomassa de levedura, produzida em grande escala como subproduto dos processos fermentativos (OLIVEIRA, 2001).

2.1.3. O termo proteína monocelular e suas restrições na alimentação humana

O termo proteína monocelular, originário do inglês *single-cell protein*, foi criado no Instituto de Tecnologia de Massachusets para caracterizar uma proteína obtida de microrganismos para utilização industrial, e é atualmente uma alternativa bastante promissora para amenizar o problema da fome mundial (LITCHFIELD, 1987). Pesquisas direcionadas para o melhoramento da qualidade da proteína de origem microbiana têm sido desenvolvidas de modo que esta possa atender aos requisitos nutricionais e apresentar o mesmo valor biológico e propriedades funcionais adequadas quando comparadas às fontes convencionais como carne, leite e ovos (OLIVEIRA, 2001).

Dentre os tipos de microrganismos utilizados como fonte não convencional de alimento protéico, destacam-se fungos filamentosos e leveduras, sendo as leveduras muito valorizadas pela vasta gama de derivados que podem ser obtidos delas (CORREA, 1992).

Alguns problemas envolvem a utilização de leveduras como fonte não convencional de proteínas, entre as quais, elevada resistência das paredes celulares à ação das enzimas digestivas e o alto teor de ácidos nucleicos (GALVEZ et al., 1990; CORREA, 1992). De acordo com SGARBIERI (1996), no processamento de organismos unicelulares para incorporação à alimentação animal e humana, outros fatores devem ser levados em consideração, entre eles, as propriedades físicas e funcionais.

2.1.4. Aspectos tecnológicos relacionados à biomassa de leveduras

As espécies de leveduras mais estudadas para fins alimentícios são as da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*. Estas são utilizadas na forma inativa, desidratadas ou como extratos (SATO e LIMA, 2001). Segundo o INSTITUTO CUBANO (1988), de todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a de maior valor industrial e comercial, devido ao seu elevado teor de lisina.

A produção de levedura alimentar é uma realidade industrial praticada em muitos países utilizando-se resíduos sulfíticos. No Brasil, a matéria-prima utilizada é o melaço de cana-de-açúcar, por ser abundante e de baixo custo (SATO e LIMA, 2001).

Para que a industrialização da levedura seca para fins alimentícios seja viável economicamente, torna-se necessária a produção de concentrados ou extratos capazes de competir economicamente com os 47% dos farelos de soja e com os 39 a 44% das tortas e farelos de algodão (SATO e LIMA, 2001).

O cultivo de leveduras é vantajoso por apresentar curto período de geração, elevado teor de proteínas, fácil controle das variáveis de produção, independência da condição climática e baixo custo de produção (PACHECO, 1996).

As leveduras para fins alimentícios são classificadas em “leveduras de cultivo” ou “leveduras de recuperação”. Leveduras de cultivo são comumente denominadas leveduras primárias, enquanto as de recuperação, normalmente, denominam-se secundárias (SATO e LIMA, 2001).

As leveduras de cultivo ou primárias são produzidas mais especificamente para a indústria alimentícia e normalmente são espécies capazes de crescer em diferentes fontes de carboidratos e transformar o nitrogênio do meio em nitrogênio protéico (OLIVEIRA e CASTRO-GOMEZ, 2005).

O cultivo é realizado em meio com intensa aeração e com adequada disponibilidade de carboidratos, nutrientes e vitaminas. Nessas condições, a produção de biomassa é intensa e a quantidade de etanol é desprezível. Este processo é mais oneroso quando comparado à obtenção de leveduras de recuperação. Um exemplo típico de leveduras de cultivo são as cultivadas para utilização na indústria de panificação, que atinge uma produção anual por volta de 6 milhões de toneladas no mundo (OLIVEIRA, 2001).

As leveduras de recuperação são aquelas oriundas dos processos fermentativos, etanol e cerveja. O aspecto econômico mais importante deste tipo de biomassa é que representa um subproduto do processo produtivo e é de baixo custo, normalmente utilizada para produção de ração animal.

O etanol brasileiro, depois de muitos anos sendo amplamente usado no Brasil, passou a chamar a atenção, de forma positiva, no mundo todo. Praticamente, todos os governos reconhecem que a nossa opção pelo etanol é excelente, por diversas razões, mas, principalmente porque a sua produção é sustentável e contribui para amenização do aquecimento global e redução na emissão de carbono e outros compostos indesejáveis para a atmosfera (CTC, 2008). Além disso, representa a forma indireta mais importante na produção da biomassa residual de levedura de fermentação que pode ser utilizada como fonte protéica desde que processada adequadamente (OLIVEIRA, 2001).

Nos processos descontínuos para produção de etanol, ao término da fermentação, o vinho é centrifugado e o creme é utilizado para inocular o novo mosto. No processo contínuo, a centrifugação é constante. No Brasil, em média, a recuperação de levedura excedente é cerca de 15 a 30kg por metro cúbico de álcool produzido, o que representa uma importante fonte de biomassa protéica (LAHR-FILHO et al., 1996).

Dados do SINDCERV (2008), mostram que o Brasil produz anualmente cerca de 8,2 milhões de litros de cerveja em cinquenta empresas. Outros países como a China e Estados Unidos também são grandes produtores, como mostra a Tabela 1. Considerando-se esses valores, pode-se afirmar que a quantidade de biomassa produzida representa um grande potencial para aproveitamento como fonte de proteínas e outros derivados, tais como ácidos nucleicos e polissacarídeos de interesse industrial.

Tabela 1. Produção de cerveja no Brasil e em alguns países do mundo.

País	10 ⁹ L/ano
China	26,0
Estados Unidos	24,0
Japão	23,0
Alemanha	11,8
China	6,8
Brasil	8,2
Inglaterra	6,0
Rússia	5,0
México	4,1
Espanha	2,7

Fonte: SINDCERV, 2008 (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja).

Tecnologicamente, o aspecto mais importante relacionado à biomassa de levedura de cerveja é que esta apresenta baixa contaminação bacteriana e considerável teor de proteínas, o que a torna uma matéria-prima ideal para obtenção de extratos para consumo humano ou como fonte de ácido ribonucléico. Por outro lado, apresenta gosto amargo, devido à utilização do lúpulo durante o preparo do mosto (PENY, 1991; BARNETT, 1992).

O lúpulo pertence à família *Cannabaceae*, mas não contém substâncias alucinógenas. As flores femininas são ricas em lupulina, cujos componentes principais são as resinas e os óleos essenciais. As resinas são constituídas principalmente por alfa e beta ácidos. Os alfa ácidos, também chamados humulonas, são a fonte principal de amargor, enquanto os beta ácidos, denominados lupulonas, são de menor importância. Na fervura do lúpulo com o mosto, as moléculas de alfa ácidos são polimerizadas na forma de alfaisoácidos, que aderem às paredes das leveduras conferindo-lhes a estas o gosto amargo característico da cerveja (FILHO e CEREDA, 2001).

Estudos desenvolvidos por SGARBIERI et al. (1999) mostram que é possível a redução destas substâncias por meio de tratamento em meio alcalino diluído. Neste processo a suspensão da biomassa é submetida à centrifugação a 2500 (rpm) para recuperação das células. Em seguida é ressuspensa em solução de NaOH 0,2%, 1:1 (p/v), homogeneizada por

trinta minutos e centrifugada para remoção do excesso de soda. O sobrenadante é descartado e obtém-se, desta forma, a matéria-prima pronta para o fracionamento e obtenção de produtos como autolisados, extratos, parede celular e beta-glucana. Outras metodologias utilizam uma solução de carbonato de sódio a 10% em peso para o desamargamento da biomassa (NAND, 1987).

2.2. A composição química da biomassa de leveduras

A composição química da biomassa de levedura depende de vários fatores entre os quais da qualidade do substrato, concentração de nutrientes e condições de cultivo. Outro fator importante, no caso de leveduras de fermentação, é o número de ciclos de produção que pode afetar sua composição química devido às sucessivas centrifugações e lavagens (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

De forma geral apresentam cerca de 40 a 48% de proteínas sendo que o teor de nitrogênio na biomassa de fermentação alcoólica é mais baixo, em torno de 5 a 6%, em base seca, constituindo as moléculas de aminoácidos, enzimas, purinas, pirimidinas, pigmentos respiratórios e vitaminas do complexo B (BUTOLO, 1996).

A Tabela 2 mostra a composição centesimal típica de leveduras de cerveja e de destilaria de álcool, com um nível protéico bruto em torno de 40% a 48%, em base seca.

Tabela 2. Composição química típica de leveduras de cervejaria e destilaria.

Componente (% b.s)	Levedura de cerveja*	Levedura de destilaria**
Proteína (Nx5,8)	48,74	39,60
RNA	7,60	9,0
Lipídios	3,33	0,50
Cinzas	8,55	4,60
Fibra total	24,40	31,40
Fibra solúvel	22,52	30,30
Fibra insolúvel	1,88	1,10
Não determinado	7,08	14,90

Fonte: SGARBIERI et al. (1999) ** YAMADA et al. (2003).

Os carboidratos constituem cerca de 45 a 55% do peso seco da biomassa, sendo representados, em média, por 33% de trealose, 27% de glucanas, 21% de mananas e 12% de glicogênio. A fração de extrato etéreo é baixa e compreende, aproximadamente, proporções iguais de triglicerídios e fosfatídeos (SARWAR et al., 1985).

Os ácidos nucléicos são constituídos, em sua maior parte, por RNA e variam quantitativamente de acordo com gênero, espécie e condições de crescimento. De forma geral, situam-se entre de 8 a 12% (BUNKER, 1978).

LIPINSKY & LITCHFIELD (1987) encontraram em *Saccharomyces cerevisiae* íntegra e autolisada, cultivada em melaço, teores de RNA entre a 9,0 e 8,1 %. Em *Candida utilis* íntegral, cultivada em lignossulfato de cálcio, licor sulfítico e etanol, teores iguais a 10,87; 11,47 e 11,50%, respectivamente.

A Tabela 3 mostra a composição percentual de RNA em algumas espécies de leveduras, dos gêneros *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida*.

Tabela 3. Teores de RNA em algumas espécies de levedura.

Espécie	% RNA (em base seca)
<i>Candida utilis</i>	7,5-10,5
<i>Candida tropicalis</i>	8,5-9,7
<i>Candida lipolítica</i>	9,0-11,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,0-8,0
<i>Saccharomyces carsbergensis</i>	6,0-7,5

Fonte: ROSALES (1984).

Comparativamente a alguns órgãos e tecidos animais, as quantidades de ácidos nucléicos nos microrganismos são relativamente elevadas conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Composição de ácidos nucléicos em microrganismos comparados à tecidos animais.

Fontes	% Ácidos nucléicos	% Proteínas	Ácidos nucleicos/ Proteína
Fígado bovino	2,6	65,5	3,9
Sardinha	1,4	64,2	2,2
Caviar	4,1	70,3	5,8
<i>Bacillus anthracis</i>	4,4	58,1	7,5
<i>Stafhylococcus aureus</i>	11,6	75,5	15,4
<i>S. cerevisiae</i>	7,82	40,74	19,2

Fonte: SGARBIERI (1996) (Dados expressos sobre a matéria seca).

As leveduras são pobres em vitamina A, mas ricas em vitaminas do complexo B e podem sintetizar a maioria destes nutrientes em proporções que variam em cada espécie e em função das condições de fermentação (CAR, 1996).

A maioria das leveduras é capaz de sintetizar a riboflavina e o ácido fólico em concentrações elevadas. A síntese do ácido nicotínico é limitada a condições anaeróbicas. As

sínteses das outras vitaminas são muito dependentes das espécies de leveduras e das condições de fermentação (CAR, 1996).

A concentração típica de vitaminas em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* está ilustrada na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de vitaminas em leveduras.

Vitaminas (mg/100 g)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida utilis</i>
B1	2,9 – 9,0	0,95
B2	ND	4,41
B6	ND	7,91
PP	19,0 - 58,50	45,0
Ácido pantotênico	11,8 – 19,8	19,8
Ácido fólico	1,9 – 3,5	2,15
Biotina	0,05 - 0,18	0,04
B12	ND	0,001

Fonte: CAR (1996).

O teor de minerais poderá atingir até 10% do peso seco da célula, sendo os principais componentes o fósforo, potássio, cálcio, magnésio e selênio (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). O selênio está presente principalmente na levedura de cerveja e é recomendado na prevenção de estados carenciais, caracterizados pela queda de cabelo, retardo do crescimento, deficiência reprodutiva, cardiomiopatias, necrose, degeneração do fígado e do pâncreas (LEVANDER, 1989).

2.2.1. O valor nutricional da proteína de levedura

As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos e devem estar presentes na alimentação em quantidades equilibradas. Qualitativamente, seu valor nutricional depende de alguns aspectos, tais como: a) composição; b) digestibilidade; c) biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais; d) ausência de toxicidade e propriedades antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

Há mais de 50 anos sugeriu-se que o valor biológico de uma proteína poderia ser determinado pelo aminoácido essencial presente na menor concentração, comparada às necessidades humanas. Este aminoácido essencial é o aminoácido mais limitante do qual um escore químico de qualidade da proteína é calculado (MAHAN & SCOTT-STUMP, 2005).

Embora a composição de aminoácidos essenciais das proteínas de levedura não seja comparável às proteínas de origem animal, nutricionalmente eles representam cerca de 70

a 85% do valor da caseína (CABALLERO-CÓRDOBA et al., 1997), equiparando-se às melhores proteínas de origem vegetal, como a soja, e constituindo-se em um excelente complemento para alimentos formulados à base de cereais (KINSELLA, 1987).

O fator limitante são os aminoácidos sulfurados, metionina mais cistina (KINSELLA & SHETTY, 1978). Entretanto, a quantidade equilibrada de aminoácidos essenciais aproxima-se dos valores recomendados pelo padrão de referência da FAO, destacando-se o fato de apresentar alto teor de lisina, treonina e triptofano (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Em trabalho realizado por ALVIM et al. (2002), a adição de derivados de levedura (autolisado e extrato) e caseína à farinha de milho extrusada possibilitou a melhora significativa da qualidade nutricional do produto, com a elevação do teor protéico, fibras, a diminuição do teor de carboidratos, lipídios e o aumento nos índices de absorção de água para as formulações desenvolvidas com extrato de levedura.

Em pesquisa similar, SANTUCCI et al. (2003), utilizaram-se o extrato de levedura para enriquecimento de biscoitos do tipo água e sal. A adição de 5% de extrato de levedura permitiu a obtenção de um produto com um teor médio de 9% de proteína, 2% de fibra alimentar, 15% de lipídeos e 65% de carboidratos. Além do aspecto nutricional, observou-se grande aceitabilidade do consumidor.

Pela Tabela 6 compara-se o perfil de aminoácidos essenciais em células íntegras de levedura de cerveja, isolado proteico de soja e o padrão de referência FAO/WHO/UNU (1985).

Tabela 6. Composição de aminoácidos essenciais em células íntegras de levedura de cerveja (CLC) e isolado protéico de soja (IPS) comparado ao padrão de referência da FAO/WHO/UNU (1985).

Aminoácidos (mg/100g proteína)	CLC*	IPS**	Padrão FAO
Isoleucina	5,6	4,9	2,8
Leucina	8,8	8,2	6,6
Lisina	7,3	6,3	5,8
Metionina + cistina	2,8	2,6	2,5
Fenilalanina + tirosina	9,9	9,0	6,3
Treonina	6,2	3,8	3,4
Triptofano	1,1	1,3	1,1
Valina	6,2	5,0	3,4
Histidina	2,0	2,6	1,9

Fonte: (*) PACHECO (1996) (**) HENLEY & KUSTER (1994).

Experimentalmente o valor nutricional de uma proteína é realizado com animais-controle mediante curvas de crescimento, quociente de eficiência protéica (PER), quociente de eficiência protéica líquida (NPR) e balanço de nitrogênio. Com estes parâmetros calcula-se a digestibilidade da proteína (nitrogênio ingerido/nitrogênio absorvido), o valor biológico (nitrogênio retido no organismo/nitrogênio absorvido) e a utilização líquida de proteína (nitrogênio retido no organismo/nitrogênio ingerido). No cálculo dos índices verdadeiros, deve-se subtrair do nitrogênio excretado nas fezes e urina dos animais dos grupos experimentais o nitrogênio endógeno excretado nas fezes e urina do grupo de animais em dieta aprotéica (VILELA et al., 2000).

No caso da avaliação da qualidade nutricional de proteínas em seres humanos, a OMS (Organização Mundial da Saúde) e FDA (*Food and Drug Administration*) adotaram uma contagem de aminoácidos corrigida para digestibilidade de proteína (PDCAAS) como ensaio oficial. O PDCAAS é baseado nas necessidades de aminoácidos de crianças com idade entre 2 e 5 anos e representa o escore de aminoácidos após a correção para digestibilidade. As proteínas que, após a correção quanto à digestibilidade, fornecem aminoácidos iguais às necessidades ou em excesso, recebem o PDCAAS de 1 (MESSINA, 1995).

Na Tabela 7 relaciona-se os índices obtidos para proteína de levedura de cerveja após rompimento mecânico (PLC) e proteína de soja (PS) em teste realizados com ratos da linhagem *wister*.

Tabela 7. Índices nutricionais de proteína da levedura de cerveja após rompimento mecânico (PLC) comparados à proteína de soja (PS).

Índices nutricionais	PLC*	PS**
Digestibilidade aparente (Da%)	85,0	81-82
Valor biológico aparente (Vba%)	75,0	48-61
Utilização líquida aparente de proteína (NPUa%)	88,0	58-69
Ganho de peso por proteína ingerida (PER)	2,16	1,80

(*) PACHECO, (1996) (**) SNYDER & KNOW (1987).

Os dados mostram que a digestibilidade aparente para as proteínas de levedura, quando rompidas, equipara-se à proteína de soja. O mesmo pode-se concluir para o valor biológico, a utilização líquida de proteína e ganho de peso. Considerando-se esses aspectos pode-se afirmar que a proteína de levedura apresenta boa qualidade nutricional quando comparada à soja.

Cabe ressaltar também que o rompimento da célula de levedura é um importante fator tecnológico no processamento da biomassa, uma vez que permite o melhor aproveitamento da levedura como complemento alimentar.

2.3. O extrato de levedura

O extrato de levedura é um aditivo alimentar natural, resultante da concentração dos componentes celulares solúveis, proteínas, fibras, minerais e nucleotídeos, obtidos por autólise, plasmólise ou processos combinados (BEHALOVÁ et al., 1991).

A autólise é um processo irreversível e ocorre pela ação de enzimas endógenas em condições específicas de pH e temperatura. Porém, o processo pode ser acelerado por agentes plasmolizantes como cloreto de sódio, solventes orgânicos e enzimas proteolíticas (DE ROOIJ & HAKART, 1985).

No Brasil, o interesse pela produção de extratos de levedura tem sido despertado pela alta disponibilidade de matéria-prima, como resíduo das indústrias de fermentação e pelo crescente mercado de aplicação deste tipo de produto (OLIVEIRA e CASTRO-GOMEZ, 2005).

2.3.1. A composição química do extrato de levedura

A composição química do extrato de levedura depende da qualidade e composição da biomassa utilizada e, principalmente, do processo industrial de ruptura celular (DZIEZAK, 1987).

Vários métodos de ruptura celular são descritos por LINDBLOM (1974), VANANUVAT & KINSELLA (1978), KINSELLA & SHETTY (1978), SGARBIERI et al. (1999), OLIVEIRA e CASTRO-GÓMEZ (2005).

O processo mecânico de rompimento celular permite a obtenção de produtos com boas propriedades funcionais e é utilizado na produção de isolados protéicos (NEWELL, et al., 1972).

Entretanto, pesquisas têm mostrado que extratos obtidos por autólise, embora necessitem de maior tempo de processo, apresentam um perfil de gosto e sabor superior aos produtos obtidos por processos mecânicos ou químicos (OLIVEIRA e CASTRO-GÓMEZ, 2005).

O gosto característico conferido por esses produtos é denominado *umami* e é produzido pela composição dos quatro gostos básicos: doce, ácido, salgado e amargo. As moléculas responsáveis por esses atributos são os aminoácidos e nucleotídeos (HEDENSKOG & EBINGHAUS, 1972; CONN, 1992).

A Tabela 8 mostra a composição química de diferentes derivados obtidos por fracionamento da levedura de cervejaria, comparada à levedura íntegra. Observa-se no extrato elevado teor de proteínas, cinzas e RNA.

Tabela 8. Composição química de derivados de levedura de cerveja obtida por autólise.

Componente (%)	Biomassa	Autolisado	Extrato	Parede
Proteína (Nx5,8)	48,74	46,45	61,54	32,70
Ácido ribonucleico	5,70	7,80	6,90	1,83
Lipídios	3,33	3,30	1,89	4,54
Cinzas	8,55	8,83	12,50	4,43
Fibra total	24,40	25,03	2,70	55,04
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70	31,59
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00	23,45

Fonte: SGARBIERI et al. (1999) Resultados de determinações feitas em duplicata.

A Tabela 9 mostra o perfil de aminoácidos em diferentes derivados da autólise de levedura de cerveja.

Tabela 9. Composição aminoacídica de alguns derivados da levedura de cervejaria.

(mg/100mg Proteína)	Biomassa	Autolisado	Extrato	Parede celular
Ácido aspártico	11,98	11,11	11,81	10,14
Treonina	6,16	5,84	5,19	7,81
Serina	6,13	6,44	5,57	9,08
Ácido glutâmico	13,15	12,53	13,40	13,88
Prolina	4,45	4,72	4,62	5,39
Glicina	4,93	4,99	5,14	4,06
Alanina	7,07	7,59	8,97	7,19
Cistina	0,84	0,90	1,30	1,45
Valina	6,20	5,87	6,76	5,61
Metionina	2,50	1,21	1,26	1,56
Isoleucina	5,64	4,87	5,69	5,27
Leucina	8,84	7,80	8,07	7,65
Tirosina	4,68	3,57	2,17	2,21
Fenilalanina	5,30	4,96	4,74	4,72
Lisina	7,13	9,54	8,58	8,31
Histidina	2,06	3,15	3,01	2,24
Arginina	4,11	2,40	1,01	1,78
Triptofano	1,45	1,55	1,31	-----

Fonte: SGARBIERI et al. (1999).

A Tabela 10 fornece a composição mineral em derivados de levedura de cervejaria (*Saccharomyces* sp). De acordo com SGARBIERI (1999), levando-se em consideração as recomendações do NAS (1989) (*National Academy of Science*) e o limite de

consumo de levedura íntegra em 30 gramas por dia/adulto, os derivados de levedura são considerados pobres como fontes de minerais.

Tabela 10. Composição mineral de autolisado total (AT), extrato de levedura (EX), parede celular (PC) de levedura de cerveja (*Saccharomyces* sp.).

Elementos	Resultados (mg/100g)*			Recomendação**
	AT	EX	PC	
Sódio	605 ± 10,0	1475,5 ± 35,5	136,0 ± 2,0	2000
Cálcio	412,6 ± 12,0	99,0 ± 3,6	883,0 ± 15,0	1200
Magnésio	161,8 ± 2,5	264,0 ± 9,3	31,4 ± 0,3	350
Fósforo	1178,5 ± 19,5	1927 ± 33,0	308,0 ± 5,0	1200
Potássio	1365,5 ± 31,5	1877,5 ± 56,5	173,0 ± 3,0	2500
Ferro	10,0 ± 0,1	4,5 ± 0,3	56,0 ± 6,0	10-15
Manganês	3,7 ± 0,07	5,0 ± 0,1	5,6 ± 0,5	2-5
Zinco	4,0 ± 0,3	6,4 ± 0,4	6,8 ± 0,5	10-15
Cobre	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,06	2,8 ± 0,1	2-3
Cobalto	0,3 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,24 ± 0,03	----
Cromo	0,3 ± 0,04	0,6 ± 0,03	1,8 ± 0,1	0,2

Fonte: SGARBIERI et al. (1999).

* Médias de 3 determinações ± desvios-padrão de duas amostras diferentes.

** Requerimento diário, conforme NAS (1989), para adultos jovens.

2.3.2. O mercado de extratos de levedura autolisada

Dados de 1996 mostram que o consumo anual de flavorizantes sabor carne, na Europa, era de cerca de 41.000 toneladas, das quais cerca de 30.000 eram advindas de extratos vegetais ou de levedura, com sua maior aplicação na produção industrial de sopas desidratadas, conforme Tabela 11.

Tabela 11. O consumo de flavorizantes sabor carne na Europa em 1996.

Produto	Toneladas/ano
Sopas	21.900
Refeições	8.350
Snacks	1.950
Misturas	8.800

Fonte: PEIXOTO (1996).

No Brasil, os realçadores mais consumidos são o glutamato monossódico (MSG), proteína vegetal hidrolizada e extratos de levedura. Dados do IBGE citados por RÉVILLION et al. (2000), conforme a Tabela 12, mostram o consumo per capita anual de alguns realçadores de sabor por classe de produto consumido.

Tabela 12. Consumo per capita domiciliar de realçadores de sabor por classe de produtos industrializados no ano de 2000.

Produtos	Consumo per capita anual (em kg) ¹
Biscoito, roscas, etc	3,932
Mortadela, presunto, salchicha, linguiça	4,178
Outros sais ²	0,917
Massa/molho de tomate	0,002
Salgadinhos	0,288

Fonte: IBGE *apud* RÉVILLION et al. (2000).

- (1) Regiões metropolitanas de Belém, Fortaleza, Recife, Salvador, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Porto Alegre, Brasília-DF e o município de Goiânia.
 (2) Glutamato monossódico, sal dietético.

O valor do mercado potencial anual de extrato de leveduras no Brasil atingiu a soma de 86,7 milhões de dólares, sendo 44,5% para os setores de embutidos e cárneos, 41,9% para biscoitos e 9,7% para massa de tomate, conforme mostra a Tabela 13 (RÉVILLION et al. 2000).

Tabela 13. O mercado de extratos de leveduras no Brasil.

Produtos	Consumo médio per capita anual ¹ (kg)	Mercado potencial Anual ² (em kg)	Mercado Anual ³ (US\$)
Biscoitos, roscas	0,0983	15.433.100	36.267.785
Mortadela, presunto	0,1045	16.406.500	38.555.275
Salchicha, linguiça, massa de tomate	0,0229	3.595.300	8.448.955
Outros sais	0,0020	314.000	737.900
Salgadinhos	0,0072	1.130.400	2.656.440
Total	0,2349	36.879.300	86.666.355

Fonte: RÉVILLION et al. (2000).

- (1) Utilização média de 2,5% (em peso) de extrato de levedura comercial nos diferentes produtos relacionados, com exceção de outros sais.
 (2) Considerando-se a população do País de 157 milhões de pessoas (IBGE, 1996).
 (3) Suposição de volume anual de vendas de extrato de levedura a um valor posto de fábrica de 2,35 US\$/kg.

Nos Estados Unidos, o uso de extrato de levedura é padronizado pelo Ministério da Saúde por categoria de produto industrializado, conforme mostra a Tabela 14. A biomassa protéica é recomendada como fonte adicional de proteínas para o enriquecimento de dietas, farinhas de cereais, proteínas vegetais, preparo de sopas desidratadas e temperos (NÓBREGA, 1985).

Tabela 14. O uso da biomassa protéica de levedura no preparo de alimentos nos Estados Unidos.

Alimento	Dosagem (%)
Massa de macarrão	6,0-10,0
Pastas: presunto, queijo, peixe, carnes e outros	2,0-7,0
Sopas e temperos	5,0-12,0
Carne enlatada	7,0-10,0
Tortas de carne	4,0-8,0
Alimentos para bebê	10,0
Conservas alimentícias geriátricas	0,5-2,0
Alimentos vegetarianos	5,0-10,0
Pratos prontos	10,0

Fonte: NÓBREGA (1985).

2.3.3. Processo de obtenção industrial

Numa planta industrial para produção de extrato de levedura, utiliza-se a biomassa recuperada de processos fermentativos ou parte-se de uma cultura pura. As etapas operacionais correspondem a lavagem e limpeza da biomassa, autólise, centrifugação, clareamento e secagem (OLIVEIRA, 2001).

A limpeza e o desamargamento da biomassa é realizada utilizando-se solução alcalina, conforme SGARBIERI et al. (1999). Após esta etapa, realiza-se o rompimento celular. O processo de autólise é realizado sob agitação por um período médio de 24 a 32 horas, numa temperatura entre 45 a 55°C. O autolisado é pasteurizado e centrifugado para obtenção do extrato bruto solúvel, isento de paredes celulares. Em seguida é clarificado e concentrado por secagem em *Spray drier*, em temperaturas variando entre 120 a 130°C (OLIVEIRA e CASTRO-GOMEZ, 2005).

Partindo-se da biomassa gerada da fermentação alcoólica, o processo inicia-se com a obtenção do leite de levedura por centrifugação. O leite de levedura constitui-se de uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* numa concentração de aproximadamente 20% da matéria seca e 7 a 10% de etanol (v/v).

O leite de levedura é bombeado para um tanque de equilíbrio e então diluído com água e concentrado por centrifugação; esta operação é denominada lavagem e objetiva a diminuição do teor alcoólico e clarificação do leite de levedura.

O leite de levedura clarificado é transportado para um segundo tanque onde realizam-se os seguintes procedimentos: (i) adição e dissolução do cloreto de sódio numa quantidade equivalente a aproximadamente 10 a 30% da matéria seca total; (ii) aquecimento por meio de um trocador de calor de placas até temperatura entre 40 a 60°C; (iii) controle de

pH pela adição de hidróxido de sódio ou ácido sulfúrico; (iv) agitação lenta por até 32 horas. Estes procedimentos constituem a combinação dos processos de autólise e plasmólise e objetivam o rompimento da parede celular da levedura e a liberação dos constituintes solúveis, predominantemente protéicos e outros derivados.

O autolisado de levedura obtido é diluído com água e bombeado para uma centrífuga onde é removida a fração insolúvel de parede celular, da fração solúvel, a qual denomina-se extrato de levedura.

O extrato de levedura, solúvel, é enviado para um terceiro tanque e a fração de parede celular residual é recentrifugada para recuperação do extrato remanescente. Este extrato recuperado é enviado para o mesmo tanque de equilíbrio que contém o extrato principal.

Novamente o extrato é bombeado para uma centrífuga clarificadora para nova remoção das paredes celulares que persistem nas centrifugações anteriores e desta operação unitária resulta uma solução com 2 a 4% de sólidos solúveis, que é estocada em outro tanque.

O extrato de levedura é então enviado para um trocador de calor tubular para pré-aquecimento até 60°C e, sequencialmente, concentrado à baixa pressão num evaporador-concentrador vertical tubular.

O extrato concentrado, solução com 34 a 36% de matéria seca, segue para pasteurização e resfriamento através de dois trocadores de calor de placas. A partir daí o extrato pasteurizado é bombeado para um secador-pulverizador denominado “*spray-drier*”. Neste secador a solução de extrato concentrado é pulverizada, formando gotículas num ambiente de ar filtrado quente e seco; o contato das partículas com o ar quente e seco provoca a evaporação da água, resultando um pó fino e claro, de tonalidade bege, com umidade entre 5 a 7%, denominado extrato seco de levedura.

A fração de parede celular é tratada quimicamente para obtenção de outras subfrações, como glucanas, para utilização na formulação de alimentos. O rendimento em massa de extrato produzido varia de 50 a 60%.

O extrato de levedura é transportado pneumaticamente para um silo e posteriormente embalado em sacos de polietileno e armazenado em ambiente climatizado com temperatura e umidade relativa controladas.

A limpeza dos tanques, tubulações, válvulas e bombas é realizada por um sistema do tipo *clean in place* (CIP), utilizando-se solução de soda cáustica a 2%, solução de ácido fosfórico a 2% e água quente, sendo estas operações automatizadas (OLIVEIRA, 2001).

2.3.4. Fundamentação do processo de autólise

Um estudo para produção de extrato de levedura por processo de autólise deve incluir vários aspectos operacionais de separação de insolúveis, clarificação, concentração e secagem, mas um dos requisitos mais importantes é a determinação dos melhores parâmetros de rompimento celular (JIMÉNEZ et al., 1993).

Células envolvidas apenas por membranas celulares apresentam relativa facilidade de ruptura pelo fato de serem frágeis, o que pode ocorrer por simples variação da pressão osmótica ou aplicação de ultra-som de baixa intensidade. Por outro lado, células constituídas de parede celular requerem condições mais específicas de rompimento. É o caso das leveduras que apresentam, além da membrana plasmática, a parede celular constituída principalmente por polímeros rígidos de glucanas, mananas e quitina (CHARPENTIER et al., 1986).

O mecanismo bioquímico que leva a ruptura da parede celular da levedura está relacionado à ação sinérgica das enzimas endógenas (glucanases, manases e quitinases) da própria célula (CHARPENTIER et al., 1986). O processo é irreversível e pode ser acelerado pelo uso de autolisado fresco de levedura, na ordem de 15% (v/v), cloreto de sódio, em temperatura e pH específicos (KOLLAR et al., 1991). Outros processos utilizam o tratamento de células intactas de levedura com enzimas líticas comerciais como zimolase e lisozima para acentuar a liberação de nitrogênio protéico (KNOOR et al., 1979).

2.3.4.1. Efeito da temperatura, pH e etanol

Temperaturas elevadas causam a morte rápida da levedura, sendo que, a 48°C, aproximadamente 95% das leveduras morrem em 45 minutos; a 50°C, em 18 minutos e a 52°C, em 6 minutos (REED & NAGODAWITHANA, 1991).

O efeito da temperatura nas células de levedura é bastante complexo e afeta a síntese e atividade das enzimas endógenas, mecanismo de controle celular, transferência de informação anabólica dos genes aos ribossomos, absorção de íons e moléculas e, o mais importante, a composição e a integridade das membranas semipermeáveis (REED & NAGODAWITHANA, 1991).

As membranas celulares possuem lipídeos e proteínas, além de cátions para sua estabilização. Se a temperatura de incubação de uma suspensão de leveduras for reduzida de 30°C para 20°C, dois efeitos simultâneos ocorrem: a atividade enzimática de uma série de

enzimas diminuirá e as membranas ficarão mais impermeáveis, devido a um aumento na relação ácido graxo saturado/insaturado e, por conseguinte, tenderão a solidificar-se. Se a temperatura subir de 30°C para 40°C, o processo inverso ocorrerá. Estas mudanças, feitas gradativamente, proporcionam à levedura tempo para adaptar-se às novas condições, modificando a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, não havendo assim perigo de uma mudança na integridade e eficiência das membranas. A 40°C, a levedura não se multiplica e a porcentagem de levedura autolisada aumenta sensivelmente. A uma temperatura mais baixa, a taxa de multiplicação é maior, sendo menor a porcentagem de células autolisadas (IIMURA et al. 1980; RÉVILLION & PIBERNAT, 1996).

O efeito da temperatura no processo da autólise de leveduras pode ser analisado sob diferentes aspectos. Primeiramente há a liberação das enzimas endógenas através da membrana celular, facilitando assim as reações a liberação dos compostos intracelulares no meio (BABAYAN & BERZUKOV, 1985 apud RÉVILLION & PIBERNAT, 1996, p. 197). Posteriormente inicia-se a hidrólise das endo-estruturas celulares e a eficiência do processo irá depender de vários fatores entre os quais a estabilidade das enzimas, a afinidade da enzima em relação a ativadores e inibidores, as reações de competição, a afinidade enzima-substrato e a velocidade de quebra do complexo enzima-substrato (WITHAKER, 1972 apud RÉVILLION & PIBERNAT, 1996, p.197).

FEUILLAT & CHARPENTIER, 1982 (apud RÉVILLION & PIBERNAT, 1996, p.197) demonstraram que, em uma solução tampão pH 5, a liberação de nitrogênio, a partir de células de leveduras, é mais rápida nas faixas de temperatura superiores (44°C a 55°C em relação a 36°C). Por outro lado, observou-se também que, após aquecimento a temperatura de 55°C por um período de 4 horas, a concentração de aminoácidos na suspensão celular não aumentava, entretanto, à temperatura de 36°C, a autólise continua por 48 horas ou até mais e as concentrações de nitrogênio obtidas poderão ser tão altas quanto aquelas obtidas a 44°C. Esse tipo de cinética sugere que, em primeiro lugar, ocorra uma liberação passiva de compostos nitrogenados das células para o meio, seguida de uma liberação ativa (enzimática), a qual é rapidamente inibida em altas temperaturas.

De acordo com FEUILLAT, 1986 (apud RÉVILLION & PIBERNAT, 1996, p.197) dependendo da temperatura de incubação, pode-se obter autolisados de leveduras com diferentes características: a incubação da biomassa a 30°C durante 48 horas permite a obtenção de um autolisado menos rico em nitrogênio e nucleotídeos, mas com células que possuem uma forte atividade proteásica intracelular, conservando então uma forte capacidade autolítica residual.

As globulinas constituem a maioria das proteínas de levedura, sendo que a solubilidade destas varia consideravelmente em função do pH (PACHECO, 1996). A solubilidade é afetada principalmente pelas condições de processamento, sendo mínima, em torno do pH 4,0 (região isoelétrica), aumentando gradativamente com a elevação do mesmo. A repulsão das moléculas de proteínas, devido ao excesso de cargas de mesmo sinal, contribui para sua maior solubilidade, sendo que, no ponto isoelétrico, devido à compensação de cargas, ocorre a diminuição da solubilidade, tendendo à formação de precipitados protéicos (SGARBIERI, 1996).

Na literatura, alguns trabalhos mencionam condições de pH nas quais se realiza autólise de leveduras. SUGIMOTO et al. (1973) e JIMENEZ et al. (1993) mencionam processos realizados em pH 4,0. Por outro lado, BEHALOVÁ et al. (1991) citam que uma alta atividade autolítica poderá ocorrer em pH em torno de 3,0 a 5,0.

Em relação à utilização de etanol, RÉVILLION & PIBERNAT, 1996 relatam que alguns inconvenientes podem ocorrer na obtenção de extratos ou produtos derivados da ação de enzimas intracelulares. O primeiro deles é a possível ação desnaturante do etanol sobre as enzimas, mesmo que estas permaneçam dentro dos limites celulares durante a permeabilização. O segundo inconveniente é a perda irrecuperável de compostos intracelulares liberados durante o período de permeabilização e descartados junto com o solvente, o que necessariamente não permite a obtenção de um extrato celular com a mesma riqueza de compostos dessa natureza em relação aos métodos físicos de ruptura celular.

2.3.4.2. Efeito do NaCl na liberação dos compostos intracelulares

Uma célula sem parede celular, ao ser imersa numa solução, irá absorver ou perder água para o meio, na busca de igualar o diferencial de pressão osmótica. Quando imersa numa solução sob extrema concentração de sal, a água flui do meio diluído para o mais concentrado, ou seja, do interior da célula para a solução salina e esta tende a contrair-se na tentativa de igualar a concentração de solutos ao longo da membrana, ocasionando, conseqüentemente, a perda do material intracelular; o inverso também poderá ocorrer e causar o inchamento e perda do material intracelular. Quando esta condição persiste por muito tempo, a levedura rapidamente morre e inicia-se o processo de degradação. Uma solução salina de concentração tal que a célula não se rompa nem se encolha nela é denominada isotônica (CASTELLAN, 1983).

Apesar das muitas diferenças visíveis, as células de leveduras são semelhantes em suas características estruturais básicas. A arquitetura molecular da membrana plasmática é basicamente a mesma, constituindo-se em camadas de lipídeos e em uma variedade de proteínas especializadas (NELSON & COX, 2000). A membrana celular, também chamada membrana plasmática, é seletivamente permeável. Ela permite que os sais e nutrientes necessários entrem na célula e que os produtos de excreção saiam, mas, usualmente, exclui a entrada de substâncias não necessárias (ROCHA-FILHO, 2003).

As proteínas de levedura são predominantemente insolúveis ou muito pouco solúveis em água. A solubilidade é grandemente aumentada pela adição de sais neutros, como o NaCl. Podem ser facilmente extraídas com soluções salinas, entre 2 e 10% de NaCl. Em baixas concentrações de s íons, normalmente, a solubilidade aumenta pelo fato de ocorrer a associação dos íons salinos com as proteínas, contribuindo para uma maior hidratação e repulsão entre as moléculas, portanto, uma maior solubilidade da proteína *salting in*. Ao contrário, em alta concentração de íons, há competição da proteína pela água, causando a precipitação protéica, *salting out* (SGARBIERI, 1996).

Embora o uso de cloreto de sódio seja vantajoso sob o ponto de vista da produtividade de extrato, sua aplicabilidade na indústria de alimentos poderá tornar-se limitada devido ao alto teor de sódio, embora industrialmente esta seja a prática mais comum. Um procedimento usualmente adotado na produção de extrato de levedura envolve o controle da concentração salina. Desta forma, a adição de NaCl em concentração otimizada poderá facilitar a liberação do material citoplasmático do interior da célula e melhorar a produtividade do extrato (REED & NAGODAWITHANA, 1995).

Dados sobre teores de NaCl utilizados em processo de plasmólise são citados por alguns autores. SUGIMOTO et al. (1973) e JIMENEZ et al. (1993) mencionam uma faixa de 15 a 30 gramas de NaCl para cada 100 gramas de biomassa em base seca para temperaturas variando entre 30 e 70°C. OLIVEIRA, 2001 obteve resultados satisfatórios na extração de proteínas utilizando cerca de 12% de NaCl em base seca de biomassa. SGARBIERI et al. (1999) cita 2% de NaCl, entretanto, o processo requer a utilização de cerca de 15% de pré-autolisado. De forma geral, um bom rendimento de processo depende dos efeitos e das interações entre todas as variáveis envolvidas, sobretudo no mecanismo autolítico de ruptura celular.

2.3.4.3. Mecanismos autolíticos de ruptura celular

A parede celular das leveduras é constituída por duas camadas principais: uma interna de glucana e uma externa de manana, sobreposta à camada de glucana (VALENTÍN et al., 1987; FLEURI & SATO, 2005).

A glucana é insolúvel e responsável pela formação do “envelope” que proporciona rigidez à parede celular e proteção contra choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos. É formada por 48 a 60% de polímeros β -1,3 e β -1,6 glicose interconectadas covalentemente com a quitina, um polímero β -1,4 N-acetilglicosamina, constituindo em média 0,6 a 2,7% em relação à quitina (FLEURI & SATO, 2005).

A manana é formada por manoproteínas, constituídas por sua vez de polímeros de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6, ligadas covalentemente a peptídeos, formando os glicopeptídeos. É responsável pela proteção da célula contra fatores externos, pela porosidade da parede celular e proteção contra os ataques de enzimas sintetizadas por outros microrganismos (FLEURI & SATO, 2005).

De modo geral, os polissacarídeos presentes nas paredes celulares das leveduras têm um papel fundamental na determinação da rigidez e manutenção da morfologia celular (quitina e glucana). A parede celular como um todo constitui aproximadamente 30 a 40% da massa seca da célula e é uma estrutura em mudança e crescimento contínuo. É formada por aproximadamente 40% de β -glucanas, 40% de α -mananas, 8% de proteínas, 7% de lipídios, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (HOUGH, 1990).

A Tabela 15 fornece a composição percentual de alguns componentes da parede celular semi-purificada, obtida por processo de autólise industrial. Como se observa, dentre os componentes da parede celular, os que se destacam em maior quantidade são as glucanas (42,9%) e a mananas (25,1%) em peso.

Tabela 15. Fracionamento dos componentes da parede celular de levedura semi-purificada, obtida por processo de autólise industrial.

Componentes	Quantidade (g)	Rendimento (%)
Parede celular	1.000,0	100,0
Fração lipídica	61,8	6,2
Glicoproteína	94,9	9,5
Mananas	251,3	25,1
Glucanas	429,2	42,9
Recuperação	837,2	83,7

Fonte: CHAUD e SGARBIERI (2006).

Segundo MRSA et al., 1999 (apud FLEURI & SATO, 2005, p.3) a parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por cerca de vinte tipos de mananoproteínas e desempenham diferentes funções na construção, preservação, modificação da estrutura e nos processos de floculação. As mananoproteínas podem ser divididas em três grupos: a) proteínas unidas por pontes de dissulfeto; b) proteínas ligadas covalentemente às β -glucanas e c) proteínas ligadas covalentemente à parede celular.

As mananoproteínas podem estar unidas por pontes de dissulfeto ou ligações não covalentes com polissacarídeos estruturais da parede apresentam atividades enzimáticas e podem ser extraídas por meio de aquecimento com dodecil sulfato de sódio e mercaptoetanol; proteínas ligadas covalentemente às β -glucanas podem ser extraídas somente pela lise da parede celular com diferentes preparações de glucanases, como zymolyase ou laminarinase; proteínas ligadas de forma covalente à parede celular não podem ser extraídas com NaOH 30Mm (MRSA et al., 1999 apud FLEURI & SATO, 2005, p. 3)

Em leveduras, a quitina é encontrada predominantemente em septos primários e em volta do círculo de constrição entre a célula mãe e a jovem. Cerca de 90% da quitina está localizada na cicatriz de brotamento e o restante na parede celular (FLEURI & SATO, 2005).

As enzimas mais importantes que contribuem para o processo de autólise das endoestruturas são a β -1,3 glucanase (1,3- β -D-glucana glucanohidrolase), que catalisa a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,3 glucana; a proteinase ysc A também denominada α -endopeptidase lítica, que catalisa a reação de hidrólise de proteínas, preferencialmente a elastina da parede celular; a quitinase, poli[1,4-(N-acetil- β -D-glicosamina)]glucanoidrolase, que catalisa reações de hidrólise das ligações β -1,4 de N-acetil- β -D-glicosamina da quitina; a carboxipeptidase ysc Y e S, nucleases e as fosfodiesterases (OLIVEIRA, 2001).

O processo da lise enzimática das células de levedura ocorre em passos progressivos e é dependente do sinergismo entre as proteases e a β -1,3-glucanase. A protease ataca a camada externa da mananoproteína, permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de β -glucana, implicando no rompimento da célula por diferença de pressão osmótica. Desta forma, a lise celular ocorre primeiramente pela ação da β (1-3) glucanase e de enzimas proteásicas, enquanto a β (1-6) glucanase e manases participam posteriormente na solubilização da matriz da parede celular, sendo em seguida inativadas, após a formação de um complexo com seu respectivo inibidor presente na célula (McCORNICK, 1987).

A ação isolada das β -glucanases não provoca a lise de células de levedura; somente a atividade sinérgica de glucanases e proteases desestrutura suficientemente o envelope celular para provocar o fenômeno da autólise (SCOTT & SCHEKMAN, 1980; KITAMURA, 1982; HUNTER & ANSENJO, 1988).

A Figura 1 representa a hidrólise enzimática da β -1,3 glucana pela β -1,3 glucanase em suas respectivas unidades básicas.

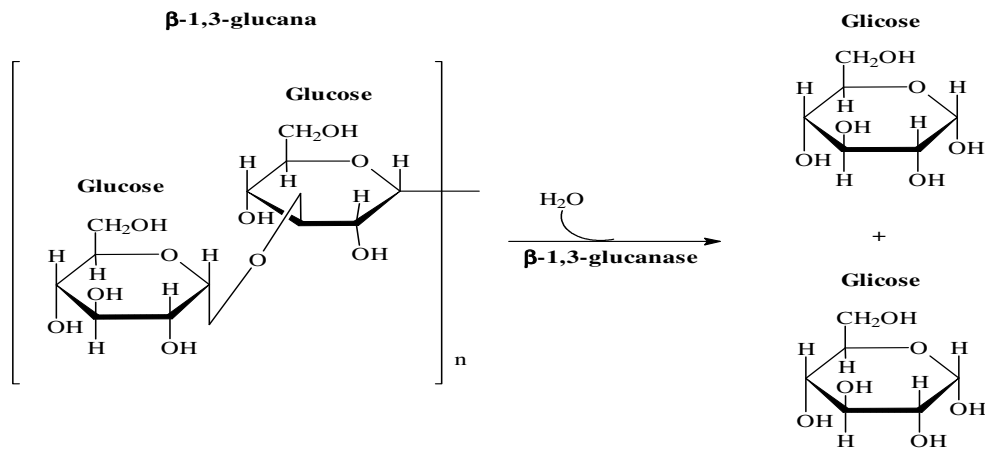


Figura 1. Hidrólise enzimática da β -1,3 glucana.

A Figura 2 representa a hidrólise enzimática da quitina em suas em suas respectivas unidades básicas.

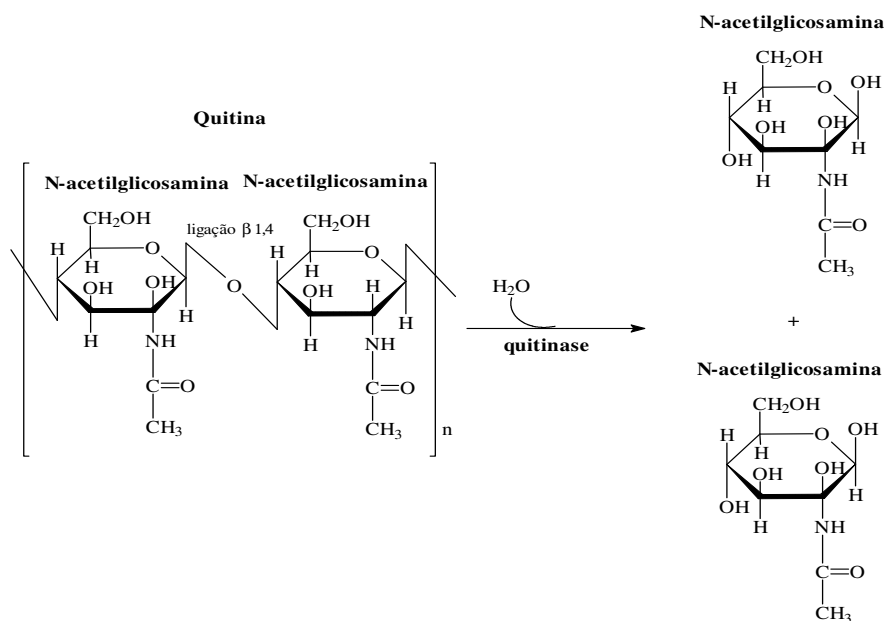


Figura 2. Hidrólise enzimática da quitina.

A Figura 3 representa a hidrólise da manana pela mananase em suas respectivas unidades básicas.

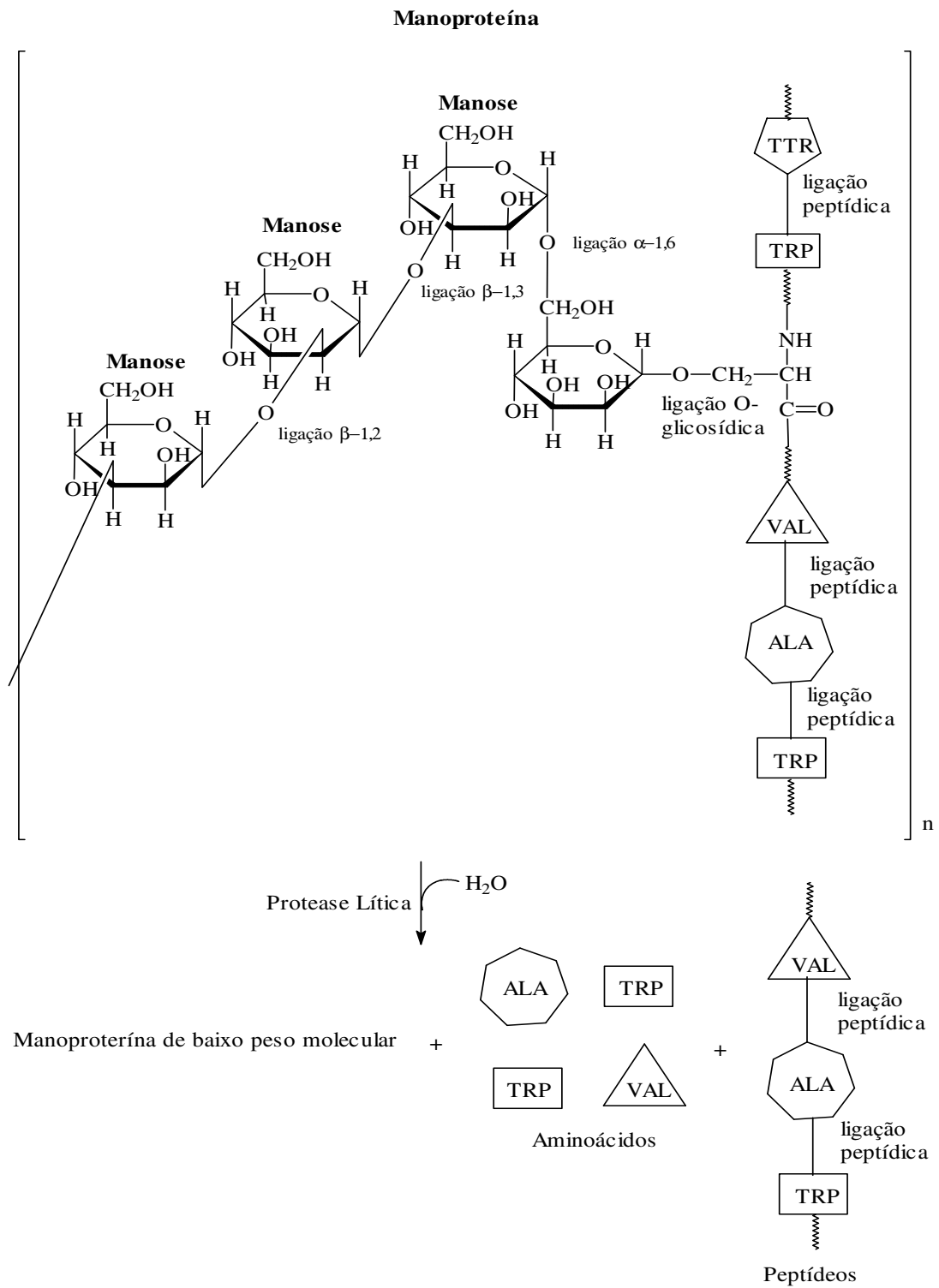


Figura 3: Hidrólise enzimática da manoproteína.

2.4. Aspectos gerais sobre os ácidos nucleicos, nucleotídeos e nucleosídeos

Ácidos nucleicos são biomoléculas responsáveis pelo armazenamento e transferência das informações genéticas do organismo. Consistem de cadeias polinucleotídicas, onde cada nucleotídeo é formado por uma base nitrogenada, uma molécula de açúcar e um grupamento fosfato, como mostra a Figura 4.

O DNA é encontrado principalmente nos cromossomos, enquanto o RNA está presente no citoplasma, havendo muito pouco nos cromossomos, que podem ser dissociado por processos físicos ou químicos (NELSON & COX, 2000).

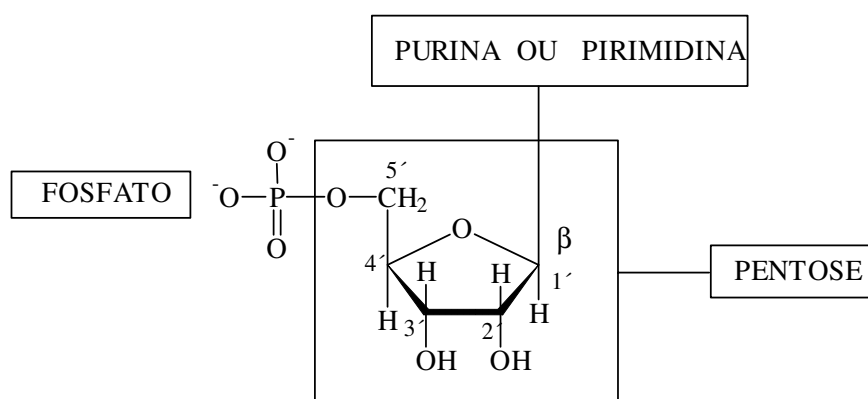


Figura 4. Estrutura genérica de um nucleotídeo.

As purinas e pirimidinas são constituídas pelas bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina, timina e uracila, sendo o RNA constituído por adenina, guanina, citosina e uracila e o DNA por adenina, guanina, citosina e timina, conforme mostra a Figura 5 (NELSON & COX, 2000).

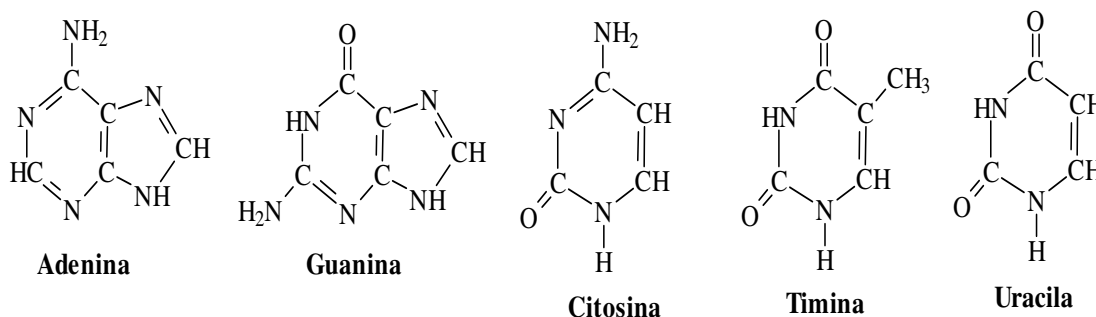


Figura 5. Estruturas químicas das bases nitrogenadas.

No RNA o açúcar é a ribose e no DNA é a desoxirribose. A unidade base-açúcar-fosfato é denominada nucleotídeo e a unidade base-açúcar sem o grupo fosfato é chamada nucleosídeo, conforme a Figura 6 (NELSON & COX, 2000).

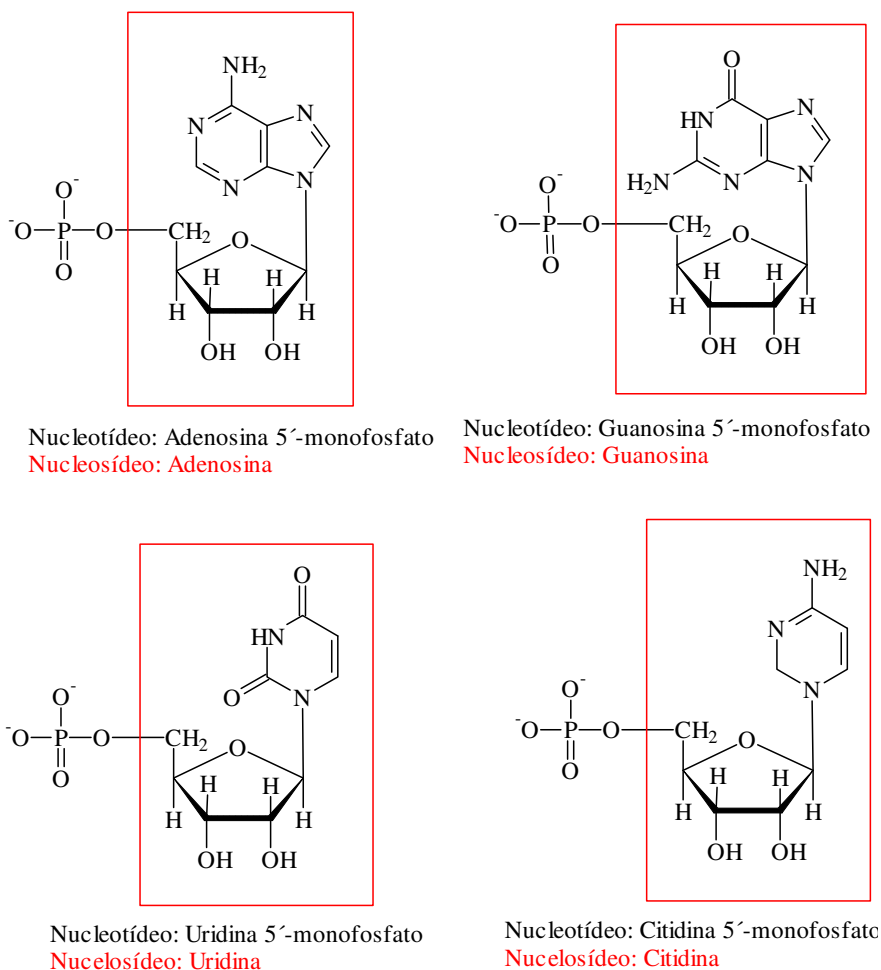


Figura 6. Estrutura química dos nucleotídeo.

Polímeros de RNA, nucleotídeos e nucleosídeos podem estar presentes no extrato de levedura e são explorados para diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e na medicina (HURST, 1980).

Em trabalho desenvolvido por OLIVEIRA (2002), o extrato de levedura de destilaria, obtido a 55°C por autólise, apresentou 1,47% de IMP (inosinato de sódio) e 0,399% de GMP (guanilato de sódio). Para levedura de panificação o melhor resultado foi de 45°C, em que se constatou 0,913% de IMP, mas o GMP não foi encontrado. Entretanto, a 45°C, com o fermento de destilaria obteve-se o maior teor de GMP (0,434%), conforme mostra a Tabela 16.

Tabela 16. Porcentagem de GMP e IMP em extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* autolisado por 40 horas em diferentes temperaturas.

Tipos de levedura	Temperatura(°C)	Compostos	
		IMP	GMP
Panificação	40	0,387	0,109
	45	0,913	ND
	55	0,385	0,243
Destilaria	40	0,388	0,213
	45	0,979	0,434
	55	1,473	0,399

Fonte: OLIVEIRA (2002). ND: Não detectado.

2.4.1. Metabolismo e importância dos nucleotídeos na dieta alimentar

Os ácidos nucleicos são importantes fontes de nucleotídeos e nucleosídeos para a dieta humana; entretanto, a ingestão de RNA em quantidades elevadas pode representar riscos à saúde (ANGSTADT, 1997). Segundo SARWAR et al. (1985) e DZIEZAK (1987) a ingestão de RNA/dia se limite a 2g/dia/adulto, não devendo ultrapassar 4 gramas.

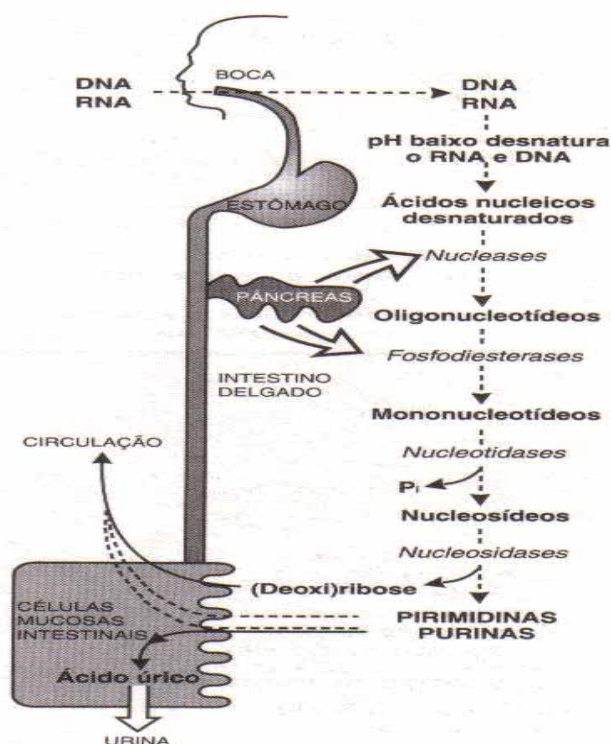


Figura 7. Vias de degradação dos ácidos nucleicos no sistema digestivo humano.

A formação de ácido úrico, devido ao consumo elevado de RNA, advém do fato de o organismo humano não possuir a habilidade de sintetizar a enzima *ácido úrico oxidase*, que cataliza a oxidação do ácido úrico à alantoína, que é mais solúvel que o primeiro

(EDOZIEN et al., 1970 apud CORREA, 1992, p. 16). Por isso, o consumo de quantidades elevadas de purinas, decorrentes dos ácidos nucléicos, leva à síntese de cristais de urato, que são associados a condições clínicas como hiperuricemia e gota, conforme mostra a Figura 8.

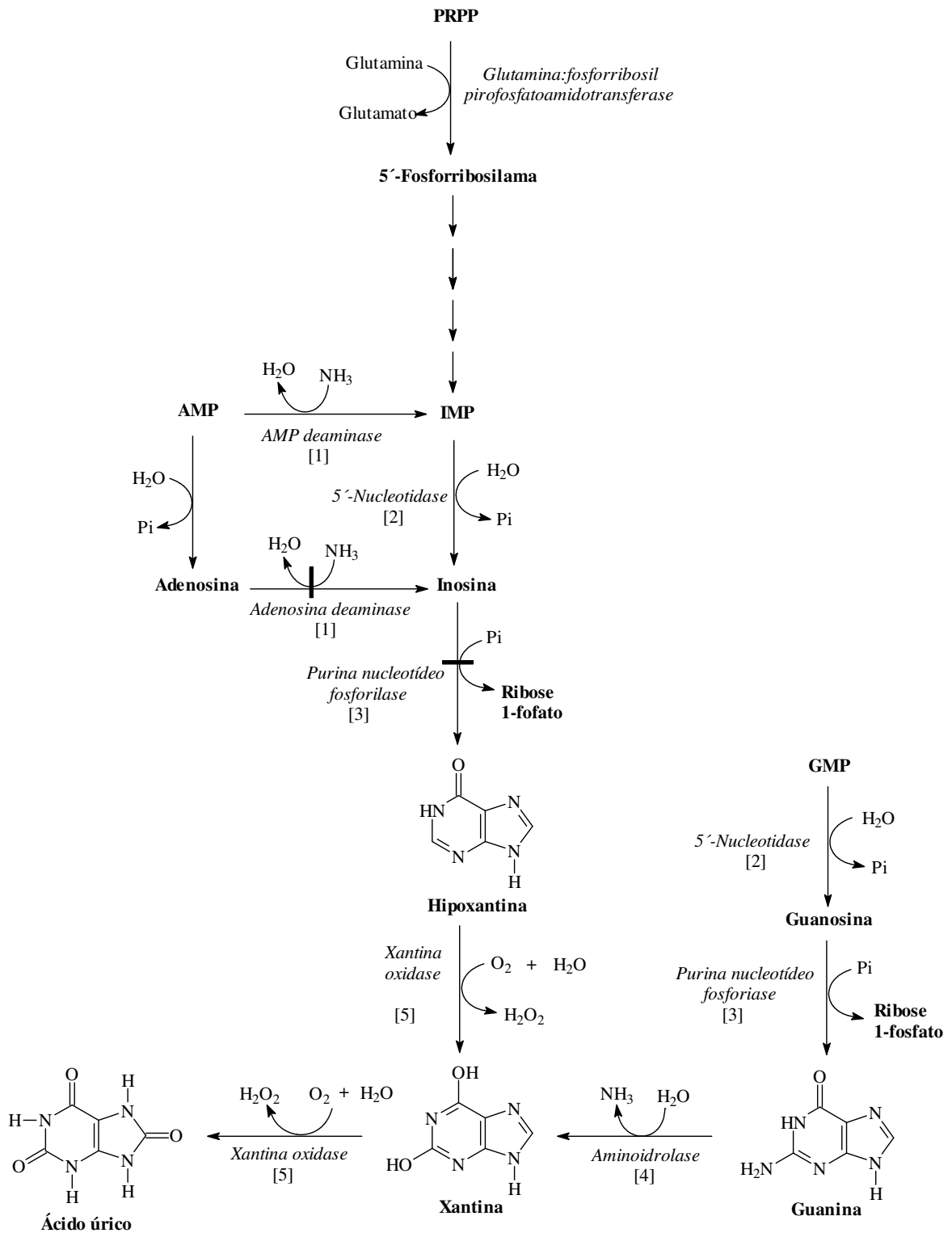


Figura 8. Mecanismo de formação do ácido úrico no organismo humano.

A degradação do ácido úrico da forma cetônica à forma enólica constitui uma reação reversível, o que explica a excreção de parte do ácido úrico na forma de uréia e ácido glioixílico, conforme mostra a Figura 9 (STRIER, 1975 apud CORREA 1992, p.18).

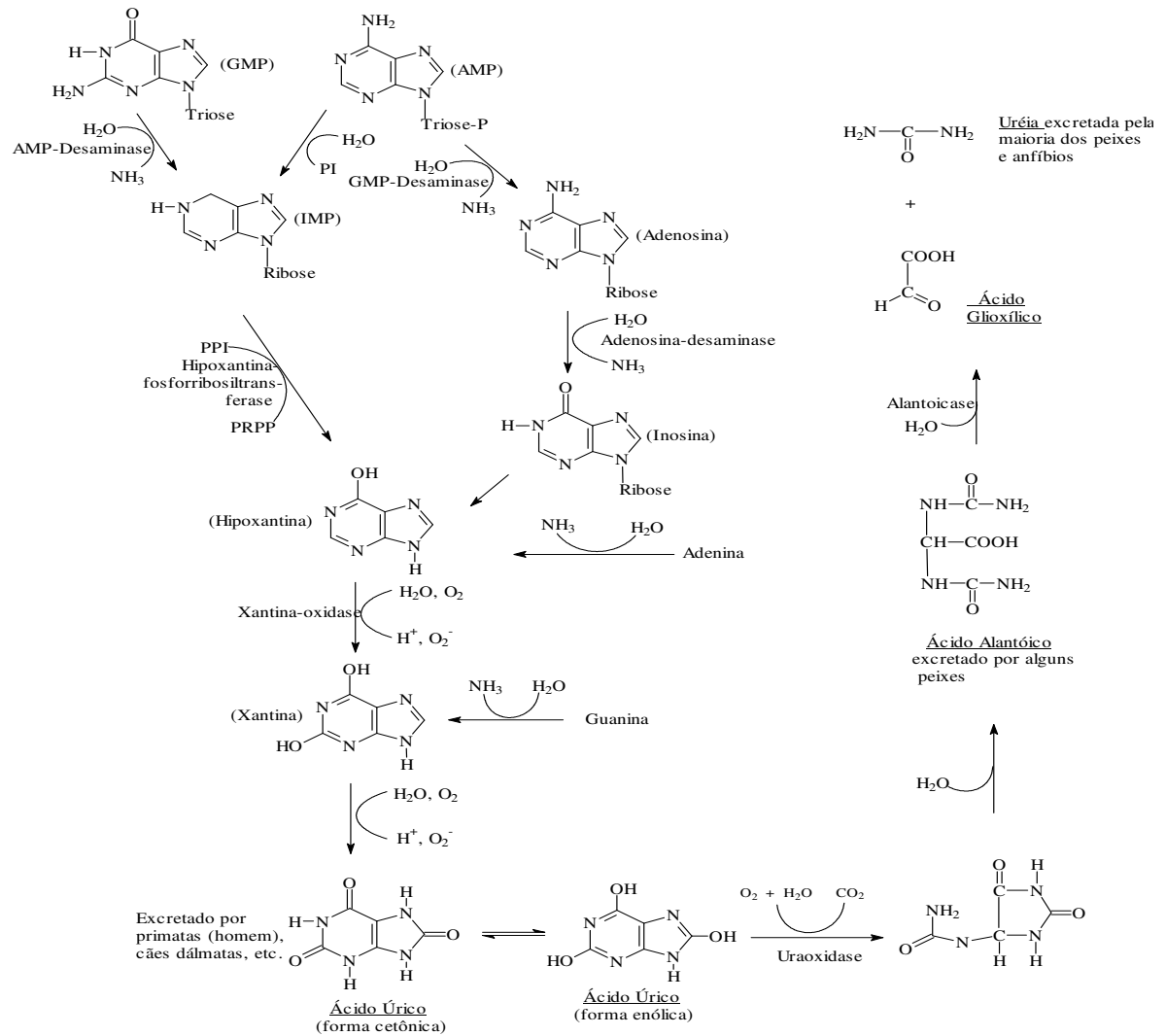


Figura 9. Mecanismo de degradação do ácido úrico a uréia.

Nucleotídeos e nucleosídeos são componentes essenciais dos organismos vivos, pois funcionam como substratos, cofatores de enzimas e transdutores de energia modulação do metabolismo de lipoproteínas, modificações da composição da microflora intestinal, melhoramento das funções gastrointestinais e da resposta imune mediada pelas células T (FERREIRA et al., 2001; PERRIN et al., 2001 apud FRATA, 2006, p. 82).

A adenosina trifosfato (ATP) é a fonte de energia que rege um grande número de reações metabólicas. A guanosina trifosfato (GTP) é usada na síntese de proteínas e também é metabolicamente importante em várias outras reações biológicas. A uridina

trifosfato (UTP) é a fonte de energia para ativação da glicose e da galactose. A uridina difosfato (UDP)-glucose e citidina difosfato (CDP)-diacilglicerol, servem como ativador intermediário na síntese de glicogênio e fosfoglicerídeos, respectivamente. A adenosina monofosfato cíclica (AMP) e guanosina monofosfato (GMP) são mediadores da ação hormonal, sendo a adenina o maior componente de coenzimas como adenina nicotinamida dinucleotídeo (NAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e coenzima A. Defeitos genéticos no metabolismo dos nucleotídeos levam a um grande número de doenças e afetam, conseqüentemente, o sistema imunológico (KARNI et al., 1986; YAMAUCHI et al., 2002).

Atualmente há uma grande restrição em relação ao uso de antibióticos na alimentação animal, uma vez que resíduos desses produtos em carnes, ovos ou leite podem representar riscos à saúde humana ou induzirem a resistência cruzada de bactérias patogênicas. Por isso, alguns países europeus estão restringindo o uso destes produtos (ROSSI et al., 2007). Desta forma, substitutos de antibióticos na alimentação animal devem manter as ações benéficas dos antibióticos e eliminar as indesejáveis, como por exemplo a resistência bacteriana. Um grupo de nutrientes que pode atuar como alternativo aos antibióticos são os nucleotídeos dietéticos (MATEO et al., 2004 apud ROSSI et al., 2007, p. 5).

Os nucleotídeos e seus derivados, quando suplementados na alimentação, têm vários efeitos terapêuticos benéficos e são bem avaliados como agentes imunoestimuladores, por promover a proteção contra infecção bacteriana e aumentar a função imunológica do organismo (BURMEITER & RAINSFORD apud LEE (1997).

Fontes de purinas e pirimidinas desempenham outras funções no metabolismo e são usadas em tratamentos de várias doenças e produção de medicamentos como AZT, azidotimina, (RUDOLPH et al., 1990; YAMAUCHI et al., 2002) e amenizam os problemas de rejeição em transplantes cardíacos (BUREN et al., 1994).

Os nucleotídeos modificam o tipo e o crescimento da microflora intestinal favorecem o desenvolvimento da flora fecal com predominância de bifidobactérias, semelhante à observada no leite materno. Estas bactérias são benéficas uma vez que reduzem o pH intestinal devido a sua capacidade de hidrolisar açúcar a ácido lático, que suprime a proliferação de bactérias patogênicas e inibe o crescimento de bactérias entéricas causadoras de diarreia (ROSSI et al., 2007).

Estudos para avaliação do efeito de nucleotídeos no sistema imune demonstram que crianças vacinadas com antígenos de proteína T tiveram o sistema imune aumentado (LERNER et al., 2000). Em outro estudo, observou-se um aumento da

imunoglobina em crianças que receberam nucleotídeos na alimentação (MARTINEZ et al., 1997; LERNER & SHAMIR, 2000).

Nucleotídeos dietéticos aumentam a absorção intestinal de ferro, afetam lipoproteínas e o metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa polinsaturada, têm efeito tóxico na mucosa intestinal, fígado e reduzem a incidência de diarreias (COSGROVE, 1998 e SCHLIMME et al., 2000 apud ROSSI et al., 2007, p. 8). Crianças alimentadas com fórmula comercial de leite suplementado com nucleotídeos apresentaram na flora fecal a predominância de bifidobactérias (TANAKA & MUTAI, 1980 apud ROSSI et al., 2007, p. 8). Por outro lado, testes realizados com crianças alimentadas com fórmula comercial de leite desidratado, sem suplementação de nucleotídeos, mostraram a predominância de enterobactérias (UAUY, 1994 apud ROSSI et al., 2007, p. 8). Os resultados indicam que a suplementação de nucleotídeos pode influenciar positivamente a microflora no trato gastrointestinal, diminuindo o pH gástrico e impedindo a proliferação de espécies de bactérias patogênicas e incidência de diarreias (ROSSI et al., 2007).

Existem diversas fontes de nucleotídeos, entre elas a levedura. O extrato de levedura é rico em nucleotídeos, inositol (importante promotor do crescimento), proteínas, vitaminas e minerais. Segundo XAVIER (2005), produtos de levedura contendo nucleotídeos têm sido utilizados com sucesso em dietas de suínos (MARIBO, 2003 apud RUTZ, 2006, p.350) e camarões (MENDONZA et al., 2001 apud RUTZ, 2006, p. 350).

Em estudo realizado por RUTZ et al. (2006) utilizou o extrato de levedura na dieta para avaliação do desempenho e qualidade de carcaça de frangos de corte. Neste trabalho, um total de 810 frangos Ross, machos, foram avaliados. As dietas experimentais à base de milho, farelo de soja e extrato de levedura foram feitas de 1 a 42 dias de idade. O melhor desempenho produtivo ocorreu para os testes realizados com extrato de levedura. Constatou-se que as características de carcaça não foram influenciadas estatisticamente pelas dietas experimentais. Embora estudos tenham mostrado o efeito positivo dos nucleotídeos no sistema imune, a dieta recomendada não é bem conhecida, mas estima-se que seja necessário uma média de 450 a 700mg por dia/adulto. Entretanto, o máximo de ácido nucleico consumido não deve ultrapassar 4g/dia em toda dieta (RUDOLPH, 1990).

È bem conhecido que a dieta de nucleotídeos aumenta a síntese de proteínas dos tecidos das mamas. Os produtos do catabolismo das pirimidinas incluem o ácido β -aminoisobutírico e a β -alanina que não são tóxicos e são rapidamente catabolisados ou excretados (RUDOLPH et al., 1990). A nutrição inadequada tem sido a maior causa dos casos de morbidez e mortalidade por doenças infecciosas. Os casos em que há maior diminuição da

imunidade celular são detectados em pacientes com câncer ou outras doenças infecciosas (RUDOLPH et al., 1990).

As Tabelas 17 e 18 mostram a distribuição de nucleotídeos em alguns tipos de alimentos. O IMP é predominante em carne de frango, peixe e bovina; por outro lado o AMP é predominante em moluscos e crustáceos e o GMP em cogumelo Shiitake (FRATA, 2006).

Tabela 17. Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem animal.

Alimento	AMP*	GMP*	IMP*
Cane bovina	7,5	---	163
Carne suína	8,6	3,7	186
Carne de frango	13,1	2,2	115
Carne de baleia	2,4	5,3	326
Peixe	8,1	0	287
Sardinha	0,8	0	287
Cavala	6,4	0	286
Atum	5,9	0	286
Enguia	2,1	0	165
Bonito seco	traços	0	630
Lula	184	0	0
Polvo	26	0	0
Lagosta	82	0	0
Carangueijo	11	0	0
Molusco	81	0	0
Escalope	116	0	0

Fonte: (SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.83) (*) mg/100g).

Tabela 18. Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem vegetal.

Alimento	AMP	GMP	IMP
Aspargo	4	traços	0
Cebolinha	1	0	0
Alface	1	traços	traços
Tomate	12	0	0
Ervilha	2	0	0
Pepino	2	0	0
Rabanete japonês	2	0	traços
Cebola	2	0	traços
Broto de bambu	1	0	0
Cogumelo Shiitake	175	103	0
Cogumelo shiitake seco	321	216	0
Cogumelo francês	13	traços	0
Cogumelo francês seco	190	traços	0
Cogumelo enokidake	45	32	0
Cogumelo syoro	16	9	0
Cogumelo hatsutake	58	85	0

Fonte: (SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.84) (*) mg/100g).

2.4.2. Aplicação industrial dos nucleotídeos

A aplicação industrial de nucleotídeos na produção de alimentos em 1996 foi da ordem de 2000 toneladas de IMP, 1000 toneladas de GMP e 22 toneladas de nucleosídeos pela indústria farmacêutica (IGUTI, 1996), superando, em nível mundial, o valor de US\$ 1,1 bilhão apenas para os realçadores de sabor (MEROLLI, 1997 apud RÉVILLION, 2000, p.3). A Tabela 19 representa esses valores.

Dentre os maiores produtores de nucleotídeos e nucleosídeos, no mundo, destacam-se as seguintes companhias japonesas: Ajinomoto Co., Asahi Chemical Industrial, Kyowa Hakko Kogyo Co., Takeda Chemical Industrial Ltd. e Yamasa Shoyu Co. Ltd. (IGUTI, 1996).

Tabela 19. Produção e aplicação de nucleotídeos e nucleosídeos.

Substância	Produção (tonelada/ano)	Aplicações
5'-IMP	2000	Realçador de sabor
5''-GMP	1000	Realçador de sabor
ATP	6	Distrofia muscular
FAD, NAD	pequenas quantidades	Doenças do rim e fígado
Adenina	11	Leucopenia
Adenosina	5	Doenças coronárias
5'-AMP	não estimado	Reumatismo
Camp	não estimado	Diabetes, asma e câncer

Fonte: IGUTI, (1996).

Os nucleotídeos realçadores de sabor destacam-se em ordem decrescente de efetividade: ácido guanílico (5'-GMP), ácido inosínico (5'-IMP) e ácido xantílico (5'-XMP). As substâncias que não apresentam propriedades de enaltecer o sabor dos alimentos são o 5'-AMP, e 2' e 3'-isômeros, assim como 5'-desoxiribonucleotídeos, nucleosídeos e nucleotídeos pirimidínicos (IGUTI, 1996).

O limiar de detecção (*threshold*) do IMP e do GMP são de 0,025 e 0,0125g/100mL, respectivamente. No caso da mistura de 50:50 de GMP e IMP a detecção ocorre com cerca de 0,0063%. Para uma mistura com glutamato monossódico a detecção é para 0,000031%, o que mostra o efeito sinérgico entre esses produtos (FRATA, 2006). Por isso muitas indústrias, especialmente as de extratos de levedura, utilizam o MSG, visando causar maior impacto em seus produtos (OLIVEIRA, 2001).

Os nucleotídeos são solúveis em água nos níveis de aplicação em alimentos. O IMP apresenta menor absorção em água, um ponto importante quando utilizado em produtos

secos, ao passo que o GMP é considerado o mais forte potencializador de sabor. Ambos possuem boa estabilidade térmica e toleram grandes faixas de pH, sem grandes níveis de decomposição (DZIEZAK, 1987).

O 5'-AMP não tem a propriedade potencializadora de sabor, mas é um importante precursor do inosinato devido a sua conversão a 5'-IMP pela ação da enzima *deaminase adenílica*, como mostra a Figura 10 (IGUTI, 1996).

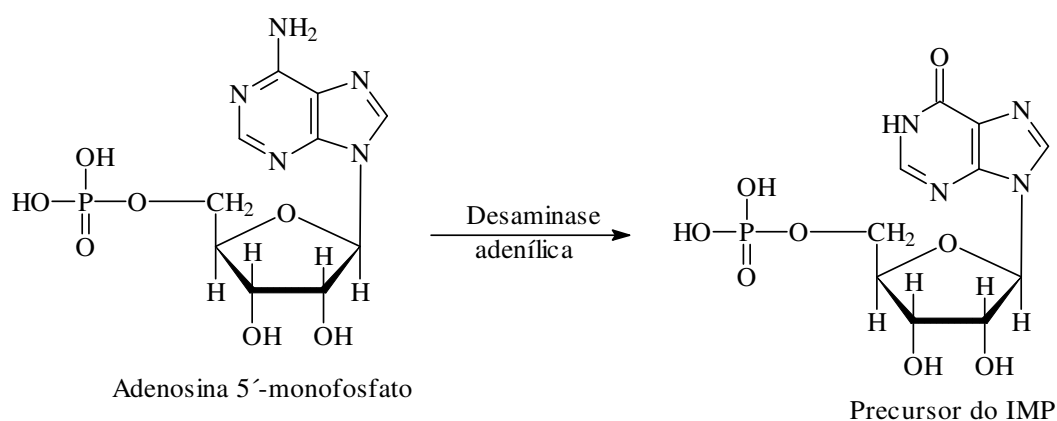


Figura 10. Deaminação enzimática do AMP a IMP.

A Tabela 20 mostra alguns alimentos processados, aos quais são incorporados realçadores de sabor, na proporção de 50% da mistura GMP/IMP com 50% de MSG.

Tabela 20. Níveis de aplicação de nucleotídeos em alguns alimentos.

Alimento	MSG* (%)	5'-nucleotídeos 1:1 (IMP e GMP)
Sopa enlatada	0,12-0,18	0,002-0,003
Aspargo enlatado	0,08-0,16	0,003-0,004
Carangueijo enlatado	0,07-0,10	0,001-0,002
Peixe enlatado	0,10-0,30	0,003-0,006
Carne de aves, presunto enlatado	0,10-0,20	0,006-0,010
Catchup	0,15-0,30	0,010-0,020
Maionese	0,40-0,60	0,012-0,018
Salsicha	0,30-0,50	0,002-0,014
Petiscos	0,10-0,50	0,003-0,007
Molho de soja	0,30-0,60	0,030-0,050
Suco de vegetais	0,10-0,15	0,005-0,010
Queijo processado	0,40-0,50	0,005-0,010
Sopa desidratada	5,00-8,00	0,100-0,020

Fonte: (SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.87).

2.4.3. Métodos de produção de nucleotídeos

2.4.3.1. Hidrólise química do RNA

No processo de hidrólise química do RNA em condições alcalinas, não há produção direta de 5'-ribonucleotídeos, uma vez que estes são degradados a compostos de menor peso molecular. Industrialmente utiliza-se aquecimento do autolisado a 130°C por cerca de 4 horas com hidróxido de cálcio e, posteriormente, a deaminação da adenosina a inosina e, por último, a fosforilação química desses nucleosídeos a 5'-IMP e 5'-GMP (IGUTI, 1996; REIHOLD, 2005).

Em meio ácido, é bem fundamentado que cerca de 80% do RNA não é decomposto durante a autólise e encontra-se complexado com as proteínas; entretanto, as proteínas são hidrolisadas a aminoácidos e oligopeptídeos. Alto grau de hidrólise do RNA pode ocorrer em pH 6,0 a 6,6 em temperatura entre 30 e 60°C com cerca de 15% de NaCl por 10 a 30 horas, utilizando, após o processo, aquecimento a 90°C por duas horas para complementação da extração do RNA remanescente na biomassa (TANEKAWA et al., 1981).

Segundo este mesmo autor, em pH acima de 6,6 ocorre a diminuição significativa da taxa de matéria sólida e o processo torna-se economicamente inviável. Quando o pH da autólise está abaixo de 6,0 (5,5 a 5,8), embora a taxa de matéria sólida do extrato seja elevada, na ordem de 60%, o nível de GMP é baixo, cerca de 0,2%. Por outro lado, em pH entre 6,0 a 6,6 o fenômeno mais observado é a diminuição da quantidade de extrato obtida, todavia, com aumento da concentração média de GMP. A hidrólise do RNA usualmente ocorre em pH acima de 7,0 em temperatura variando entre 50 e 60°C por 2 a 20 horas.

Como a concentração de nucleotídeos obtida por processo de autólise é ainda baixa, uma alternativa é a utilização de duas enzimas comerciais, a 5'-fosfodiesterase de *Penicillium citrinum* para clivagem do RNA polimerizado em pH neutro a 60°C, e a deaminase adenílica, obtida de *Aspergillus oryzae* para conversão do AMP a IMP.

2.4.3.2. Hidrólise enzimática do RNA

A produção industrial de 5'-ribonucleotídeos, por via enzimática, foi iniciada no Japão em 1961, sendo que na década de 70 cerca de 50% da produção utilizava esta técnica. O processo consiste em cinco etapas: a) produção da biomassa de leveduras contendo

alto teor de RNA; b) extração do material intracelular; c) produção de enzimas usadas na hidrólise do RNA; d) hidrólise enzimática do RNA; e) isolamento e purificação do 5'-GMP e 5'-IMP (NAKAO, 1979; IGUTI, 1996).

Na obtenção de nucleotídeos de levedura as espécies mais utilizadas são a *Candida utilis* e *Sacharomyces cerevisiae*, sendo que a biomassa é produzida por processo contínuo numa concentração média de 35g/L com um teor de RNA entre 10 e 15%. O RNA é extraído e precipitado com HCl ou etanol e usado diretamente para hidrólise enzimática (IGUTI, 1996).

Diferentes reações enzimáticas podem ser utilizadas para produção de nucleotídeos. Microrganismos como *Penicillium citrinum* e *Streptomyces* são bons produtores de enzimas e podem ser utilizados com segurança, pois evitam a produção de substâncias indesejáveis (FUGIMOTO et al., 1974, KELER & MERTEN, 1985, BELEM et al., 1997). Uma destas enzimas utilizada na hidrólise é a nuclease P₁, de *Penicillium citrinum*, que pode ser produzida utilizando-se o resíduo líquido do processamento do suco de laranja (TAVARES et al., 1998).

Um dos processos que faz uso da nuclease P₁ utiliza uma solução de RNA 2% e hidrólise a 65°C, por 4 horas, em pH 5,0. Nesta reação são produzidas as moléculas de 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMP e 5'-AMP que é deaminada por adenil deaminase de *Aspergillus oryzae* a 5'-IMP (ENEI et al., 1985).

Em outras preparações utilizou-se a hidrólise enzimática do autolisado de levedura (14 horas) para preparação de extrato rico em 5'-GMP. O tempo de tratamento com 16 unidades de 5'-fosfodiesterase/mL de extrato com 5% de sólidos foi de 30 minutos a 65°C ou 7 minutos a 70°C. A concentração de GMP foi de 0,93%, em base seca de extrato (SOMBUTYANUCHIT et al., 2001).

Outras pesquisas mostraram que é possível, durante o processo de autólise de leveduras, intensificar a produção de nucleotídeos mediante a ativação da ribonuclease endógena, que pode ser por mudanças na localização celular da ribonuclease, por mudanças conformacionais da enzima ou pela destruição de seus inibidores. Os inibidores podem ser destruídos por choque térmico sub-ótimo, em combinações com ânions carboxílicos, tais como formiato e acetato que aceleram a permeabilidade da parede celular em condições específicas de temperatura e pH (PACHECO, 1996).

Um dos estudos visando a investigação das propriedades da ribonuclease endógena foi proposto por MAUL et al. (apud CORREA, 1992, p.26). Nesta pesquisa

desenvolveu-se um método para redução do teor de RNA em *Candida utilis* mediante o tratamento térmico em diferentes etapas:

- a) choque térmico por alguns segundos a 70°C;
- b) incubação da suspensão entre 45 e 50°C por duas horas;
- c) incubação entre 55 e 60°C por 1 hora.

O processo consiste na degradação autolítica dos ácidos nucleicos e na sua liberação na forma de nucleotídeos. A função do choque térmico à temperatura de 70°C é a denaturação dos ribossomos e ativação da ribonuclease. Nesta etapa a temperatura ótima foi de 68°C. A segunda etapa, que tem por objetivo dar prosseguimento à ação das enzimas já ativadas, apresentou temperatura ótima de 45°C por 2 horas. A última etapa é necessária para liberação do interior da célula, os produtos da degradação autolítica. A temperatura ótima foi de 55°C por 1 hora. O RNA foi reduzido de 7,0 para 1,5%.

LINDBLOM (1977) utilizou a levedura *Sacharomyces cerevisiae* visando a hidrólise do RNA. A incubação da suspensão autolisada com 15% de NaCl foi realizada à temperatura de 65°C por 20 minutos. A atividade enzimática ótima situou-se em pH entre 5 e 6, houve degradação da proteína e redução do teor de RNA a 1,4%. Outras conclusões relevantes citadas pelo autor é que as propriedades da enzima RNase diferem entre as diferentes espécies de leveduras e que a utilização de cloreto de sódio, como agente promotor de plasmólise, não afeta a atividade da RNase em suspensão de células desintegradas.

Em trabalho similar desenvolvido por BUENO et al. (1985) aplicou-se o choque térmico numa suspensão autolisada com NaCl para ativação da RNase endógena de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Kluyveromyces fragilis*, utilizou-se uma concentração de 7% de biomassa, temperatura de 68°C por 5 a 15 segundos e incubação a 52°C por diferentes intervalos de tempo. A recuperação de biomassa variou de 70 a 85%, não sendo significativa a deterioração protéica ou alteração do perfil aminoacídico.

Os percentuais de redução de RNA da biomassa para as diferentes espécies de levedura estão citados na Tabela 21.

Tabela 21. Porcentagem de redução de RNA por ativação da ribonuclease endógena em presença de NaCl em *C. Utilis*, *S. Cerevisiae* e *K. Fragilis*.

Redução/perda (%)	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. fragilis</i>
Rerdução de RNA	69,0	69,33	80,13
Perda de proteína	0,0	11,6	0,0
Recuperação de biomassa	73,6	6,2	74,6

Fonte: BUENO et al. (1985).

TANEKAWA et al. (1981), visando a produção de extrato de levedura rico em 5'-ribonucleotídeos, utilizaram para hidrólise enzimática do RNA uma suspensão de levedura autolisada. O método compreendeu as seguintes etapas:

- a) extração do RNA intracelular da biomassa contendo 15% de NaCl em pH entre 6,0 a 6,6, preferencialmente entre 6,2 e 6,4 e temperatura entre 45 e 65°C por 10 a 30 horas;
- b) aquecimento da suspensão autolisada a temperatura de 90 a 100°C por 1 hora para extração do RNA remanescente;
- c) hidrólise do RNA e conversão do AMP a IMP;
- d) separação do resíduo insolúvel.

O controle do pH mencionado foi feito com adição de álcali à suspensão. Nestas condições ocorreu a hidrólise das proteínas e o RNA hidrolisado enzimaticamente. O método foi eficiente, entretanto, economicamente inviável devido ao custo de produção da enzima.

LEE (1997) produziu com sucesso quantidades significativas de GMP e IMP, utilizando hidrólise enzimática em autolisado de *Kluyveromyces marxianus*. Após 20 horas de fermentação em meio contendo 5% de soro de leite desidratado a 30°C, pH 4,5, as células de levedura foram lavadas e diluídas com 0,1M de KH_2PO_4 , e autolisadas em pH, 6,5 a 7,5, em temperaturas de 45, 50 e 55°C. Ao autolisado adicionou-se 0,2% p/v de fosfodiesterase em pH 6,5 por 6 horas e adenil-deaminase 0,5% (p/v) a 60°C em pH 5,5 por 4 horas. Após tratamento a 100°C por 15 minutos, os nucleotídeos foram analisados por HPLC e verificou-se que a produção máxima de nucleotídeos ocorreu a 50°C em pH 6,5. A taxa de 5'-AMP foi de 800µg/g de biomassa e 2000 µg/g de 5'-GMP, havendo um aumento considerável de IMP após a adição de adenil deaminase.

2.4.3.3. Fermentação direta

Na fermentação direta, utilizam-se mutantes com bloqueio na biossíntese de nucleotídeos, em que a regulação pelo produto final é eliminada. Por esta técnica os processos mais utilizados industrialmente são: a) obtenção de nucleosídeos por fermentação e posterior fosforilação química e b) obtenção direta de 5'-nucleotídeos por fermentação (NAKAO, 1979).

A membrana celular não é permeável aos nucleotídeos, mas é permeável aos nucleosídeos, por não conterem o grupo fosfato. Por exemplo, o 5'-IMP sintetizado não pode

ser excretado pela célula, entretanto, após a desfosforilação, é então excretado e acumulado no meio fermentativo como inosina.

Entre as linhagens de microrganismos consideradas boas produtoras de inosina citam-se *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* e *Saccharomyces cerevisiae*. Um exemplo típico é o *Corynebacterium petrophilum* que é capaz de acumular cerca de 1,6g/L de inosina num meio contendo n-alcanos. Além destes, outras linhagens como *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes* e *Mycobacterium* podem ser utilizadas comercialmente com segurança (IGUTI, 1996).

No caso do *Bacillus*, uma fonte adequada de carbono é o amido hidrolisado, podendo ser utilizada também a glicose. O pH pode ser regulado com amônia, pois serve simultaneamente como fonte de nitrogênio. A faixa ótima de pH é de 6,0 a 6,2 e temperatura de 30 a 34°C. Para fermentação com *Bacillus ammoniagenes*, é importante a suplementação com cerca de 2% de fosfato e 1% de sulfato de magnésio (IGUTI, 1996).

A Figura 11 mostra a conversão de IMP a AMP e IMP a GMP (NAKAO, 1979).

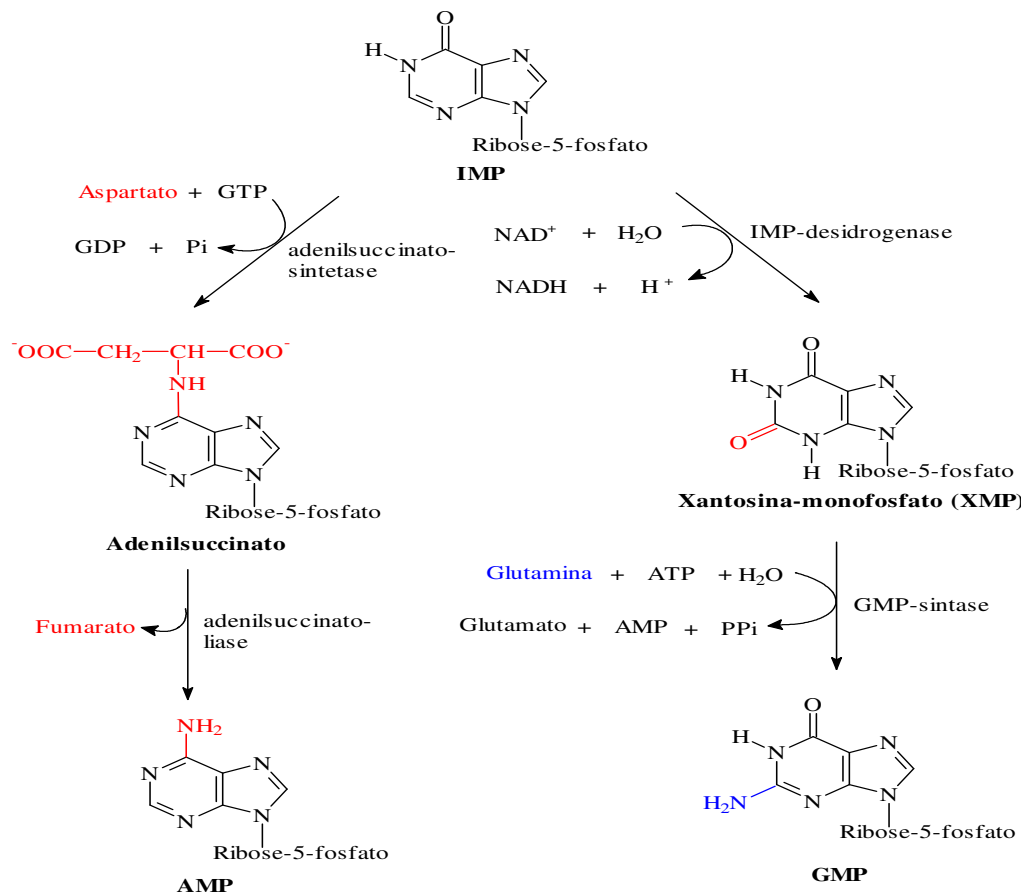


Figura 11. Conversões bioquímicas do IMP a AMP e GMP.

No controle da via sintética dos processos de fermentação, utiliza-se mutantes com bloqueio na biosíntese de nucleotídeos, em que a regulação pelo produto final é eliminada. Neste tipo de mecanismo os processos mais utilizados industrialmente são a obtenção de nucleosídeos com posterior fosforilação química e obtenção direta de ribonucleotídeos por fermentação (NAKAO, 1979).

Estudos realizados por SGARBIERI et al. (1999), RÉVILLION et al. (2000), OLIVEIRA (2001) e OLIVEIRA (2002) mostram que a utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de processos fermentativos representam uma importante e viável fonte para obtenção destas moléculas e outros derivados.

2.4.3.4. Estabilidade físico química dos nucleotídeos

Em pesquisa realizada por MATOBA et al. (1988), os autores investigaram o mecanismo cinético de degradação térmica do 5'-GMP e 5'-IMP em solução aquosa em função da temperatura e do pH e chegaram as seguintes conclusões: termicamente o GMP e o IMP são menos estáveis que o MSG, devido às ligações éster-glicosídicas nestes produtos. Quando estes produtos são utilizados em alimentos cozidos, nucleotídeos podem ser degradados pelo tratamento em altas temperaturas.

Os autores constataram que, durante o aquecimento de 0 a 200 horas em pH 4,0 a 100°C, houve uma diminuição na concentração de IMP após 30 horas e o aumento da concentração de hipoxantina após 150 horas.

No caso do GMP, verificou-se uma mudança de concentração durante o aquecimento, que foi similar ao IMP. Os resultados sugerem que os 5'-ribonucleotídeos são, primeiro, degradados a nucleosídeos e, posteriormente, em suas respectivas bases. Entretanto, a concentração destes nucleotídeos é cerca de 95% da concentração inicial em 100 horas, sugerindo que a partir deste tempo é que iniciam as clivagens mencionadas.

Segundo LEE (1979), a decomposição máxima de IMP é observada em pH 5,87. Entretanto, em trabalho publicado por MATOBA et al. (1988), a reação de decomposição do IMP e GMP aumenta com a diminuição do pH, o que também concorda com os trabalhos reportados por SHAOUL & SPORNS (1987). Segundo KURYAMA et al. (apud MATOBA et al., 1988, p.1158). mostraram que o GMP é mais susceptível à destruição em pH 5 a 7, enquanto o IMP é mais susceptível em pH 3,0.

A Tabela 22 ilustra o tempo de meia vida dos nucleotídeos GMP e IMP à temperatura de 100°C.

Tabela 22. Tempo de meia vida de nucleotídeos GMP e IMP em diferentes condições de pH a 100°C.

Nucleotídeo	pH 4,0	pH 7,0	pH 9,0
GMP	8,7 hs	13,1 hs	46,2 hs
IMP	6,4 hs	8,2 hs	38,5 hs

Fonte: MATOBA et al. (1988).

O possível mecanismo de degradação dos nucleotídeos GMP e IMP é mostrado na Figura 12, segundo MATOBA et al. (1988).

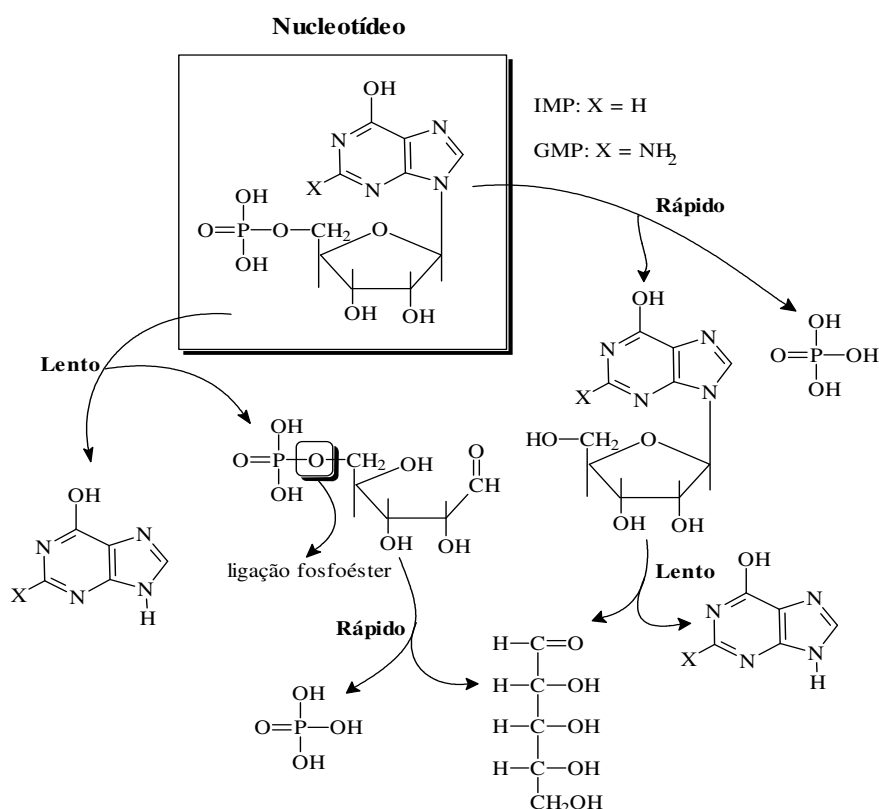


Figura 12. Degradação térmica de nucleotídeos.

2.4.3.5. Segurança alimentar

Em relação à segurança alimentar, o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão do *Food and Agricultural Organization of the United Nations and the World Health Organization* (FAO/WHO, 1989), determina a “ingestão diária aceitável (IDA) não especificada” para o GMP e IMP na forma de sal de cálcio ou dissódico. Isso mostra que uma limitação numérica não se faz necessária. Segundo SUGITA (apud FRATA, 2006, p.87) esses aditivos são listados como GRAS e permitidos para uso em alimentos para consumo humano.

Estudos indicam que o consumo de 5'-nucleotídeos não representa riscos à saúde humana (IGUTI, 1996), ao contrário, é de extrema importância para melhorar a defesa imunológica do organismo (KULKARNI et al., 1986; RUDHOLPH et al., 1990; BUREN et al., 1994; YAMAUCHI et al., 2002), além de eles serem importantes fatores para o crescimento de aves de corte (XAVIER et al., 2005; RUTZ et al., 2006) e também como enaltecadores de sabor (RÉVILLION et al., 2000).

Outro estudo realizado por SUGITA et al. (apud FRATA, 2006, p.88) sobre a toxicidade aguda dos 5'-nucleotídeos, é mostrado na Tabela 23.

Tabela 23. Toxicidade aguda de 5'-nucleotídeos observada em camundongos e ratos.

Espécie	Via	Composto	DL ₅₀ (g/kg de peso corporal)	
			macho	fêmea
Camundongos	oral	IMP	>14,4	>14,4
		GMP	>14,4	>14,4
	subcutânea	IMP	5,48	5,63
		GMP	5,05	5,05
	intrapertoneal	IMP	6,30	6,02
		GMP	6,80	5,01
	intravenosa	IMP	3,95	4,60
		GMP	3,58	3,95
Ratos	oral	IMP	>10,0	>10,0
		GMP	>10,0	>10,0
	subcutânea	IMP	3,90	4,34
		GMP	3,55	3,40
	intraperitoneal	IMP	5,40	4,85
		GMP	4,75	3,88
	intracutânea	IMP	2,73	2,87
		GMP	2,72	2,85

Fonte: (SUGITA et al., 2002 apud FRATA, 2006, p.88).

No caso de extratos de levedura, não há evidências em animais ou humanos que indiquem reações similares aquelas causadas por glutamato monossódico, como problemas de pele, dores de cabeça e náuseas, embora o FDA não considere esses efeitos suficientemente conclusivos para alteração na classificação deste ingrediente (IGUTI, 1996).

O extrato de levedura contendo GMP e IMP é definido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos como saborizante natural, sendo proposto recentemente pela FDA (*Food and Drug Administration*) que apareça no rótulo a frase “contém glutamato” (BOZE et al., 1992).

O glutamato, considerado como substância GRAS pela FDA, tem a propriedade sinérgica de, juntamente com os sais sódicos de 5'-IMP e 5'-GMP, enaltecer o sabor dos alimentos. A aplicação de 0,02 a 0,50% de 5'-ribonucleotídeos em sopas e molhos é suficiente para aumentar o sabor desses produtos, além de contribuir para a redução do sabor metálico de latas (IGUTI, 1996).

2.4.4. Extração e recuperação de RNA

2.4.4.1. Razões da extração dos ácidos nucléicos de levedura

As principais razões para extração de ácidos nucléicos de levedura na produção do extrato autolisado, objeto de estudo neste trabalho, foram as seguintes:

- a) Otimizar o processo de autólise visando a produção do extrato e melhora da digestibilidade da biomassa da levedura com simultânea redução do teor de RNA;
- b) Possibilitar a ampliação do espectro de utilização de levedura e seus derivados, enquanto biomassa protéica isenta de RNA;
- c) Utilizar a levedura como fonte microbiana de RNA para produção de enaltecadores de sabor e nucleosídeos de interesse médico.

2.4.4.2. Extração do RNA de leveduras

Nas décadas de 70 e 80, foi realizado um grande número de pesquisas utilizando álcalis e ruptura mecânica de células para produção de concentrados e isolados protéicos com reduzidas concentrações de ácidos nucleicos da biomassa de leveduras. Tais métodos mostraram-se eficientes na ruptura celular e na redução de RNA; entretanto, provocam perda de cerca de 30% de proteínas, destruição de aminoácidos, tornando a lisina indisponível, pela formação a lisinoalanina, prejudicial à saúde (KINSELLA, 1987).

Nos ácidos nucléicos, os nucleotídeos são ligados covalentemente por meio de “pontes” de grupos fosfato, em que o grupo 5'-hidroxila de uma unidade nucleotídica une-se ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo seguinte por uma ligação fosfodiéster. Desta forma, os esqueletos covalentes dos ácidos nucléicos consistem de resíduos de fosfato e pentose alternantes, e as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais unidos ao esqueleto a intervalos regulares (NELSON & COX, 2000).

Os grupos fosfato dos nucleotídeos estão completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7, e as cargas negativas estão geralmente neutralizadas por interações iônicas com as cargas positivas nas proteínas, íons metálicos e poliaminas (NELSON & COX, 2000).

Os esqueletos covalentes do DNA e do RNA estão sujeitos à hidrólise lenta, não enzimática, da ligação fosfodiéster. Entretanto, o RNA em condições alcalinas é rapidamente hidrolisado, o que não ocorre com o DNA; os grupos 2'-hidroxila no RNA (ausentes no DNA) estão diretamente envolvidos no processo. Os 2',3'-monofosfatos cíclicos são os primeiros produtos da ação alcalina no RNA e são hidrolisados rapidamente, produzindo, em seguida, uma mistura de nucleosídeos 2' e 3'-monofosfatos, bases nitrogenadas e fosfato. A Figura 13, ilustra o processo de hidrólise do RNA a 2' e 3'-monofosfatos (NELSON & COX, 2000).

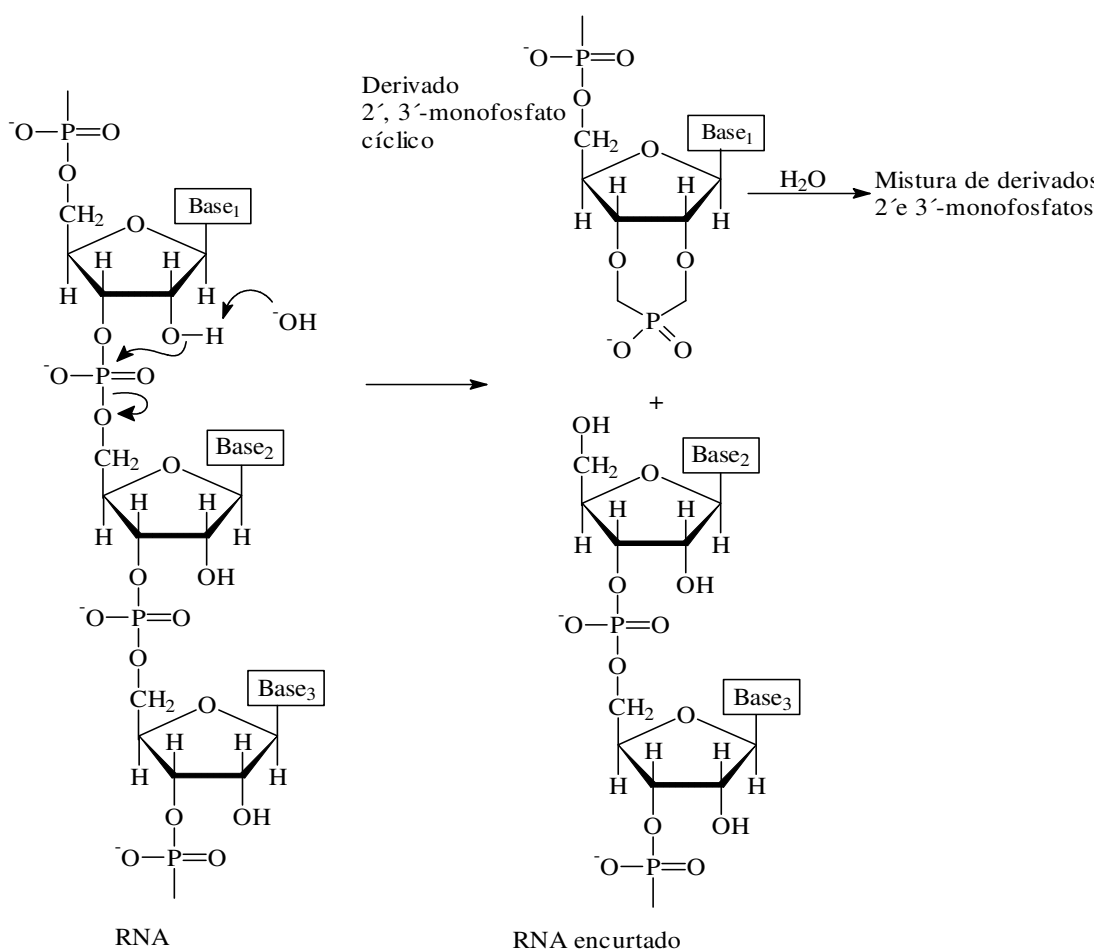


Figura 13. Hidrólise alcalina do RNA a 2' e 3'-monofosfato.

Dentre os processos químicos alcalinos desenvolvidos para obtenção de extratos e concentrados protéicos com baixo teor de RNA, destaca-se a utilização de hidróxido de sódio, potássio e amônio, associados à utilização de soluções salinas e o tratamento térmico.

Segundo CHEFFEL, 1977, FRIEDMAN, 1977, De GROOT et al., 1977 (apud SHETTY & KINSELLA, 1979, p.633) e SGARBIERI et al., 1999, de forma geral, o tratamento alcalino pode-se tornar impróprio por causar hidrólise das proteínas, despolimerização, racemização, reação de β -eliminação, *cross-linking* e denaturação

HEDENSKOG & EBINGHAUS (1972), pesquisando a produção de concentrado protéico de levedura desintegrada em moinho de bolas, utilizaram KOH 0,3M (pH 12,0), NaCl 5%, temperatura de 80°C e precipitação isoelétrica da proteína com HClO₄; reduziram de 14% para 2,0% o teor de RNA. Observaram também considerável degradação de proteínas e destruição de cerca de 80% da lisina.

LINDBLOM (1974), pesquisando a extração de proteínas e RNA da fração solúvel de células desintegradas de levedura de cerveja em pH 11,5 a 25°C por 30 minutos, constatou a solubilização adicional de 31% de nitrogênio, degradação e diminuição drástica da solubilidade protéica após a adição de álcali. A quantidade de RNA na fração solúvel foi significativamente reduzida na presença de álcali e NaCl, indicando ausência de nucleotídeos quando analisados por cromatografia, devido a hidrólise alcalina à compostos de menores pesos moleculares.

CUNNINGHAM et al. (1975) obtiveram, com *C. tropicalis* cultivada em hidrocarbonetos (n-parafinas), uma liberação de 90% do nitrogênio celular através da extração alcalina, com um rendimento de 62 a 72% de proteína. A fração de RNA não foi mencionada neste trabalho.

A succinilação por meio da modificação dos grupos amino livres com anidrido succínico em pH 9 foi realizada por SHETTY & KINSELLA (1979). Recuperou-se cerca de 85% de proteína e reduziu-se o teor de RNA a 2%. O processo apresenta custo elevado, melhora as propriedades funcionais e diminui a atividade proteásica; entretanto, há diminuição da biodisponibilidade da lisina e a associação do grupo succinil à proteína causa prejuízos à saúde.

Tratamento de nucleoproteínas de levedura com sulfito de sódio (sulfitolise), objetivando a extração de ácidos nucleicos pela desestabilização do complexo nucleoprotéico, foi realizado por DAMODARAM (1986). A precipitação protéica em pH=4,2 resultou num produto de baixo teor de ácidos nucléicos; entretanto, o produto apresentou resíduos de sulfito e modificações química da proteína obtida após precipitação.

ALVAREZ & ENRIQUEZ (1988), trabalhando com com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*, utilizaram NH_4OH a 4,5%, a uma temperatura de 65°C por 30 minutos. Obtiveram uma redução de 14 para 2% de RNA, tendo a segunda apresentado maiores perdas de proteína e biomassa.

BEHALOVÁ (1991), comparando vários métodos para preparação de extratos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* com baixo teor de RNA, avaliou seis diferentes métodos:

- a) Autólise a 50-52°C por 5 horas;
- b) Extração de RNA com NaOH 0,25N por 1 hora à temperatura ambiente;
- c) Extração de RNA com NH_4OH 0,4N por 1 hora;
- d) Extração de RNA utilizando NaCl 1M a 120°C em autoclave a 0,2 mPa;
- e) Extração de RNA em pH 7,5 a 92°C por 1 hora.

Em ambos os casos não se verificou a diminuição nos teores de proteína e carboidratos na biomassa após a realização dos processos. Entre os resultados obtidos, apresentaram maior eficiência na extração de RNA:

a) *Saccharomyces cerevisiae*

Método	Redução de RNA (%)
a) NaCl 1M a 120°C	77,9
b) NaOH 0,25M a 20°C	75,3

b) *Candida utilis*

Método	Redução de RNA (%)
a) pH 7,5 a 92°C	64,8
b) NH_4OH 0,4M a 40°C	72,4

Modificações químicas da proteína têm sido aplicadas como técnicas para estudo de estrutura, conformação e também com a finalidade de melhorar as propriedades funcionais (GIEC et al., 1989; MATHEIS, 1991). O processo envolve reações químicas das proteínas com reagentes que promovem reações nucleofílicas com grupos funcionais das cadeias laterais das proteínas ricas em elétrons (PACHECO, 1996).

Os ácidos nucléicos interagem com as proteínas por meio de ligações não covalentes, por interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio, formando complexos nucleoprotéicos. As ligações iônicas ocorrem entre os grupos aniônicos dos grupos fosfato

dos ácidos nucleicos com os grupos catiônicos dos aminoácidos básicos das proteínas (KINSELLA, 1987). A literatura aponta que cerca de 60 a 70% do RNA poderá estar complexado com a proteína após a extração por autólise (BÉHALOVÁ et al., 1991).

Estudos sugeram que na estrutura tridimensional do complexo RNA-proteína, o RNA forma um núcleo densamente rodeado por proteínas ribossômicas. A natureza hidrofóbica destas proteínas cria um grande potencial entre elas, com uma região apolar no centro. É possível a desestabilização e descomplexação das nucleoproteínas por meio da fosforilação protéica utilizando-se, por exemplo, derivados de ácido fosfórico (PACHECO, 1996).

Alguns métodos utilizando modificação química com o uso de succinilação, acetilação e fosforilação foram propostos (KINSELLA & SHETTY, 1978; VANANUVAT & KINSELLA, 1978; SHETTY & KINSELLA, 1982; GUZMAN JUAREZ, 1983; HUANG & KINSELLA, 1987). Normalmente, reagentes utilizados nestes tipos de reações permanecem ligados à proteína e causam a redução da biodisponibilidade de aminoácidos, podem diminuir a digestibilidade da proteína modificada e, ainda, necessitam atender as especificações regulamentadas para que possam ser consumidas. Portanto considera-se como ideal o uso de produtos de fácil remoção dos grupos acoplantes (SHETTY & KINSELLA, 1982 apud PACHECO, 1996, p.30).

CHEN et al., (1986) testou o método da fosforilação química da proteína utilizando-se o fosfato de sódio visando a desestabilização do complexo nucleoprotéico. A proteína foi precipitada no ponto isoelétrico em pH 4,2 e o teor de RNA foi reduzido de 22% para 5%. Em outra pesquisa realizada por GIEC et al. (1989), a fosforilação química da proteína foi conduzida em pH 9,0 a 12,5 e temperatura de 25 a 45°C, o grau de fosforilação foi de 50% com redução de 40% do RNA. O produto apresentou boas propriedades funcionais e pequena diminuição da digestibilidade enzimática “in vitro” .

O fosfato de sódio é amplamente utilizado na indústria alimentícia e é um aditivo alimentar aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). O processo químico é realizado em pH alcalino e temperatura controlada (LIM & SEIB, 1993). Estudos realizados por YAMADA (2003) mostram que, após a fosforilação da proteína, a co-precipitação de fosfato, lipídeos e RNA aumenta com a precipitação da proteína, que teve seu ponto isoelétrico deslocado de cerca de 4,5 para 3,5.

O mecanismo da reação de fosforilação química da proteína é representado na Figura 14, conforme SUNG et al. (1983).

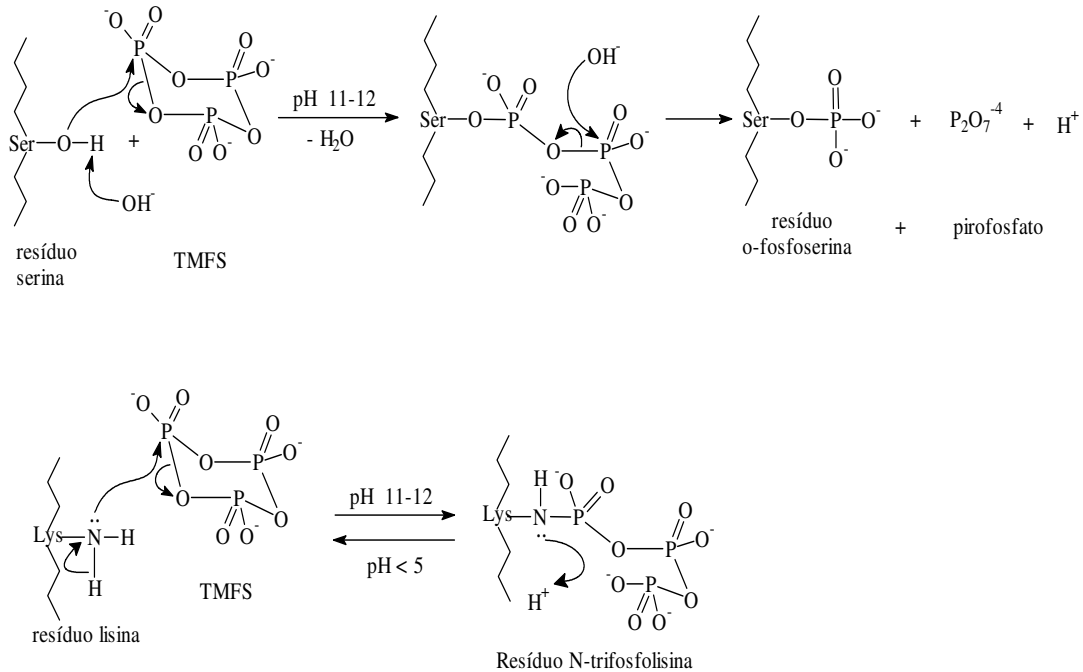


Figura 14. Mecanismo de fosforilação da proteína.

Embora não seja o método mais recomendado, outro procedimento para fosforilação de proteínas de levedura utiliza o oxiclreto de fósforo (POCl_3). Estudos utilizando ressonância magnética mostram que a fosforilação de cerca de 30% do resíduo de lisina resulta na remoção de mais de 85% do conteúdo de RNA da proteína precipitada em pH 2,0 (HUANG & KINSELLA, 1986).

IZZO et al. (1992) utilizaram NH_4OH em experimento para produção de autolisado de levedura de cerveja seco em *spray drier* e constataram reações de escurecimento com a formação de forte coloração marron devido à formação de 24 compostos de alquilparazina. Neste trabalho, o autor não informa a toxicidade destes produtos.

CORREA (1992), aplicando a técnica proposta por ANDREU et al. (1987), reduziu-se consideravelmente o teor de RNA em biomassa de *Candida utilis* produzida a nível de laboratório, utilizando hidróxido de amônio.

2.4.4.3. Recuperação do RNA da biomassa

A escolha do processo de recuperação do RNA depende da escala a que se deseja obter o produto. A nível de laboratório, comumente, utiliza-se a técnica do fenol-clorofórmio, inviável para aplicação industrial. A mistura extratora é composta por 50% fenol, 49% clorofórmio e 1% de álcool isoamílico, tamponado com Tris-HCl, pH 8,5 e permite a obtenção de RNA de elevada pureza, isento de proteínas e DNA (OLIVEIRA, 2001).

ANDREU et al. (1987) sugerem para escala piloto, a utilização de ácido ou etanol. A precipitação fracionada é feita por meio do ajuste de diferentes valores de pH no ponto isoelétrico. Ajusta-se ao pI de precipitação protéica e no sobrenadante remanescente ajusta-se a pH 2,0 com HCl ou faz-se a adição de etanol 95% (2:1). O uso de ácido clorídrico 1N tem sido relatado na literatura como sendo mais econômico, mas, requer um controle mais rígido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matéria-prima

Levedura *Sacharomyces cerevisiae* na forma de células frescas em suspensão aquosa, procedente da indústria cervejeira.

3.1.2. Reagentes

Ácido ribonucléico de levedura (Sigma), GMP (Sigma), IMP (Sigma), Orcinol (Sigma), NaOH (Merck), NH₄OH (Merck), NaCl (Merck), FeCl₃.6H₂O (Merck), H₃PO₄ (Merck), vermelho de eritrosina (Merck), HCl (Labsynth).

3.1.3. Equipamentos

HPLC (Waters 27475 – multi λ fluorescence detector), espectrofotômetro UV visível (Fento), centrífuga refrigerada (Hitachi), microscópio ótico (Olympus), câmara de Neubauer (Laboroptik), agitador mecânico (Fisatom), medidor de pH (Tecnal), banho termostaticado (Tecnal), tela sintética de nylon abertura 15, 20, 45 e 130 micras (Sefar Tenyl), sistema de filtragem a vácuo (Tecnal), Rotoevaporador (Tecnal), balança analítica (Gehaka), estufa de secagem (Tecnal), vidrarias comuns de laboratório (diversos).

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Viabilidade celular

Método colorimétrico com vermelho de eritrosina segundo BONNEU et al. (1991) e leitura na câmara de Neubauer em microscópio óptico.

3.2.2. Umidade e sólidos totais

Os sólidos totais foram determinados pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade após secagem até peso constante a 105°C, conforme norma da AOAC (2000).

3.2.3. Nitrogênio total (proteína bruta)

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal (semi-micro), segundo a AOAC (2000), cujo princípio baseia-se na digestão ácida da amostra, formação de amônia, destilação em meio básico e titulação com solução-padrão de ácido clorídrico.

3.2.4. Cinzas

O teor de cinza foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2000), com base no resíduo obtido por calcinação da matéria orgânica a 500-550°C.

3.2.5. Fibra alimentar

O teor de fibra foi determinado pelo método do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.2.6. Lipídios

O teor de lipídios foi determinado pelo método do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.2.7. Ácido ribonucléico

A extração do RNA da biomassa íntegra de levedura foi realizada segundo a técnica de BALDINI et al. (1999), conforme mostra o fluxograma descrito no item 3.2.7.1 (Figura 16). Para quantificação do RNA utilizou-se a técnica de HERBERT et al. (1971), segundo a técnica as pentoses são convertidas a furfural durante tratamento com ácido a quente e convertidas a hidroximetil-furfural. Na reação catalisada por sais de ferro, as pentoses (ribose), após aquecimento e reação com orcinol, produzem coloração esverdeada, que é lida a 670 nm, conforme reação descrita na Figura 15.

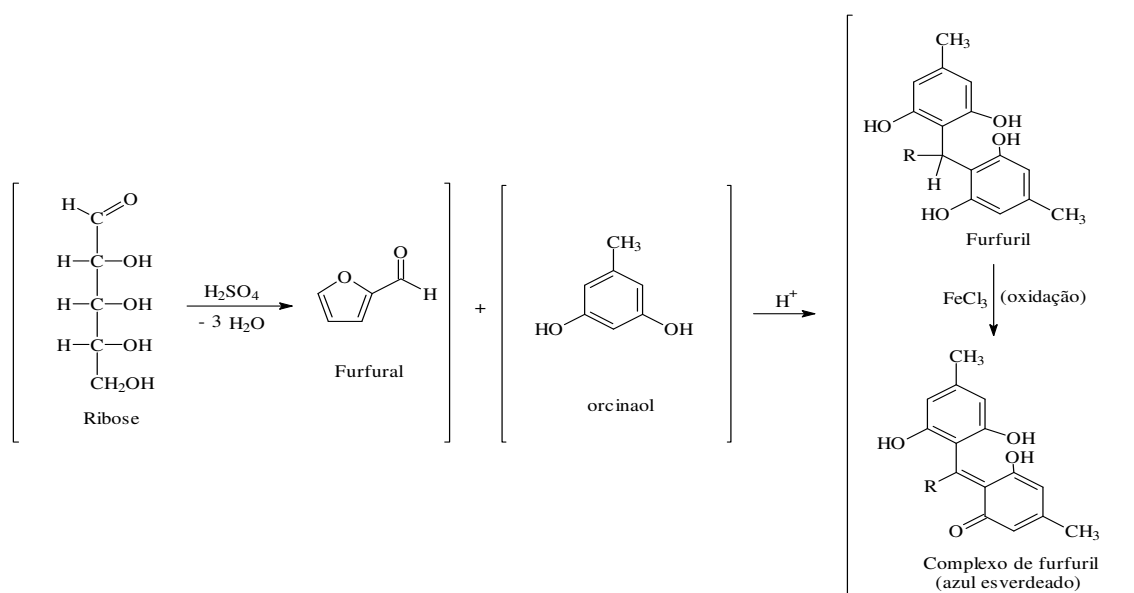
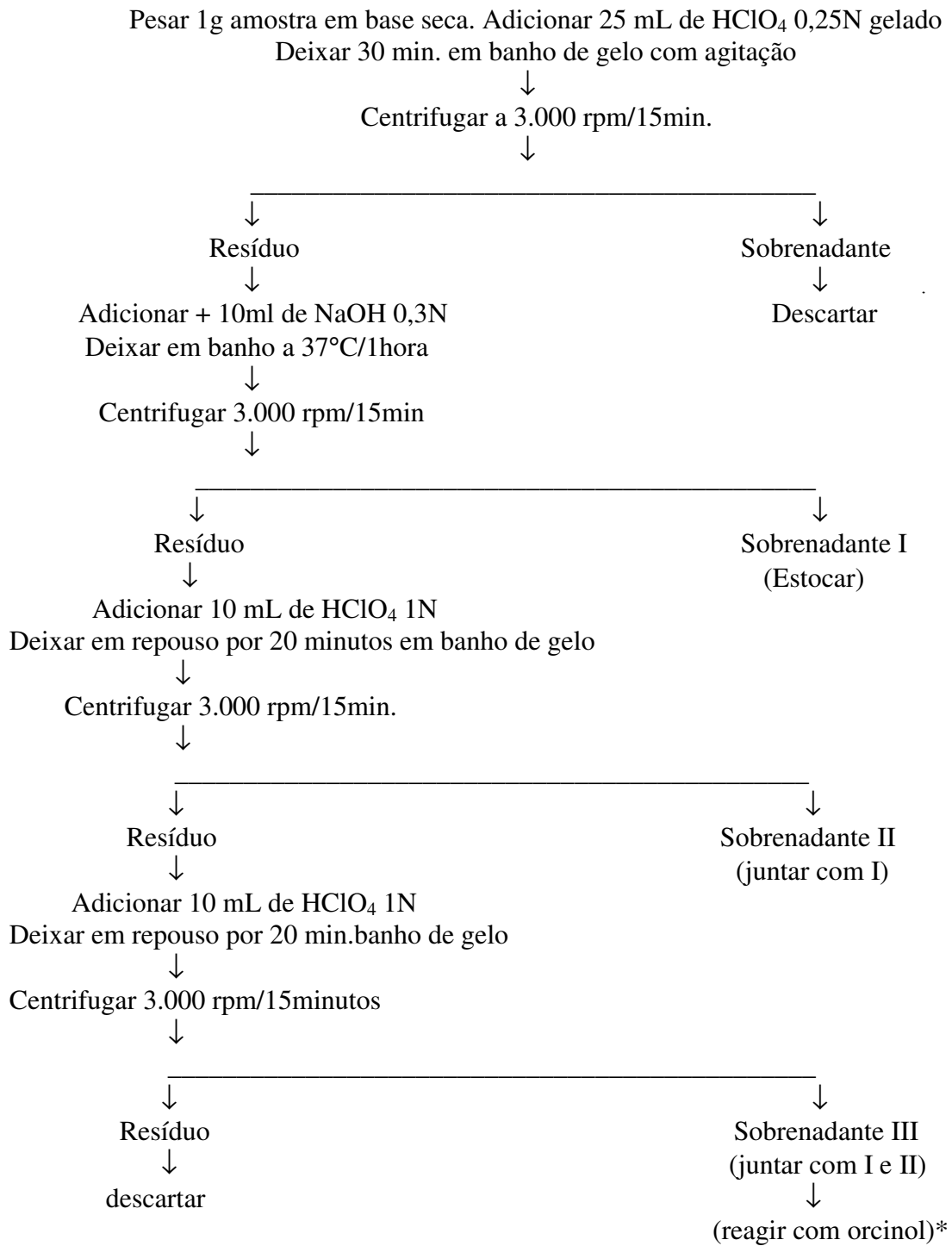


Figura 15. Reação de complexação da ribose (RNA) com orcinol.

3.2.7.1. Extração do RNA da biomassa íntegra de levedura

Pesa-se 1,00g de levedura fresca íntegra em base seca, adiciona-se 25mL de ácido perclórico 0,25N gelado e mantém-se em repouso por 30 minutos. Centrifuga-se a 3000rpm por 30 minutos e descata-se o primeiro sobrenadante. Ao resíduo adiciona-se 10mL de NaOH 0,3N, mantém-se em banho-maria a 37°C por 1 hora, centrifuga-se a 3000 rpm por 15 minutos e guarda-se o sobrenadante. Ao resíduo da centrifugação adiciona-se 10mL de HClO₄ 1N, mantém-se em repouso por 20 minutos em banho de gelo. Centrifuga-se a 3000 rpm por 15 minutos e guarda-se o sobrenadante. Repete o procedimento com HClO₄. Ajuntam-se os sobrenadantes e, após a reação com orcinol, determina-se a porcentagem de RNA por espectrofotometria a 670nm.

Fluxograma da extração do RNA



(*) Conforme curva-padrão de RNA

Figura 16. Fluxograma da extração de RNA da biomassa íntegra de levedura.

3.2.7.2. Preparo da curva-padrão de RNA purificado de levedura

Pesa-se 20 mg de RNA puro da marca SIGMA e dissolve-se em 100 mL de água destilada ou solução de NaCl a 0,15M, desta forma obtém-se uma solução estoque de 200 µg de RNA/mL. Toma-se 5,0 mL desta solução e acrescenta-se 5,0 mL de HClO₄ 0,25N de forma a obter-se uma concentração final de 100µg de RNA/mL no tubo de ensaio. Transfere-se de 0,1 a 1,0 mL desta solução para tubos de ensaio e 0,9 a 0,1 mL de HCl 0,1N; completa-se o volume para 3 mL, acrescentando em cada tubo 2,0 mL do reagente orcinol conforme a Tabela 24. Os tubos são aquecidos em banho-maria e mantidos em ebulição por exatamente 30 minutos. Decorridos 30 minutos em ebulição, a série de tubos é resfriada em banho de gelo e suas absorvâncias são lidas em espectrofotômetro calibrado com a amostra em branco (1,0 mL de HCl 0,1N e 2,0 mL do reagente orcinol) a 670 nm e, em seguida, determina-se a equação da curva por regressão linear (PARISH, 1976 apud CORREA, 1992, p.37).

Tabela 24. Composição do padrão de RNA.

Tubo (nº)	mL (do padrão)	mL (HCl 0,1N)	mL (Orcinol)	Absorbância (670nm)
00	0,0	1,0	2,0	A ₀₀ (branco)
01	0,1	0,9	2,0	A ₀₁
02	0,2	0,8	2,0	A ₀₂
03	0,3	0,7	2,0	A ₀₃
04	0,4	0,6	2,0	A ₀₄
05	0,5	0,5	2,0	A ₀₅
06	0,6	0,4	2,0	A ₀₆
07	0,7	0,3	2,0	A ₀₇
08	0,8	0,2	2,0	A ₀₈
09	0,9	0,1	2,0	A ₀₉
10	1,0	0,0	2,0	A ₁₀

Equação do modelo: $Y = aX + b$

(Y): massa de RNA (a) coeficiente angular (X) absorvância (b) erro experimental

R^2 = coeficiente de regressão linear (deve ser próximo a 1,00)

3.2.8. Determinação de nucleotídeos (GMP e IMP)

Foram determinados em HPLC a 260nm, fluxo de 1mL/minuto, 25°C, utilizando como fase móvel o NaH₂PO₄ 0,2M, segundo método da Ajinomoto modificado.

3.3. Planejamento experimental

A falta de planejamento durante uma etapa de investigação de parâmetros pode levar a resultados incertos ou demandar muito tempo. Um método comumente utilizado é o da superfície de resposta, muito útil na realização de experimentos biológicos (BARROS-NETO et al., 1995).

A “metodologia da superfície de resposta”, utilizada neste trabalho, é um conjunto de técnicas estatísticas úteis para analisar problemas com variáveis independentes contínuas em relação à variável aleatória. Seu objetivo é buscar a combinação dos fatores que otimizam a resposta e a modelagem matemática. Isto ocorre por meio do estabelecimento da relação entre a variável resposta e as variáveis independentes, pois em geral esta não é conhecida e precisa de aproximação. O procedimento seqüencial da MSR é a análise estatística dos efeitos e das interações por meio da ANOVA.

Sua maior aplicação é na modelagem e análise de problemas nos quais a variável de resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis independentes ou fatores, cujo objetivo é otimizar a variável resposta. Por exemplo, o pesquisador está interessado em encontrar os níveis de temperatura, tempo e pH que maximizam o rendimento de um processo. Neste caso, o rendimento é a resposta que varia em função da temperatura, tempo e pH, ou seja,

$$Y = f(x_1, x_2, x_3) + \varepsilon$$

Onde, ε representa o ruído branco ou os erros aleatórios observados na resposta $E(y)$.

$$E(y) = f(x_1, x_2, x_3) = \eta$$

Então a resposta do sistema é representada pela “superfície de resposta” dada por:

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3)$$

Na maioria dos problemas envolvendo superfície de resposta, a forma do relacionamento entre as variáveis dependentes e independentes é desconhecida. Estes modelos funcionam bem para uma região relativamente pequena do espaçamento entre os fatores. Então o primeiro passo é planejar os experimentos, os quais são gerados por softwares apropriados.

Por exemplo, num experimento fatorial fracionado (2^k):

k = número de fatores a dois níveis cada:

(-1): nível mínimo (+1) nível máximo.

Exemplo: 3 fatores = $2^3 = 8$ combinações

Em posse dos resultados, o primeiro passo é encontrar uma aproximação para o verdadeiro relacionamento entre a variável resposta (y) e as variáveis independentes (fatores). Geralmente utiliza-se uma regressão polinomial de baixo grau em alguma região das variáveis independentes, por exemplo:

Modelo de regressão polinomial de primeiro grau:

$$Y = \beta_0 + \beta_{11} + \beta_{22} + \beta_{kk} + \varepsilon$$

Modelo de regressão polinomial de segunda ordem:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

↑

(1)

↑

(2)

↑

(3)

(Efeito linear) (Efeito quadrático) (Efeito de interação)

Neste trabalho foram utilizados delineamentos fatoriais incompletos com pontos equidistantes em três e quatro níveis de variação. As variáveis estudadas foram pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio, amônia e tempo de autólise.

A otimização do processo foi realizada por meio de quatro ensaios e os parâmetros iniciais foram baseados na literatura e nos dados de aplicação industrial. O quinto ensaio caracterizou-se pela avaliação cinética e pelo balanço de massa do processo.

A recuperação do RNA e a quantificação de nucleotídeos (GMP+IMP) foram realizadas posteriormente por precipitação fracionada e análise em HPLC, respectivamente.

3.3.1. Avaliação do pH em diferentes temperaturas

Empregou-se o desenho fatorial fracionado da Metodologia da Superfície de Resposta $3^{**}(2^{-0})$, com duas variáveis independentes (X_1 : Temperatura, X_2 : pH), em três níveis equidistantes (-1), (0) e (+1), planejados em nove experimentos, distribuídos em três blocos, conforme valores codificados e decodificados nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 25. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio I).

Variáveis Independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X ₁ : temperatura (°C)	40	50	60
X ₂ : pH	4	5	6

Tabela 26. Ensaio (I) decodificado.

Experimento	Bloco	X ₁	X ₂	T(°C)	pH
01	1	0,0000	1,0000	50,00	6,00
02	1	1,0000	0,0000	60,00	5,00
03	1	-1,0000	-1,0000	40,00	4,00
04	2	-1,0000	0,0000	40,00	5,00
05	2	1,0000	1,0000	60,00	6,00
06	2	0,0000	-1,0000	50,00	4,00
07	3	1,0000	-1,0000	60,00	4,00
08	3	-1,0000	1,0000	40,00	6,00
09	3	0,0000	0,0000	50,00	5,00

3.3.2. Avaliação do efeito do NaCl em diferentes temperaturas

Empregou-se o desenho fatorial fracionado $3^{**}(2^{-0})$, com duas variáveis independentes (X₁:Temperatura, X₂: % NaCl), em três níveis equidistantes (-1), (0) e (+1), planejados em nove experimentos, distribuídos em três blocos, conforme as Tabelas 27 e 28.

Tabela 27. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio II).

Variáveis Independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X ₁ : temperatura (°C)	40	50	60
X ₂ : % NaCl	0	4	8

Tabela 28. Ensaio (II) decodificado.

Experimento	Bloco	X ₁	X ₂	T(°C)	% NaCl*
01	1	0,0000	1,0000	50,00	8,00
02	1	1,0000	0,0000	60,00	4,00
03	1	-1,0000	-1,0000	40,00	0,00
04	2	-1,0000	0,0000	40,00	4,00
05	2	1,0000	1,0000	60,00	8,00
06	2	0,0000	-1,0000	50,00	0,00
07	3	1,0000	-1,0000	60,00	0,00
08	3	-1,0000	1,0000	40,00	4,00
09	3	0,0000	0,0000	50,00	8,00

(*): porcentagem em base seca de biomassa.

3.3.3. Avaliação dos efeitos do NaCl e NH₃ em diferentes temperaturas

Empregou-se o desenho fatorial completo 3**⁽³⁻⁰⁾, com três variáveis independentes (X₁: Temperatura, X₂: % NaCl, X₃: % NH₃), em três níveis equidistantes (-1), (0) e (+1), planejados em vinte e sete experimentos, distribuídos em um bloco, conforme valores codificados e decodificados nas Tabelas 29 e 30.

Tabela 29. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio III).

Variáveis Independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X ₁ : Temperatura (°C)	50	55	60
X ₂ : % NaCl	8	10	12
X ₃ : % NH ₃	7	9	11

Tabela 30. Ensaio (III) decodificado.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	T(°C)	% NaCl*	% NH ₃ *
01	-1,00	-1,00	-1,00	50,00	8,00	7,00
02	-1,00	-1,00	0,00	50,00	8,00	9,00
03	-1,00	-1,00	1,00	50,00	8,00	11,00
04	-1,00	0,00	-1,00	50,00	10,00	7,00
05	-1,00	0,00	0,00	50,00	10,00	9,00
06	-1,00	0,00	1,00	50,00	10,00	11,00
07	-1,00	1,00	-1,00	50,00	12,00	7,00
08	-1,00	1,00	0,00	50,00	12,00	9,00
09	-1,00	1,00	1,00	50,00	12,00	11,00
10	0,00	-1,00	-1,00	55,00	8,00	7,00
11	0,00	-1,00	0,00	55,00	8,00	9,00
12	0,00	-1,00	1,00	55,00	8,00	11,00
13	0,00	0,00	-1,00	55,00	10,00	7,00
14	0,00	0,00	0,00	55,00	10,00	9,00
15	0,00	0,00	1,00	55,00	10,00	11,00
16	0,00	1,00	-1,00	55,00	12,00	7,00
17	0,00	1,00	0,00	55,00	12,00	9,00
18	0,00	1,00	1,00	55,00	12,00	11,00
19	1,00	-1,00	-1,00	60,00	8,00	7,00
20	1,00	-1,00	0,00	60,00	8,00	9,00
21	1,00	-1,00	1,00	60,00	8,00	11,00
22	1,00	0,00	-1,00	60,00	10,00	7,00
23	1,00	0,00	0,00	60,00	10,00	9,00
24	1,00	0,00	1,00	60,00	10,00	11,00
25	1,00	1,00	-1,00	60,00	12,00	7,00
26	1,00	1,00	0,00	60,00	12,00	9,00
27	1,00	1,00	1,00	60,00	12,00	11,00

(*): porcentagem em base seca de biomassa.

3.3.4. Otimização das variáveis independentes na extração de RNA

Empregou-se o desenho central rotacional composto $2^{**}(5-2)$, com três variáveis independentes (X_1 : Temperatura, X_2 : % NaCl, X_3 : % NH_3), em quatro níveis equidistantes (-2), (-1), (0), (1) e (+2), planejados em 17 experimentos, distribuídos em três blocos e três repetições no ponto central, conforme as Tabelas 31 e 32.

Tabela 31. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio IV).

Variáveis Independentes	Níveis				
	(-2)	(-1)	(0)	(+1)	(+2)
X_1 : temperatura (°C)	45	50	55	60	65
X_2 : % cloreto de sódio	6	8	10	12	14
X_3 : % amônia	8	10	12	14	16

Tabela 32. Ensaio (IV) decodificado.

Experimento	Boloco	X_1	X_2	X_3	T(°C)	NaCl	NH_3^*
01	1	-1,00	-1,00	-1,00	50,00	8,00	10,00
02	1	-1,00	1,00	1,00	50,00	12,00	14,00
03	1	1,00	-1,00	1,00	60,00	8,00	14,00
04	1	1,00	1,00	-1,00	60,00	12,00	10,00
05	1	0,00	0,00	0,00	55,00	10,00	12,00
06	2	-1,00	-1,00	1,00	50,00	8,00	14,00
07	2	-1,00	1,00	-1,00	50,00	12,00	10,00
08	2	1,00	-1,00	-1,00	60,00	8,00	10,00
09	2	1,00	1,00	1,00	60,00	12,00	14,00
10	2	0,00	0,00	0,00	55,00	10,00	12,00
11	3	-2,00	0,00	0,00	45,00	10,00	12,00
12	3	2,00	0,00	0,00	65,00	10,00	12,00
13	3	0,00	-2,00	0,00	55,00	6,00	12,00
14	3	0,00	2,00	0,00	55,00	14,00	12,00
15	3	0,00	0,00	-2,00	55,00	10,00	8,00
16	3	0,00	0,00	2,00	55,00	10,00	16,00
17	3	0,00	0,00	0,00	55,00	10,00	12,00

(*): porcentagem em base seca de biomassa.

3.4. Métodos experimentais

3.4.1. Avaliação dos processos combinados (Ensaio V)

A suspensão celular com 15% de levedura em base seca foi submetida a autólise com adição de NaCl no início do processo, nas condições otimizadas no ensaio IV. A cada 2 horas avaliou-se a extração do RNA e adicionou-se a uma alíquota de 100mL do autolisado, 12,2% de NH₃ em massa de levedura, a qual foi submetida a 60°C por 15 minutos.

3.4.2. Limpeza e desamargamento da biomassa

A pré-lavagem da biomassa de levedura com água destilada foi realizada em duplicata por processo de filtração a vácuo em tela sintética de nylon 15 micras. Posteriormente suspendeu-se a biomassa em solução de hidróxido de sódio 0,2% na proporção de 1:1 (v/v), a qual foi homogeneizada por trinta minutos. Em seguida, filtrou e lavou-se com água destilada até pH em torno de 7,0. O sobrenadante foi descartado e a biomassa desamargada utilizada para extração do RNA, conforme a Figura 17.

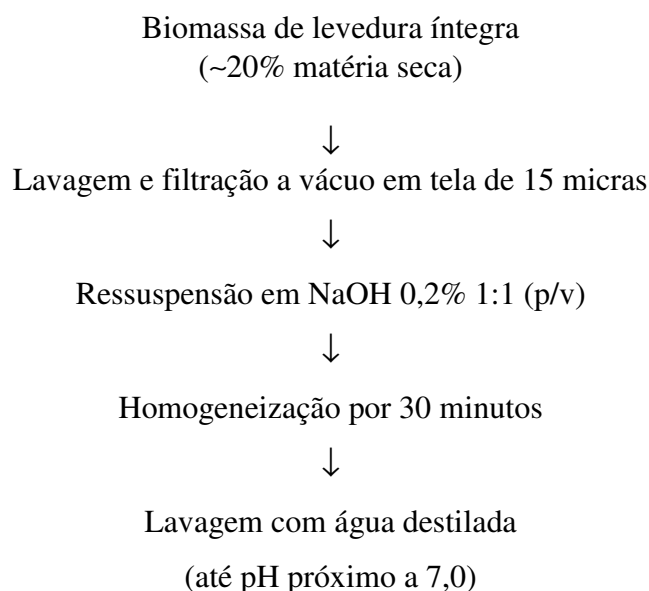


Figura 17. Fluxograma da limpeza e desamargamento da biomassa.

3.4.3. Autólise

Preparou-se a suspensão de levedura com 15% de biomassa em base seca de acordo com o planejamento experimental e conduziu-se o processo em banho termostático sob agitação lenta por até 24 horas, conforme cada delineamento e procedimento da Figura 18. As variáveis independentes foram pH, temperatura, % de NaCl, % de amônia e tempo de processo. Nos ensaios I a IV o NaCl foi adicionado após cada processo de autólise e o NH₃ no final. A resposta do sistema baseou-se na taxa de extração de RNA da biomassa.

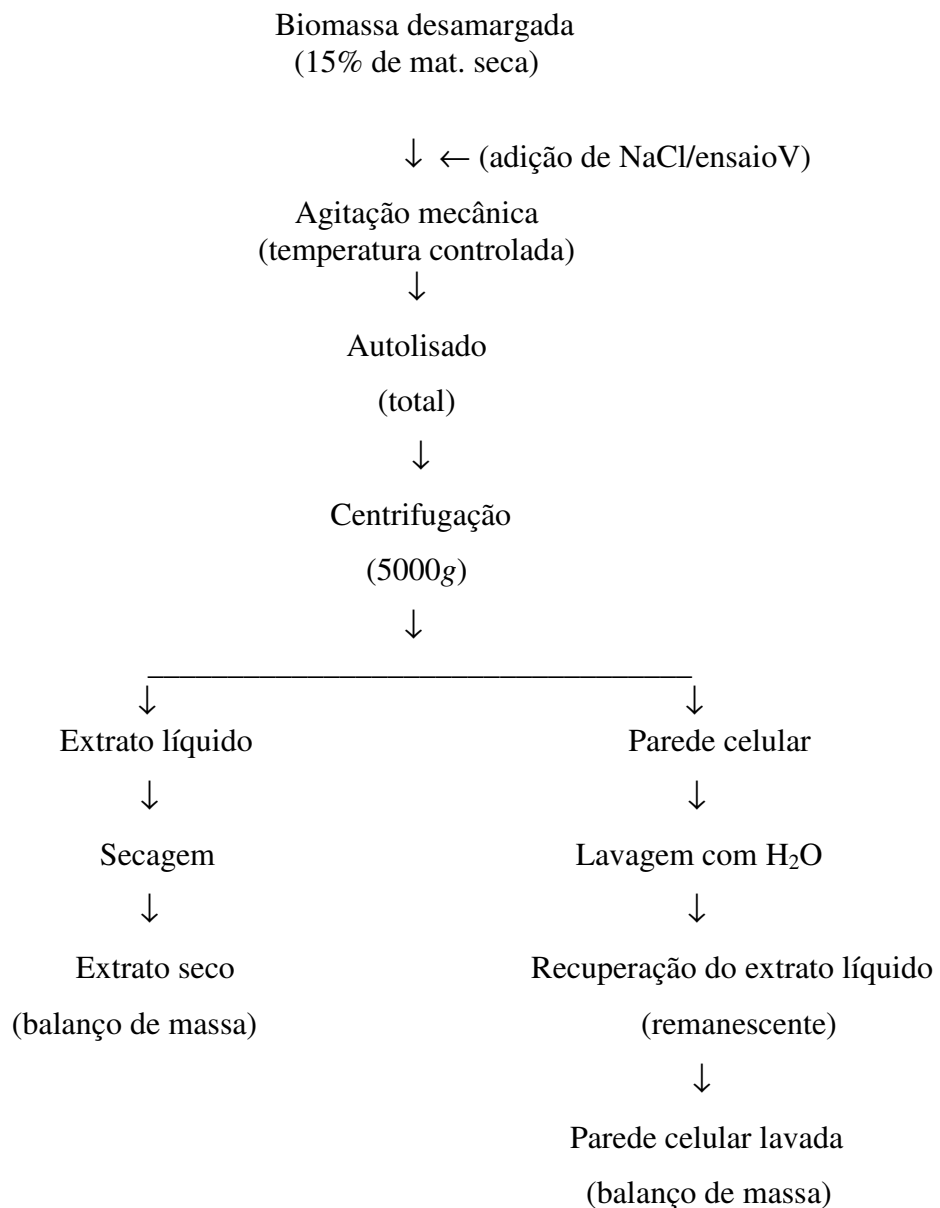


Figura 18. Fluxograma de autólise.

3.4.4. Recuperação da biomassa de RNA

Figura 19. Recuperação da biomassa de RNA

3.4.5. Precipitação e recuperação do RNA do sobrenadante

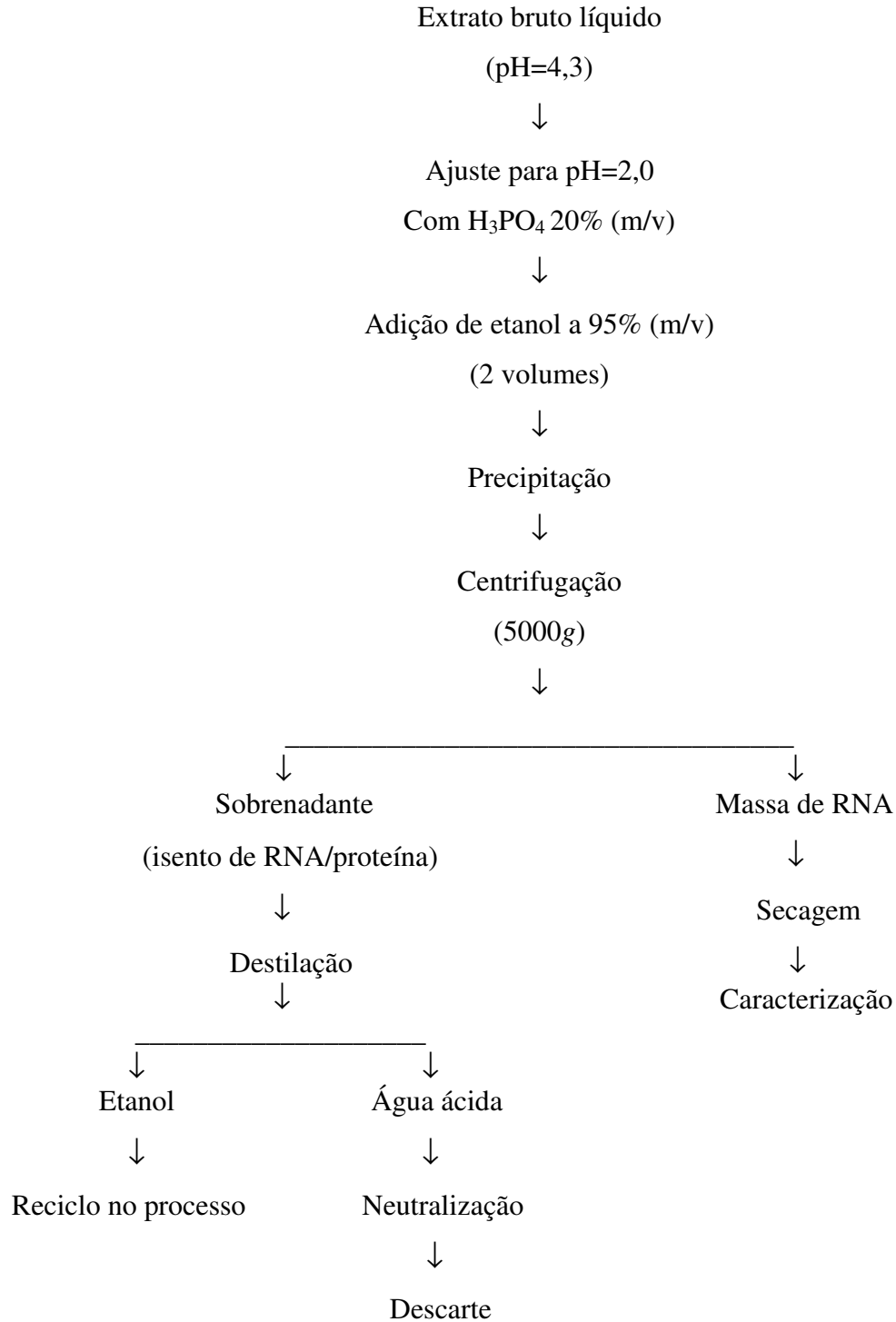


Figura 20. Fluxograma de precipitação e purificação do RNA de levedura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química da levedura íntegra de cerveja

Os resultados da composição química da levedura íntegra de cerveja estão relatados na Tabela 33. Os componentes determinados em maior concentração foram proteínas, fibras e RNA. O teor médio de proteínas foi de 43,24%, fibras 28,90% e RNA 9,70%, em base seca de levedura e, situaram-se próximos aos publicados na literatura citada.

Para cálculo do teor de proteínas utilizou-se o fator de conversão 5,8 segundo SGARBIERI (1996). De acordo com REED & NAGOWITHANA (1991), o uso do fator 6,25 superestima o valor da proteína de levedura, uma vez que cerca de 14% do nitrogênio total corresponde ao nitrogênio não protéico proveniente das bases purínicas e pirimidínicas.

O teor de RNA foi quantificado com base na curva-padrão elaborada conforme o procedimento descrito no item 4.2 e a viabilidade celular com o uso de vermelho de eritrosina para coloração das células mortas e, situou-se entre 78,70 e 93,51%, sendo que para ambos os ensaios todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

Tabela 33. Resultados da composição química da biomassa de levedura de cerveja (*).

Componente	% em base seca
Proteína (Nx5,8)	43,24
Fibra total	28,90
RNA	9,70
Cinzas	7,90
Extrato etéreo	2,84
Gordura (hidrólise ácida)	0,77

(*): determinações em triplicata.

4.2. Otimização da extração de RNA

O estudo dos efeitos e das interações entre as variáveis independentes no processo autólise foi considerado de importância fundamental, pois permitiu avaliar as melhores condições para extração e recuperação do RNA da biomassa e simultaneamente definir condições mais adequadas para a produção do extrato de levedura e a recuperação da biomassa protéica autolisada.

A otimização do processo transcorreu por meio da realização de quatro ensaios, cujos delineamentos fatoriais foram gerados pelo software *Statística* versão 5.1 e avaliados pela Metodologia da Superfície de Resposta (MSR).

A resposta do sistema baseou-se na taxa de extração do RNA da biomassa (Y%) e por meio do ensaio V, realizou-se o balanço de massa e a composição química das frações de extrato e parede celular.

No cálculo de Y%, considerou-se o percentual de RNA obtido no extrato autolisado em relação à massa preliminarmente determinada na biomassa íntegra.

$$(Y\%) = \frac{\text{massa de RNA obtida no extrato bruto}}{\text{massa de RNA presente na biomassa}} \times 100$$

4.2.1. Ensaio I: avaliação do efeito do pH de autólise em diferentes temperaturas

O ensaio I teve por objetivo avaliar o efeito do pH em diferentes temperaturas vs. taxa de extração de RNA pelo processo de autólise. Os níveis das variáveis inicialmente estudadas foram pH 4, 5 e 6 em temperaturas de 40, 50 e 60°C, ambos baseados na literatura, que de forma geral apontam para uma faixa de pH entre 3,0 e 7,0 em temperaturas entre 30 a 70°C (FEUILAT, 1982; SUGIMOTO et al., 1973)

O tempo definido para o ensaio I foi de 4 horas; sendo a avaliação cinética realizada nas condições otimizadas por meio do ensaio V. Os resultados obtidos para o ensaio I estão citados na Tabela 35 e, de forma geral, houve uma grande variação na taxa de extração do RNA da biomassa. Analisando cada experimento de forma independente, os rendimentos obtidos situaram-se entre 0,88 e 2,49%, respectivamente, para temperatura de 40°C em pH 4,0 e 50°C em pH 5,0.

Tabela 35. Taxa de extração do RNA da biomassa íntegra de levedura em função do pH em diferentes temperaturas (Ensaio I).

Experimento	T°C	pH	Y (%)*
01	50,00	6,00	2,19
02	60,00	5,00	1,98
03	40,00	4,00	0,88
04	40,00	5,00	1,37
05	60,00	6,00	2,31
06	50,00	4,00	2,34
07	60,00	4,00	2,11
08	40,00	6,00	0,93
09	50,00	5,00	2,49

Y (%): Taxa de extração, grama de RNA no extrato/grama de RNA na levedura íntegra.

A análise de variância (ANOVA), conforme a Tabela 36, mostra que os efeitos e as interações foram significativas ($p < 0,05$) para temperatura ($p = 0,001798$), para o pH ($p = 0,047707$) e para a interação Tx pH ($p = 0,000009$).

Tabela 36. Análise de variância (Ensaio I).

Níveis aplicados	Resultados ⁽¹⁾		
	Faixa ótima	Ponto ótimo	p
(X ₁) T (°C): 40-50-60	51,5-56,0	53,5°C	0,001798*
(X ₂) pH: 4,0-5,0-6,0	4,6-5,6	5,1	0,047707*
Efeito da interação X ₁ *X ₂ : (T°C x pH)			0,000009*

(1): 4 horas de autólise sem NaCl e NH₃. (*) $p < 0,05$ (significativo).

A Figura 22 (superfície de contorno), baseada nos dados da Tabela 35, mostra que o melhor pH situou-se entre 4,6 e 5,6, com ótimo em pH 5,1 para uma faixa de temperatura entre 51,5 a 56,0°C, com um ótimo em 53,5°C. Estas foram as melhores condições de pH para extração de RNA em 4 horas de autólise sem a utilização de NaCl. Esses resultados situaram-se próximos aos publicados na literatura por FEUILAT e CHARPENTIER (1982) e BÉHALOVÁ et al. (1991).

Experimentalmente, durante a realização da autólise, poucas correções de pH foram necessárias, provavelmente porque o pH intracelular do citoplasma da levedura está ao redor de 5,0. Considerando-se os resultados de TANEKAWA et al. (1981), a faixa de pH 4,5 a 5,5 é a mais propícia para preservação do caráter polimérico da molécula de RNA, também um importante critério considerado neste trabalho, uma vez que se pretendeu recuperar o máximo de RNA na sua forma polimérica, na produção do extrato de levedura.

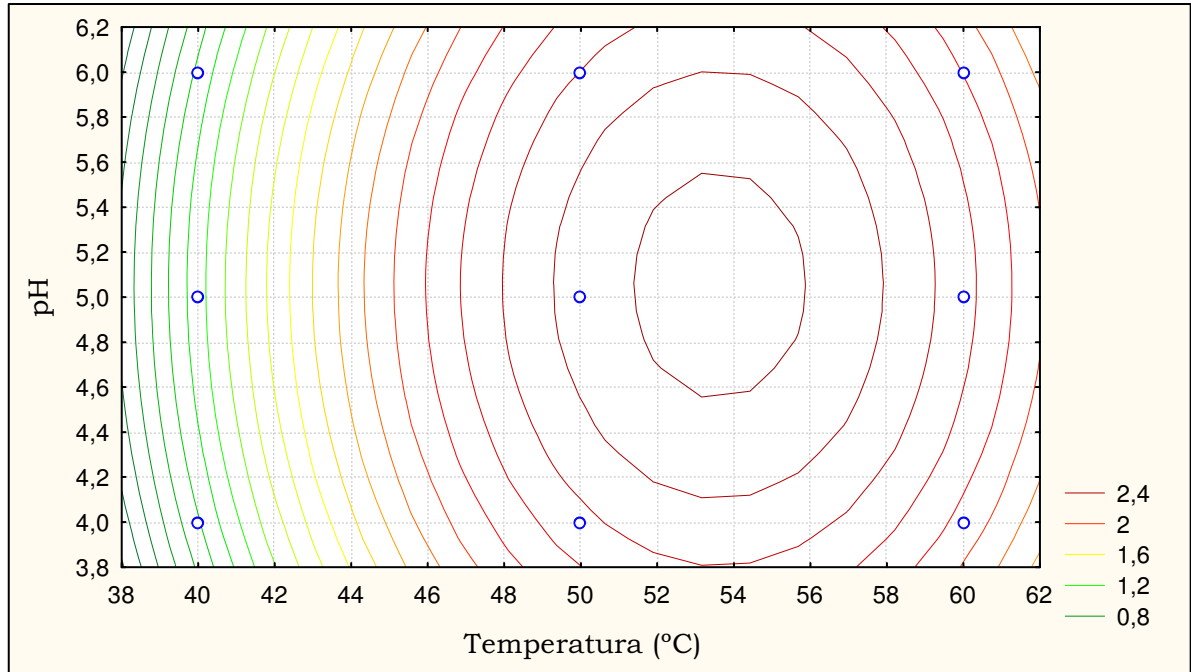


Figura 22. Efeito do pH e da temperatura na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio I).

A superfície de resposta representada pela Figura 23 relaciona a taxa de extração de RNA com as variáveis temperatura e pH. O melhor resultado foi observado a 53,5°C em pH 5,1, com uma taxa de extração em torno de 2,4% em base seca de levedura, em 4 horas de autólise.

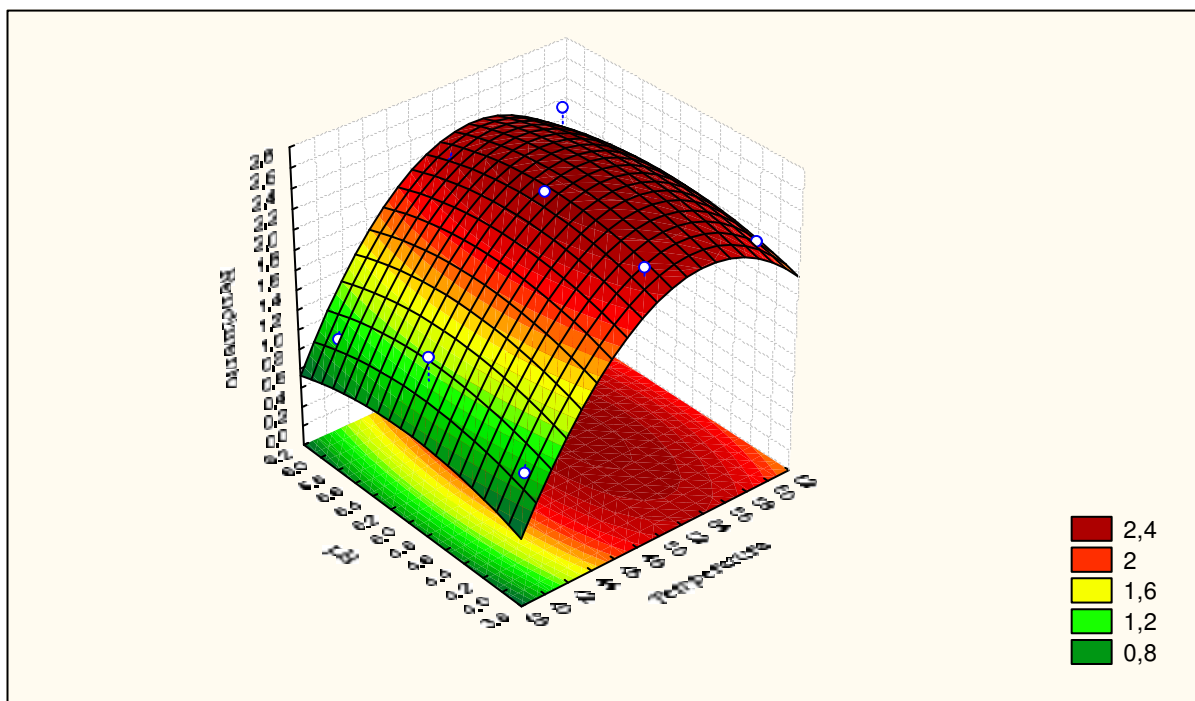


Figura 23. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função do pH e temperatura (Ensaio I).

4.2.2. Ensaio II: avaliação do efeito do NaCl em diferentes temperaturas de autólise

O ensaio II, da mesma forma que o primeiro, apresentou caráter investigativo e teve por finalidade estudar o efeito do cloreto de sódio, na mesma faixa de temperatura utilizada no ensaio I (40-50 e 60°C) em 8 horas de processo, com adição de NaCl após 4 horas de autólise. Os níveis de NaCl foram definidos com base na literatura e relatos de aplicação em nível industrial para a produção de extratos, porém, numa faixa mais restrita, ou seja, entre 0 e 8% em base seca de levedura.

Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 37 e pela comparação dos mesmos, verifica-se que a taxa máxima de extração de RNA foi de 8,66% a 60°C com 8% de NaCl, conforme mostra o experimento 5. É necessário justificar que este tipo de análise linear e independente não tem validade uma vez que, pela metodologia da superfície de resposta, a otimização fundamenta-se na interrelação e nos efeitos combinados entre as variáveis e a resposta do sistema. Por isso, a contextualização desta discussão foi baseada na análise estatística, ANOVA, conforme dados da Tabela 38 e pelas representações gráficas mostradas por meio das Figuras 24 e 25.

Tabela 37. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura e concentração de NaCl (Ensaio II).

Experimento	T°C	% NaCl	Y (%)*
01	50,00	8,0	8,17
02	60,00	4,0	5,89
03	40,00	0,0	1,86
04	40,00	4,0	2,19
05	60,00	8,0	8,66
06	50,00	0,0	5,56
07	60,00	0,0	5,38
08	40,00	8,0	4,30
09	50,00	4,0	5,82

Y (%):Taxa de extração, grama de RNA obtido no extrato/grama de RNA na levedura íntegra.

Pela Figura 24 (superfície de contorno), observa-se que a quantidade de NaCl expressa em matéria seca de levedura tendeu para um valor acima de 8,2%, o que levou a conclusão da necessidade de se realizar novos experimentos com maior quantidade de cloreto de sódio, o que foi feito por meio do ensaio III. Pelo mesmo gráfico, observa-se que a temperatura situou-se entre 49 e 61°C, com ótimo em torno de 55°C, indicando também a necessidade de realização do experimento seguinte.

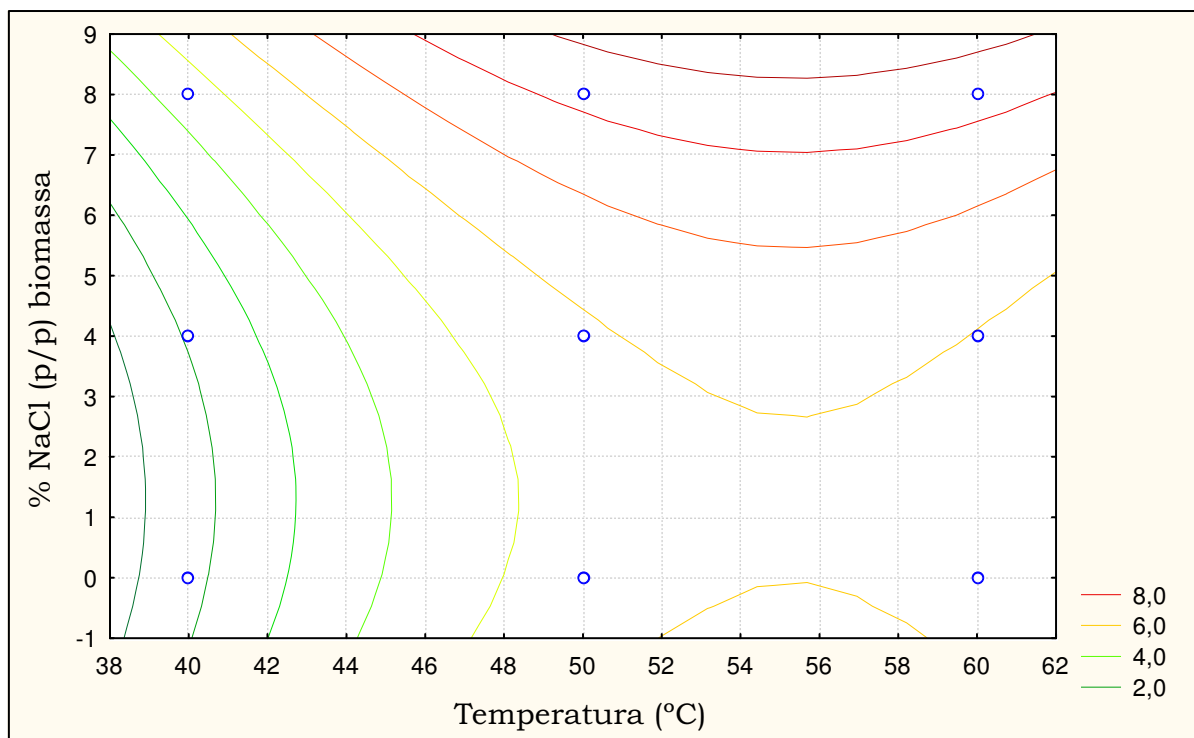


Figura 24. Efeito da temperatura e do cloreto de sódio na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio II).

A análise de variância (ANOVA), mostrada na tabela 38, indicou que a temperatura e o cloreto de sódio exerceram influência significativa na extração de RNA. Os efeitos lineares e quadráticos foram todos significativos ($p < 0,05$) para ambas as variáveis. Pôde-se concluir ainda que houve sinergismo entre a temperatura e o cloreto de sódio ($p = 0,036470$), necessitando, porém, fazer novos experimentos, uma vez que a concentração de NaCl pareceu ainda insuficiente.

Tabela 38. Análise de variância (Ensaio II).

Níveis aplicados	Resultados ⁽¹⁾		
	Faixa ótima	Ponto ótimo	P
(X ₁) T (°C): 40-50-60	49,0-61,0	55°C	(L) 0,000033* (Q) 0,000208*
(X ₂) NaCl: 0,0-4,0-8,0	≥ 8,2	> 8,2	(L) 0,000088* (Q) 0,001124*
Efeito da Interação: X ₁ *X ₂ (T°C x NaCl)			(L) 0,036470*

(1): Tempo de processo: 4h autólise + 4h plasmólise/autólise. (*) $p < 0,05$ (significativo).

A Figura 25 representada pela superfície de resposta conclui o ensaio II, evidenciando que, nas condições experimentais estudadas, a taxa máxima de extração de RNA

da biomassa foi cerca de 10% à temperatura de 55°C em pH 5,1 com o mínimo de 8,2% de cloreto de sódio.

A explicação para o efeito benéfico do cloreto de sódio no processo de autólise, baseia-se no fato de que os íons salinos exercem influência determinante na solubilidade das proteínas devido a maior hidratação e/ou repulsão entre as moléculas, levando conseqüentemente ao aumento da solubilidade protéica e perda do material citoplasmático para o meio externo (SGARBIERI, 1996).

Em relação a extração de ácidos ribonucléicos justifica-se a ação benéfica do sal visto que a maioria das moléculas de RNA, cerca de 60 a 70%, está associada a proteínas, formando complexos nucleoprotéicos estáveis e liberados para o meio juntamente com as proteínas (BEHALOVÁ et al. 1991).

Em relação à quantidade de NaCl, SUGIMOTO et al. (1973) e JIMENEZ et al. (1993) mencionam uma faixa de 15 a 30% em base seca de levedura e temperaturas entre 30 e 70°C. Mas, baseando-se nos resultados obtidos neste ensaio, definiu-se para o ensaio III uma concentração entre 8 e 12% e temperatura entre 50 e 60°C, porém com a adição de NH₃ ao final do processo.

A adição de amônia ao final da autólise teve por finalidade avaliar seu efeito e suas possíveis alterações na qualidade do produto final, principalmente em relação ao grau de hidrólise do RNA e o aspecto do extrato de levedura obtido.

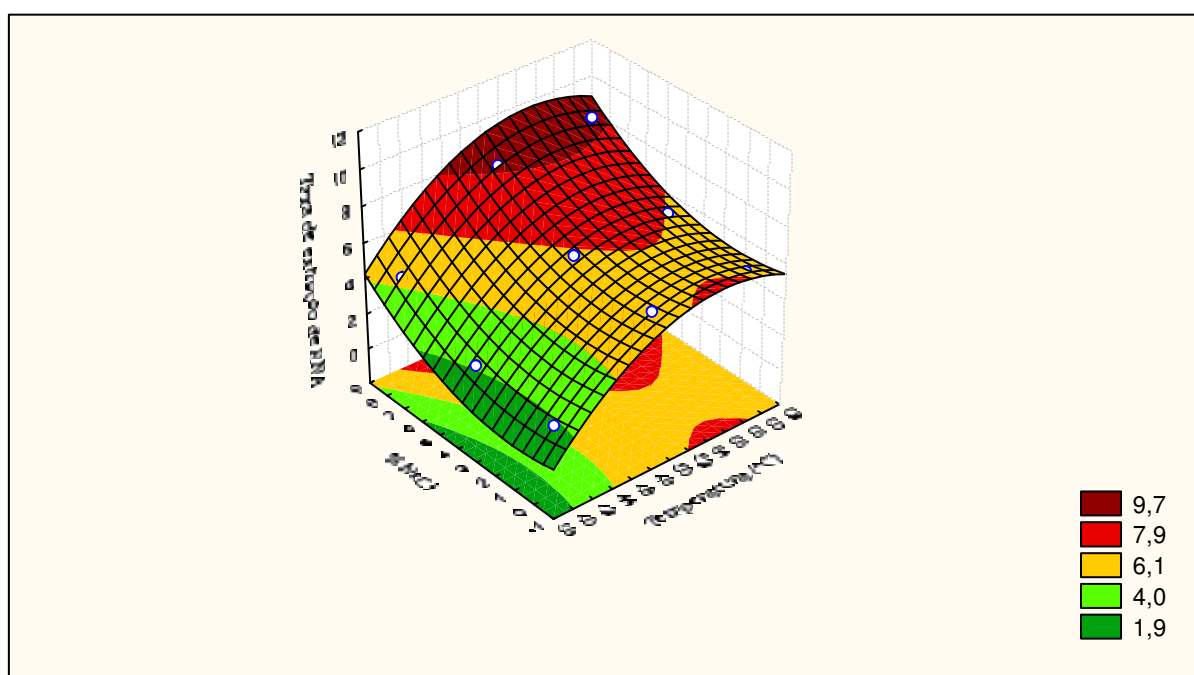


Figura 25. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio (Ensaio II).

4.2.3. Ensaio III: avaliação do efeito da amônia na extração de RNA

No ensaio III restringiu-se os níveis das variáveis determinadas no ensaio II (temperatura e concentração de cloreto de sódio) e investigar a ação da amônia na liberação do RNA remanescente na biomassa, após a autólise.

É bem discutido na literatura que o RNA é muito instável em meio alcalino, especialmente quando se utiliza amônia (LINDBLOM, 1977; KINSELLA, 1987; ALVAREZ & ENRIQUEZ, 1988), devido a sua hidrólise a 3'-monofosfatos cíclicos e bases nitrogenadas (NELSON & COX, 2000), substâncias estas de baixo peso molecular de pouca importância comercial nos extratos de levedura por não possuir a propriedade de realçar o sabor de alimentos (IGUTI, 1996) e que a amônia provoca ainda perda de cerca de 30% das proteínas, racemização de aminoácidos e formação de compostos indesejáveis como lisinoalanina (HEDENSKOG & EBBINGAUS, 1972; SHETTY & KINSELLA, 1979; SGARBIERI, 1996).

Embora pareça uma inconveniência a utilização da amônia na produção de extratos de levedura, o estudo visou investigar seu efeito complementar na extração do RNA remanescente dos processo de autólise e plasmólise, uma vez que há relatos de que algumas indústrias já tenham utilizado o NH_3 na produção de extratos ou autolisados de levedura. Neste ensaio definiu-se como concentração de amônia uma faixa variando de 7 a 11% em base seca de levedura. Estes níveis foram definidos com base em trabalho publicado por ANDREU et al. (1987), em que utilizou-se 10% de NH_3 em base seca de biomassa.

Outra mudança ocorrida neste ensaio, em relação aos anteriores, é que o tempo de autólise (4h) e plasmólise (4h) foi duplicado, passando cada etapa para 8 horas, perfazendo um total de 16 horas. Primeiramente a suspensão celular com 15% de levedura em base seca foi submetida a autólise por um período de 8 horas. Em seguida fez-se a adição de cloreto de sódio conforme o delineamento da Tabela 39 por mais 8 horas, dando continuidade ao processo de autólise, mas, associado à plasmólise. Ao final deste período, à temperatura de 60°C, foi adicionado 10% de amônia, na forma de NH_4OH e, após 15 minutos, encerrado o processo.

O autolisado sofreu, após a adição da amônia, um forte escurecimento a marrom escuro, enquanto o autolisado sem amônia apresentou cor bege clara. A suspensão celular autolisada foi centrifugada a 3.500 rpm (2.600g) e o extrato líquido avaliado quanto ao teor de RNA.

A Tabela 39 mostra os resultados da extração de RNA, obtida por meio de 27 experimentos. Observando-se os dados individualmente, verifica-se que há dois extremos com relação a concentração do RNA no extrato. A menor taxa de extração foi identificada no experimento 7 ($y=53,11\%$) a 50°C com 12% de NaCl e 7% de amônia. Por outro lado, o experimento com a melhor resposta foi o 15 ($y=83,79\%$) a 55°C com 10% de NaCl e 11% de amônia.

Tabela 39. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura, porcentagem de NaCl e NH_3 (Ensaio III).

Experimento	T ($^{\circ}\text{C}$)	% NaCl	% NH_3	(Y%)
01	50	8,00	7,00	57,40
02	50	8,00	9,00	60,90
03	50	8,00	11,00	63,21
04	50	10,00	7,00	55,20
05	50	10,00	9,00	68,87
06	50	10,00	11,00	71,43
07	50	12,00	7,00	53,11
08	50	12,00	9,00	64,12
09	50	12,00	11,00	67,53
10	55	8,00	7,00	59,86
11	55	8,00	9,00	72,52
12	55	8,00	11,00	65,47
13	55	10,00	7,00	61,54
14	55	10,00	9,00	67,38
15	55	10,00	11,00	83,79
16	55	12,00	7,00	59,45
17	55	12,00	9,00	67,82
18	55	12,00	11,00	77,90
19	60	8,00	7,00	61,67
20	60	8,00	9,00	68,35
21	60	8,00	11,00	59,46
22	60	10,00	7,00	58,40
23	60	10,00	9,00	63,67
24	60	10,00	11,00	74,56
25	60	12,00	7,00	57,93
26	60	12,00	9,00	63,57
27	60	12,00	11,00	73,68

Y (%): Taxa de extração, grama de RNA obtido no extrato/grama de RNA na levedura íntegra.

A análise de variância representada na Tabela 40 mostra que foram significativos os efeitos lineares da temperatura ($p=0,015034$), NaCl ($0,01249$), amônia ($p=0,000012$) e as interações entre o cloreto de sódio e a amônia ($p=0,009747$).

Tabela 40. Análise de variância (Ensaio III).

Níveis aplicados	Resultados ⁽¹⁾		
	Faixa ótima	Ponto ótimo	p
(X ₁) T (°C): 50-55-60	52,5-58,5	55,50	0,015034*
(X ₂) % NaCl: 8-10-12	8,7-11,8	10,5	0,012429*
(X ₃) % NH ₃ : 7-9-11	>10,2	>10,2	0,000012*
Interação (X ₁)*(X ₂): T°C x % NaCl			0,858566
Interação (X ₁)*(X ₃): T°C x % NH ₃			0,624033
Interação (X ₂)*(X ₃): % NaCl x % NH ₃			0,009747*

(1) Tempo de processo: 16hs15'. (*) p<0,05 (significativo).

A Figura 26 ilustra a relação entre a concentração de NaCl e a temperatura vs. extração de RNA. A melhor temperatura situou-se entre 52,5°C e 58,5°C com ótimo em 55,5°C. A concentração de NaCl situou-se entre 8,7 e 11,8% com um ótimo em 10,5%. Em relação ao ensaio anterior, os resultados mostraram que houve um estreitamento na faixa de temperatura de 49,0 a 61,0 (ensaio II) para 52,5 a 58,5° (ensaio III). Entretanto, em ambos os ensaios o ponto ótimo que ficou estabelecido entre 55,0 e 55,5°C. O cloreto de sódio sofreu um deslocamento de 8,5 (ensaio II) para 10,5% (ensaio III), como previsto anteriormente no ensaio II.

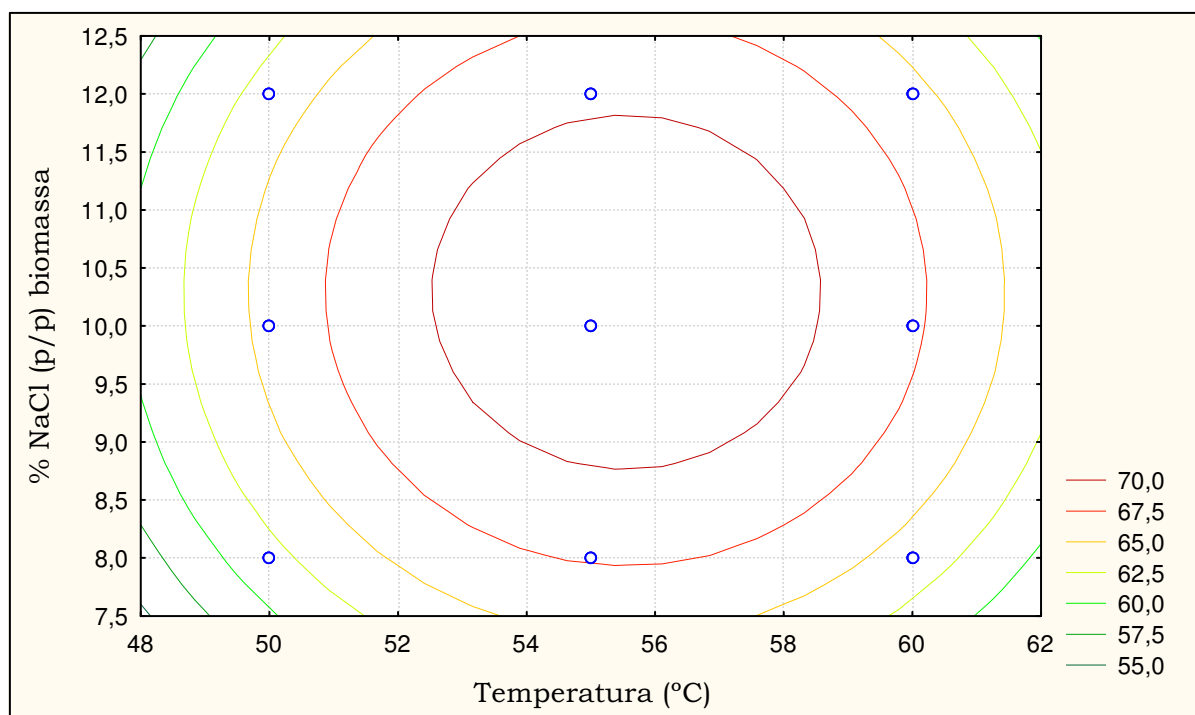


Figura 26. Efeito da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III).

A superfície de resposta representada pela Figura 27 correlaciona a taxa de extração de RNA com a temperatura e concentração de cloreto de sódio. Na concentração 10,5% de NaCl a 55,5°C, a taxa máxima de extração observada foi de aproximadamente 80% do RNA determinado na biomassa íntegra.

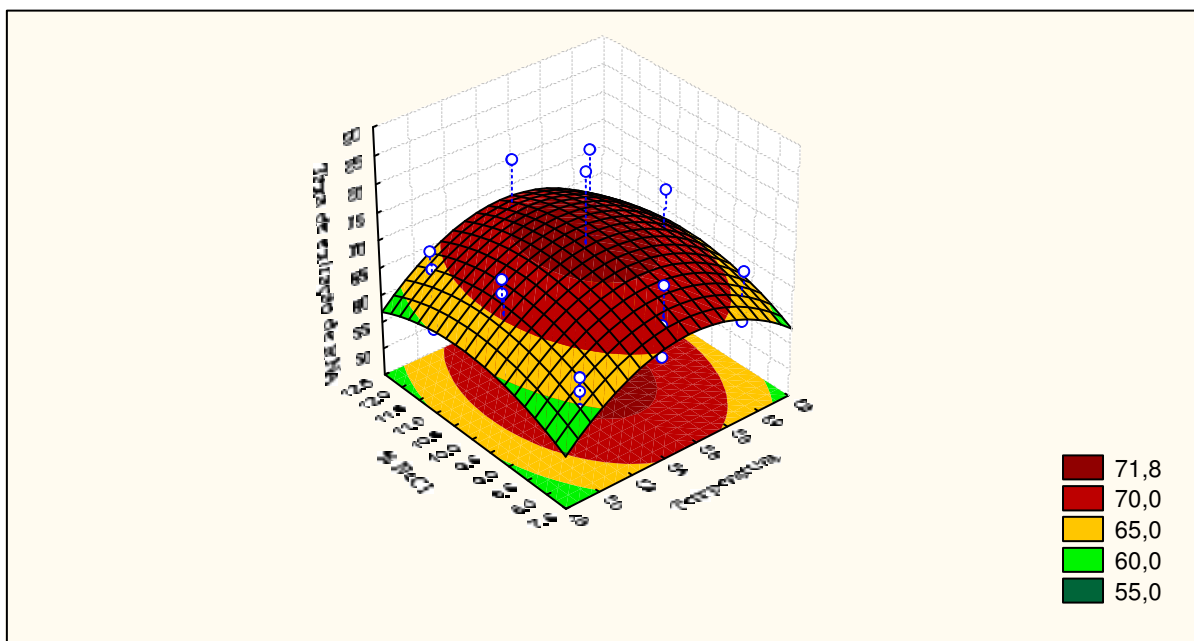


Figura 27. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de cloreto de sódio (Ensaio III).

A figura 28, correlaciona a temperatura do processo com a concentração de amônia, sendo a hidrólise alcalina realizada a 60°C por 15 minutos, segundo ANDREU et al. (1987).

Considera-se, então, que o rendimento final da extração é o resultado do somatório dos efeitos combinados de ambos os processos: autólise (8horas/50 a 60°C), autólise/plasmólise (8h/50 a 60°C) e hidrólise alcalina (15 min./60°C), perfazendo um total de 16 horas e 15 minutos.

Em trabalho desenvolvido por BEHALOVÁ et al. (1991), os autores reduziram o teor de RNA da biomassa de levedura *Candida utilis* em 72,4% pela utilização de NH₄OH 0,4M a 40°C por 1 hora.

Não foi determinado neste ensaio o efeito parcial da amônia sobre a extração de RNA remanescente dos processos de autólise/plasmólise; esta avaliação foi realizada ao final da otimização por meio de ensaios combinados (ensaio V).

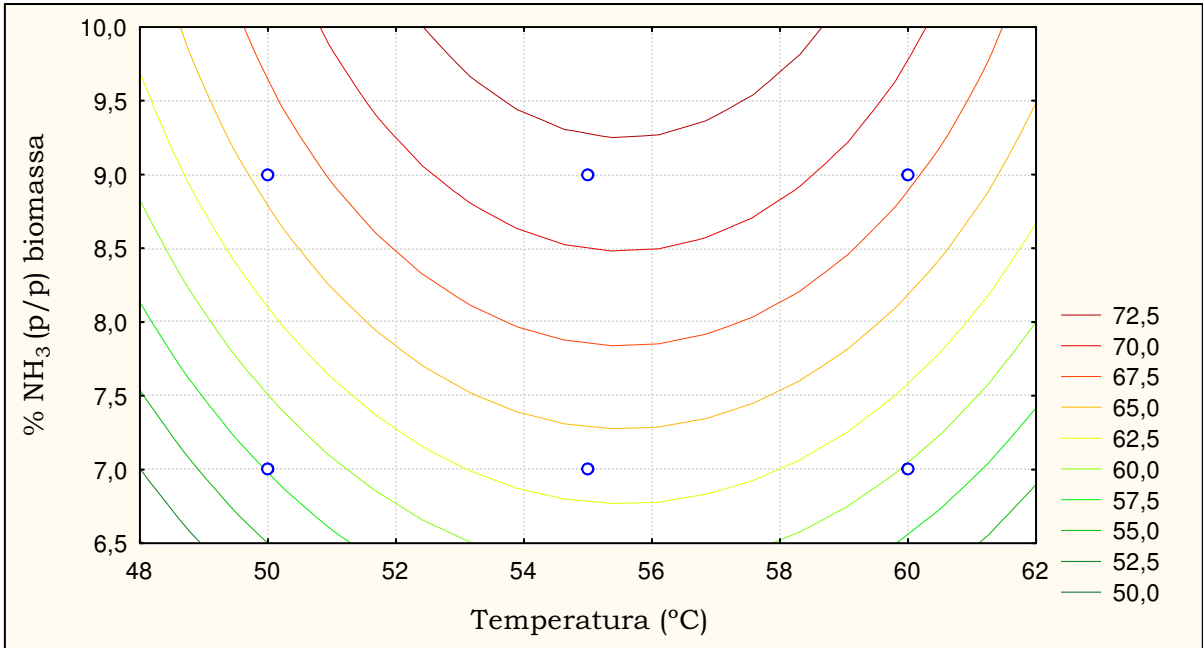


Figura 28. Efeito da temperatura e porcentagem de amônia extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III).

A Figura 29 correlaciona a temperatura e concentração de amônia com a taxa de extração de RNA se situou entre de 75 e 80%.

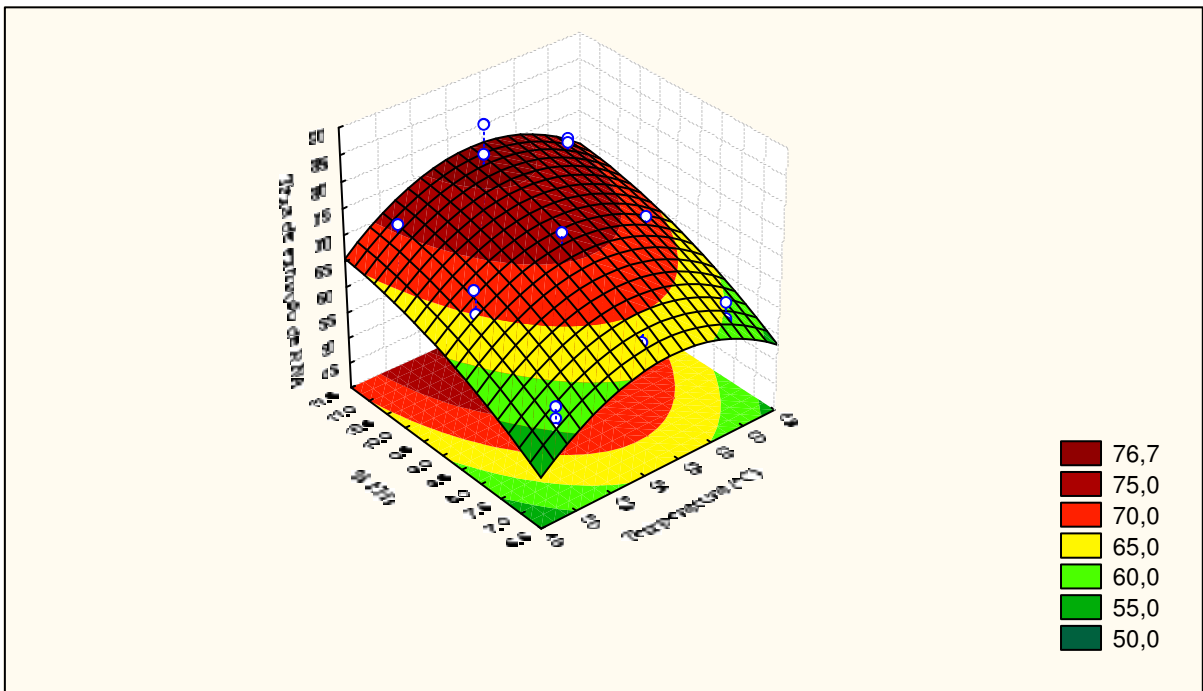


Figura 29. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de amônia (Ensaio III).

De forma similar, as Figuras 30 e 31 mostram, respectivamente, a relação entre as concentrações de cloreto de sódio e amônia e sua relação com a taxa de extração de RNA da biomassa íntegra. Os resultados indicam uma concentração de amônia superior a 10,2%, necessitando, ainda, novos experimentos.

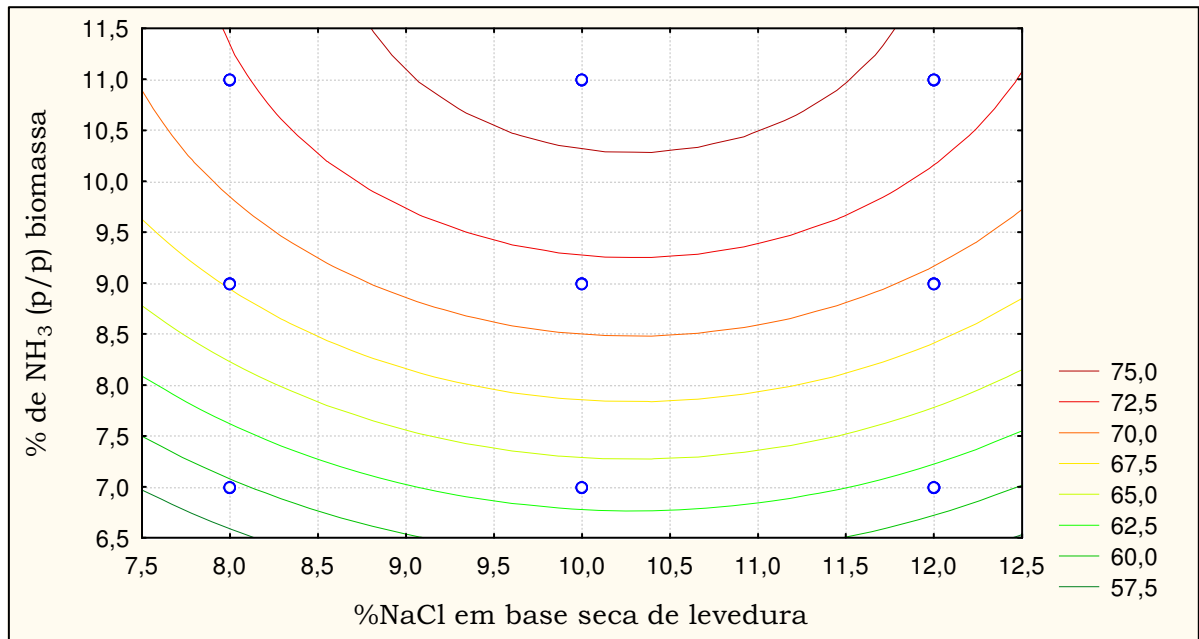


Figura 30. Efeito da porcentagem de NaCl e amônia na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio III).

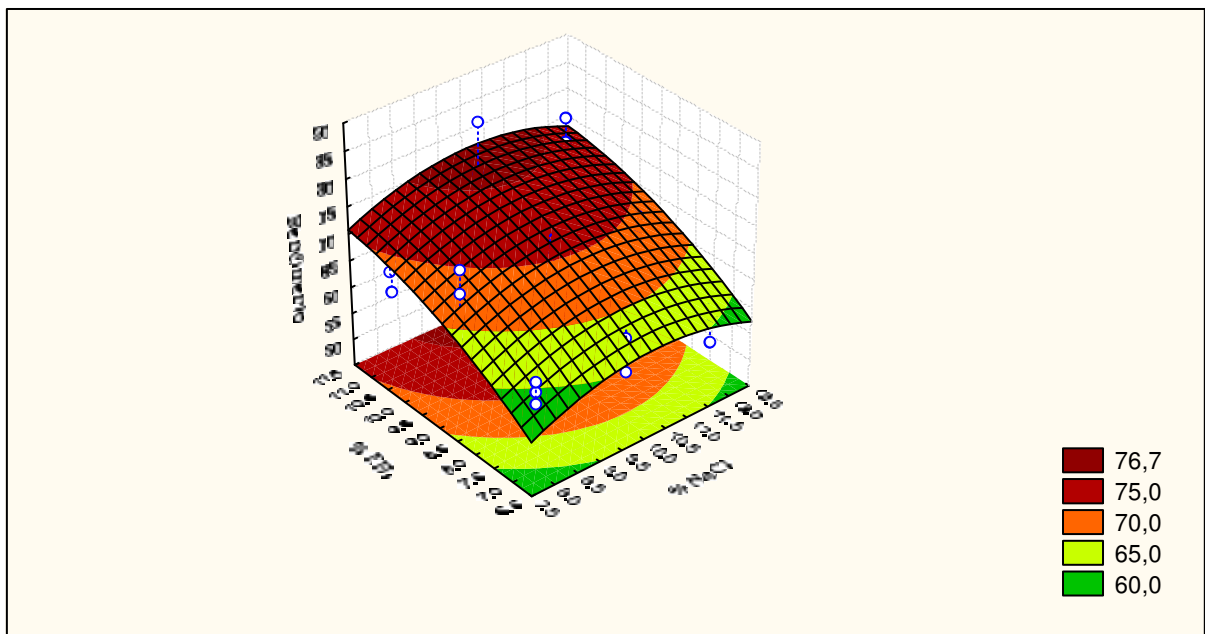


Figura 31. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da porcentagem de NaCl e amônia (Ensaio III).

4.2.4. Ensaio IV: otimização do processos de autólise, plasmólise e hidrólise

A otimização do processo de extração de RNA pela utilização de NaCl e NH₃ foi concluída neste ensaio por meio de 17 experimentos. O tempo total de processo foi aumentado de 16 para 24 horas, sendo 12 horas de autólise mais 12 horas de plasmólise/autólise. Da mesma forma, a amônia adicionada à suspensão pré-autolisada teve sua concentração aumentada de 7 a 11% para 8 a 16%, uma vez que o ensaio III indicou, ainda, uma concentração mínima de 10,2%.

O ensaio foi construído pelo desenho central rotacional composto 2^{**}(5-2), com três variáveis independentes (X₁:Temperatura, X₂: % NaCl, X₃: % NH₃), em quatro níveis equidistantes (-2), (-1), (0), (1) e (+2), planejados por meio de 17 experimentos distribuídos em três blocos e três repetições no ponto central, conforme os seguintes níveis: T(°C): (45-50-55-60-65); % NaCl: (6-8-10-12-14); %NH₃: (8-10-12-14-16).

Os resultados da extração são citados na Tabela 41. Linearmente a taxa de extração situou-se entre 48,31% (experimento 12) e 84,93% (experimento 10). O ensaio foi constituído por três repetições no ponto central, com uma taxa de extração média de 82,37%.

Tabela 41. Taxa de extração do RNA da biomassa em função da variação da temperatura, % de NaCl e %NH₃ (Ensaio IV).

Experimento	T (°C)	% NaCl	% NH ₃	Y(%)
01	50,00	8,00	10,00	61,54
02	50,00	12,00	14,00	53,19
03	60,00	8,00	14,00	66,30
04	60,00	12,00	10,00	63,16
05	55,00	10,00	12,00	79,67
06	50,00	8,00	14,00	68,26
07	50,00	12,00	10,00	58,71
08	60,00	8,00	10,00	65,27
09	60,00	12,00	14,00	68,31
10	55,00	10,00	12,00	84,93
11	45,00	10,00	12,00	51,16
12	65,00	10,00	12,00	48,31
13	55,00	6,00	12,00	62,19
14	55,00	14,00	12,00	67,11
15	55,00	10,00	8,00	58,35
16	55,00	10,00	16,00	63,44
17	55,00	10,00	12,00	82,53

A tabela 42 mostra a análise de variância. Todas as variáveis foram significativas com efeito positivo na extração de RNA. Para um nível de confiança acima de 95%, obtiveram-se os seguintes valores: Temperatura (p= 0,0055260); NaCl (p=0,0173060); NH₃ (0,0119350).

Tabela 42. Análise de variância (Ensaio IV).

Níveis aplicados	Resultados ⁽¹⁾		
	Faixa ótima	Ponto ótimo	P
T (°C): 45-50-55-60-65	53,0-57,5	55,20	0,0055260*
% NaCl: 6-8-10-12-14	8,7-11,2	9,80	0,0173060*
% NH ₃ : 8-10-12-14-16	11,0-13,5	12,20	0,0119350*
Lack of fit (desvio de regressão)			0,2496250

(1) 12hs (autólise) + 12hs (plasmólise) + 15' (hidrólise) (*) $p < 0,05$

A Figura 32 representa os efeitos da temperatura e concentração de NaCl na taxa de extração de RNA. A temperatura situou-se entre 53 e 57,5°C, com um ótimo em 55,2°C. Por outro lado, a concentração de sal foi de 8,5 a 11,1%, com ótimo em 9,8%. Esses resultados ficaram muito próximos aos resultados determinados no ensaio III, concluindo-se, então, a otimização destes parâmetros.

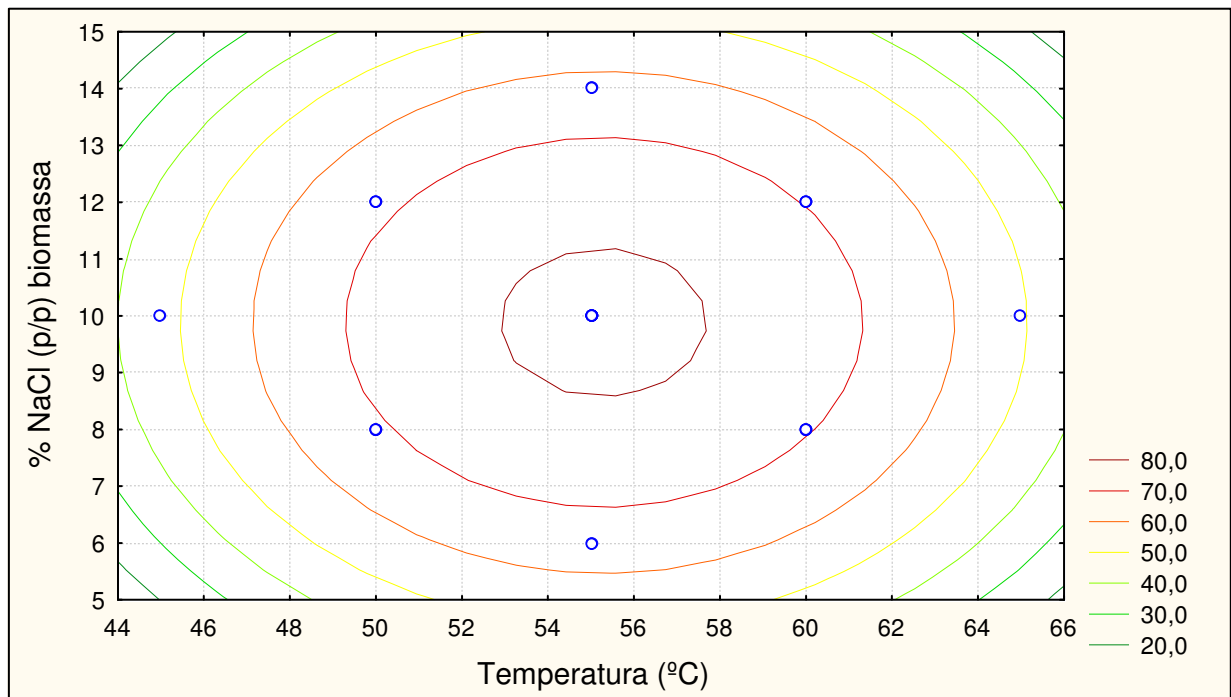


Figura 32. Efeito da temperatura e porcentagem de NaCl na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV).

Na superfície de resposta ilustrada pela Figura 33 tem-se a finalização da otimização, correlacionando a concentração de NaCl com taxa de extração de RNA que, foi cerca de 80% do total de RNA determinado na biomassa. A concentração de sal foi bem inferior ao publicado por SUGIMOTO et al., 1973, que sugerem a utilização de de 15 a 30% e aos níveis de 30 a 40% utilizados pela indústria de extrato de levedura.

O uso do cloreto de sódio aumenta o teor de cinzas no extrato, uma vez que a levedura íntegra apresenta uma concentração de minerais na ordem de 10% (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Após o fracionamento celular e secagem da fração solúvel, o produto final deve apresentar cerca de 15 a 20% de minerais (cinzas), dependendo da quantidade de sal utilizada e da composição mineral do extrato.

Em altas concentrações o NaCl pode-se tornar prejudicial à saúde devido a presença de íons sódio, mas, considerando-se a concentração média de 10% e os níveis de aplicação de extratos nas formulações de alimentos, acredita-se que, não represente riscos à saúde.

Outro aspecto a se considerar é que, do ponto de vista comercial, existe uma grande demanda por extratos salgados por eles criarem maior destaque no realçamento de sabores e melhorar a sensação do gosto.

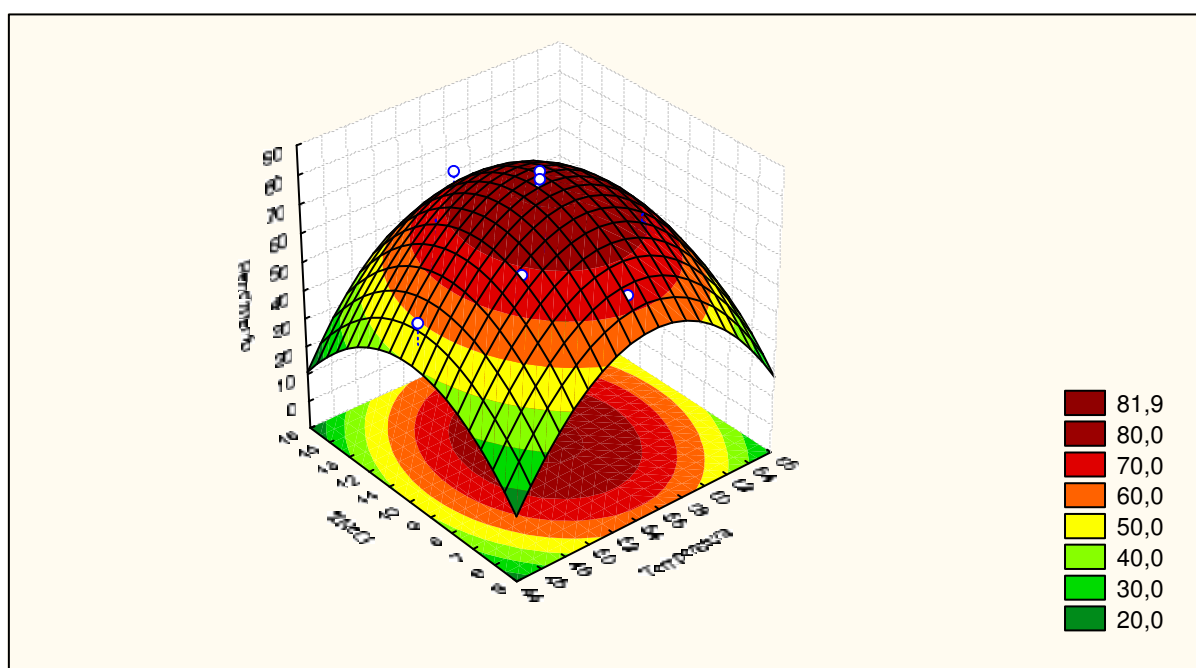


Figura 33. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função temperatura e porcentagem de NaCl (Ensaio IV).

A Figura 34 relaciona temperatura e porcentagem de NH_3 sobre a resposta do sistema. A temperatura restringiu-se à faixa de 53 a 57,5°C com ótimo em 55,2°C para uma concentração de amônia entre 11 a 13,5% com ótimo em 12,2 gramas para cada 100 gramas de levedura em base seca.

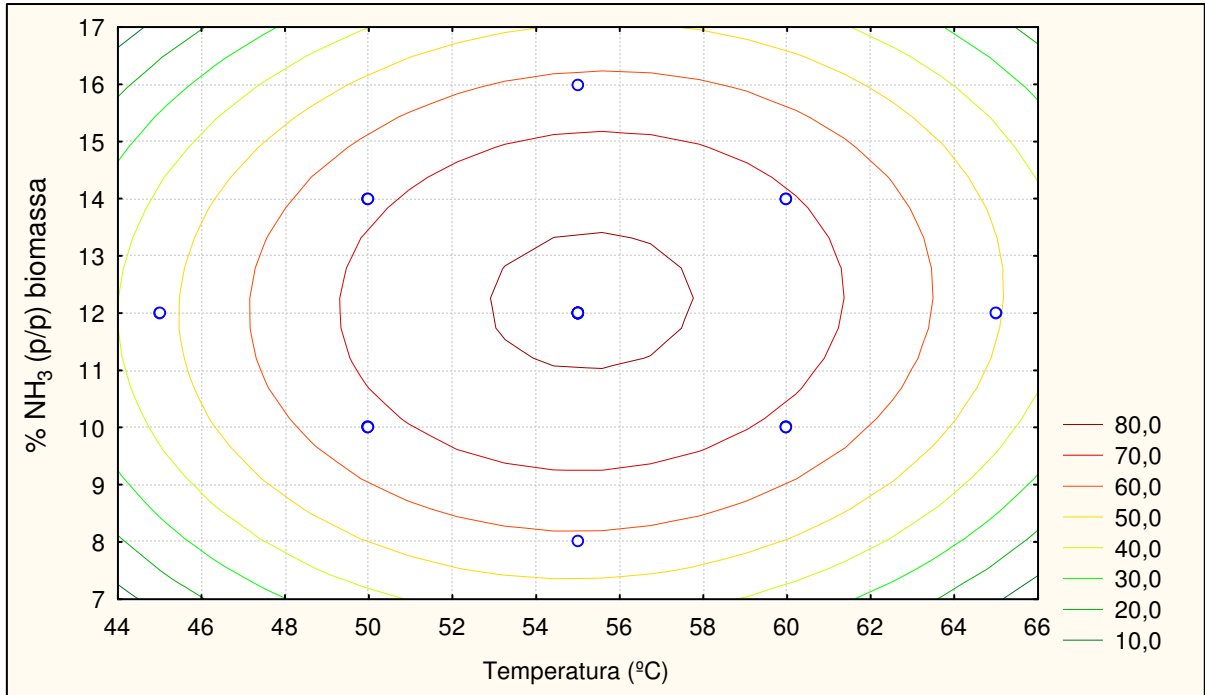


Figura 34. Efeito da temperatura e porcentagem de amônia na extração do RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV).

A superfície de resposta ilustrada pela Figura 35 mostra a variação da taxa de extração de RNA em função da temperatura e concentração de amônia. O melhor resultado alcançado foi de 80% em relação à biomassa íntegra.

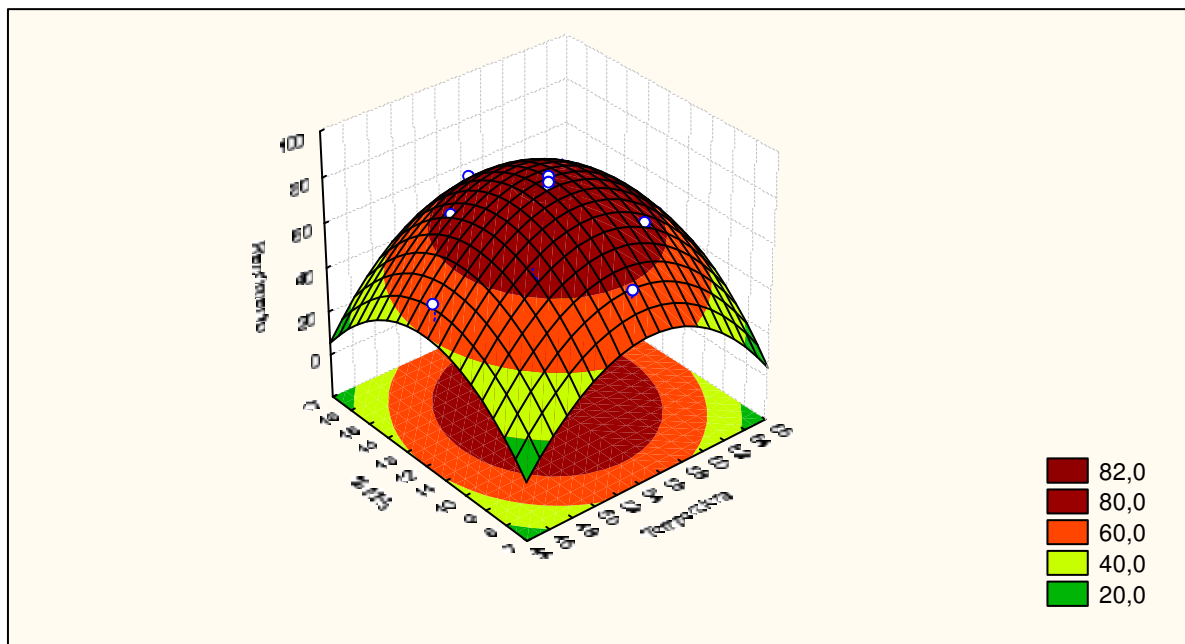


Figura 35. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da temperatura e porcentagem de amônia (Ensaio IV).

As Figuras 36 e 37 relacionam as concentrações de NaCl e NH_3 , indicando a uma faixa de de 8,5 a 11,2% de NaCl (ótimo em torno 9,8%) e 11,0 a 13,5% de NH_3 (ótimo 12,2%) em base seca de levedura.

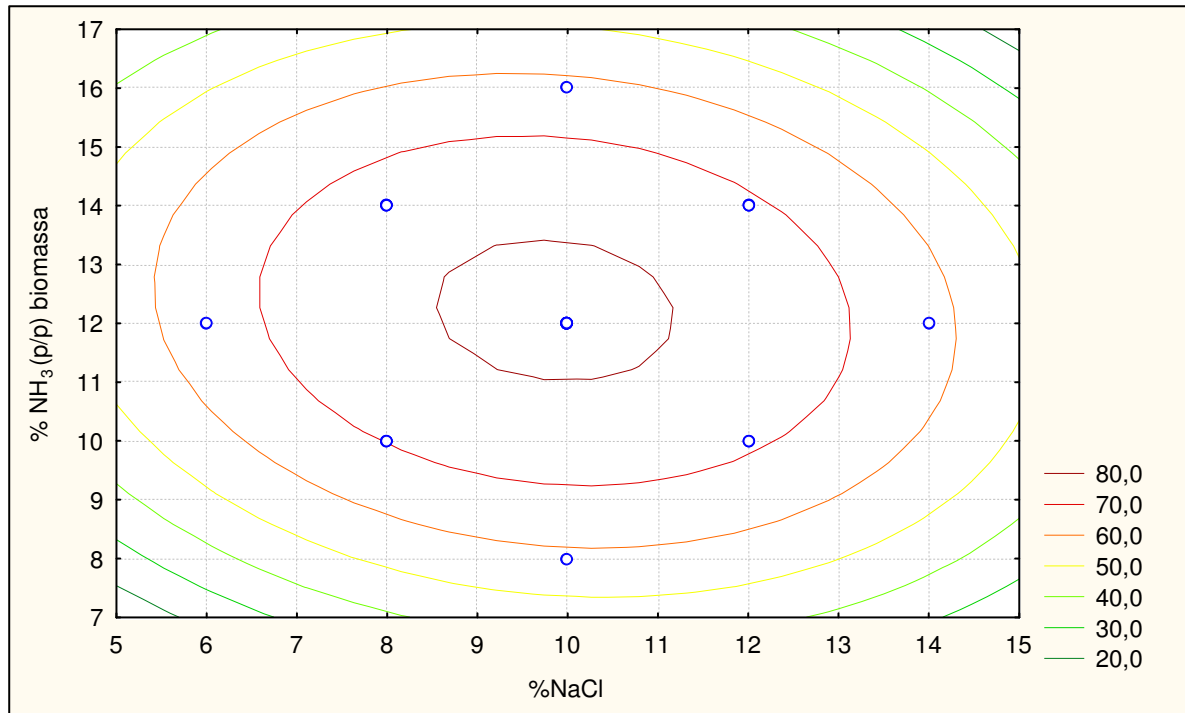


Figura 36. Efeito da porcentagem de NaCl e amônia na extração de RNA da biomassa de levedura (Ensaio IV).

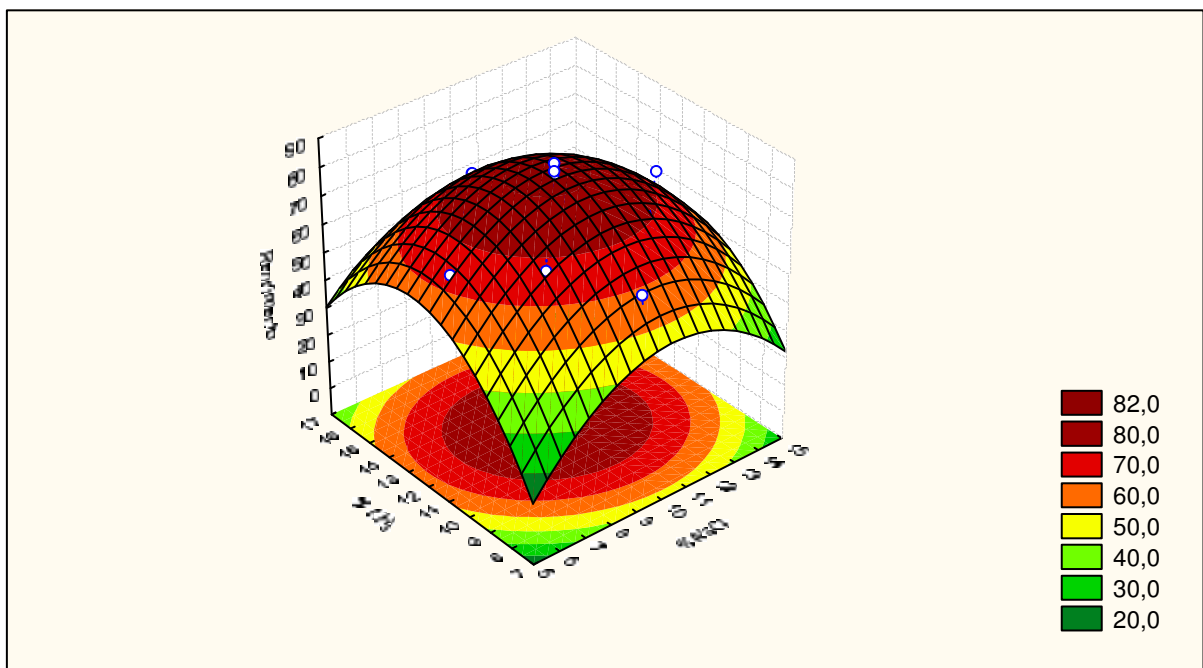


Figura 37. Taxa de extração de RNA da biomassa de levedura em função da porcentagem de NaCl e amônia (Ensaio IV).

A Tabela 43 mostra os resultados experimentais e os correlaciona com os valores preditos gerados experimentalmente por meio do ensaio IV. A menor taxa de extração foi verificada a 45°C, cujo rendimento foi de 47,090% (valor predito) para um resultado experimental de 51,16%. Tais resultados foram alcançados em 24 horas de processo.

O melhor resultado de extração indicado pelo modelo foi de 81,917% (predito) para 79,67 (obtido experimentalmente). O resultado está de acordo com a análise de variância que indica como melhores parâmetros os seguintes valores: temperatura (55,2°C), NaCl (9,8% em massa) e NH₃ (12,2% em massa por 15 minutos a 60°C).

Tabela 43. Valores observados e preditos pelo modelo otimizado.

Experimento	T (°C)	% NaCl	% NH ₃	Observado	Predito*	Resíduo
01	50,0	8,0	10,0	61,54	64,05	-2,51
02	50,0	12,0	14,0	53,19	59,53	-6,34
03	60,0	8,0	14,0	66,30	65,78	0,52
04	60,0	12,0	10,0	63,16	65,77	-2,61
05	55,0	10,0	12,0	79,67	81,91	-2,24
06	50,0	8,0	14,0	68,26	67,03	1,23
07	50,0	12,0	10,0	58,71	60,61	-1,90
08	60,0	8,0	10,0	65,27	60,31	4,96
09	60,0	12,0	14,0	68,31	67,18	1,13
10	55,0	10,0	12,0	84,93	81,91	3,01
11	45,0	10,0	12,0	51,16	47,09	4,07
12	65,0	10,0	12,0	48,31	51,00	-2,69
13	55,0	6,0	12,0	62,19	64,98	-2,79
14	55,0	14,0	12,0	67,11	62,94	4,17
15	55,0	10,0	8,0	58,35	58,01	0,34
16	55,0	10,0	16,0	63,44	62,40	1,04
17	55,0	10,0	12,0	82,53	81,91	0,61

(*) Valores gerados pelo modelo matemático.

A Figura 38 correlaciona os valores obtidos experimentalmente com os dados gerados pelo modelo.

A análise de variância para a resposta “taxa de extração de RNA” apresentou coeficiente de correlação de ($R=0,85956$) e de determinação ($R^2=0,93856$), com um desvio de regressão (*lack of fit*) não significativo (0,2496250), indicando que ambos os modelos gerados a partir do ensaio IV foram adequados.

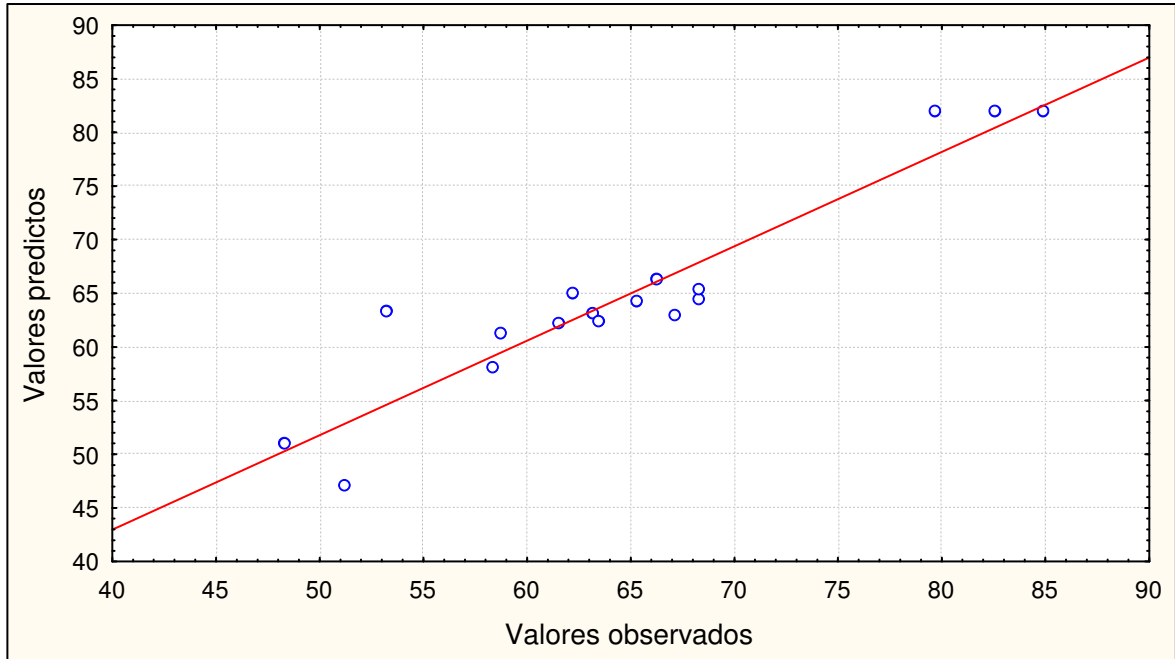


Figura 38. Valores observados e preditos.

A Figura 39 (gráfico de pareto) mostra os efeitos lineares e quadráticos para $p < 0,05$ com um nível de confiança maior que 95%. Ambas as variáveis apresentaram efeitos significativos em relação a extração de RNA da biomassa íntegra.

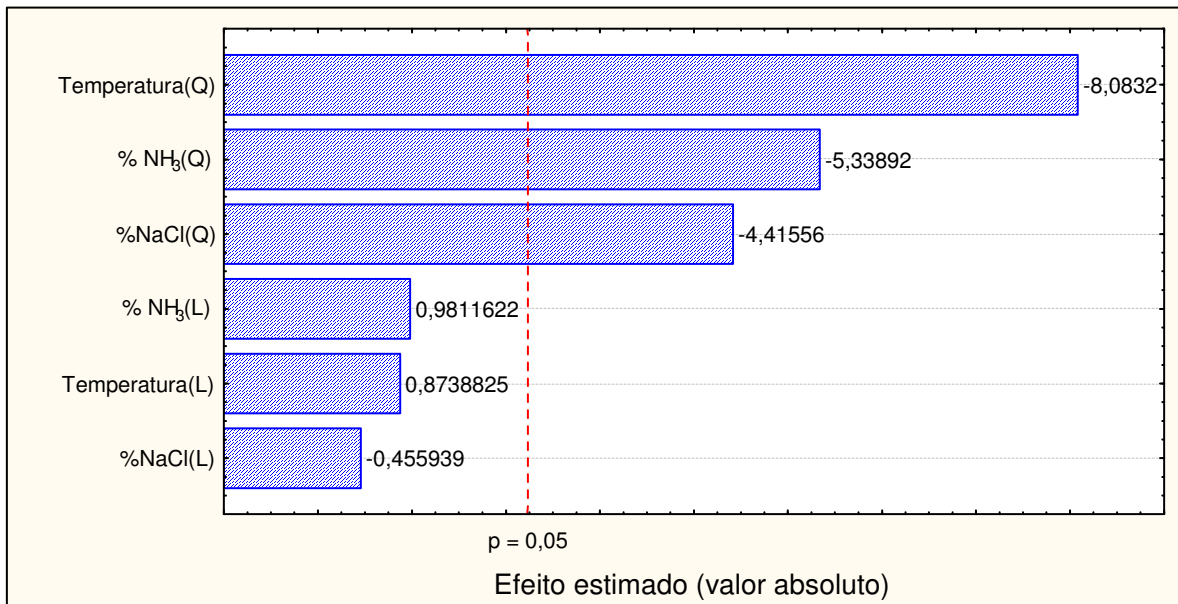


Figura 39. Gráfico de Pareto (efeitos lineares e quadráticos para $p < 0,05$).

Os modelos matemáticos das interações entre as variáveis a) T x NaCl
b) T x NH₃ e c) NaCl x NH₃ são representados a seguir.

1. Modelo matemático T(°C) x %NaCl

$$Z = -1298,7658695652 + 36,568804347825 * x - 0,29558913043478 * x^2 + 35,875516304348 * y - 0,91524456521741 * y^2 - 0,32 * x * y - 0,09149999999991 * 12,0 * x + 0,058750000000055 * 12 * y + 225,020217$$

onde:

z = taxa de extração de RNA da biomassa

x = temperatura (°C)

y = % NaCl

2. Modelo matemático T(°C) x %NH₃

$$Z = -1298,7658695652 + 36,568804347825 * x - 0,29558913043478 * x^2 + 32,550869565213 * y - 1,1499320652174 * y^2 - 0,32 * 10 * x - 0,09149999999991 * x * y + 0,058750000000055 * 10,0 * y + 267,230707$$

onde:

z = taxa de extração de RNA da biomassa

x = temperatura (°C)

y = % NH₃

3. Modelo matemático %NaCl x %NH₃

$$Z = -1298,7658695652 + 35,875516304348 * x - 0,91524456521741 * x^2 + 32,550869565213 * y - 1,1499320652174 * y^2 - 0,32 * 55,0 * x - 0,09149999999991 * 55,0 * y + 0,058750000000055 * x * y + 1117,12712$$

onde:

z = taxa de extração de RNA da biomassa

x = % NaCl

y = % NH₃

A Tabela 44 resume as faixas e os níveis otimizados nos processos circunstanciados por meio dos ensaios I a IV.

Tabela 44. Níveis otimizados para o processo de extração de RNA com o uso de amônia.

Ensaio	Variável	Faixa de ótimo	Ponto de ótimo
I	pH	4,6 -5,6	5,10
	Temperatura	51,5-56,0	53,75
II	Temperatura	49,0-61,0	55,0
	% NaCl	> 8,2	> 8,20
III	Temperatura	52,5-58,5	55,50
	% NaCl	8,7-11,8	10,5
	% NH ₃	>10,2	>10,20
IV	Temperatura	53,0-57,5	55,20
	% NaCl	8,5-11,2	9,80
	% NH ₃	11,0-13,5	12,20

4.2.5. Ensaio V: avaliação cinética nas condições otimizadas

Neste ensaio avaliou-se os processos combinados nas condições otimizadas anteriormente, por um período de 24 horas; entretanto, o NaCl foi adicionado no início da autólise. Este procedimento foi adotado, pois na literatura citada por RED & NAGOWITHANA (1995) o autor afirma que a lise celular inicia-se de dentro para fora da célula, ou seja, por uma diferença de pressão osmótica ocasionada pela alta concentração salina, há maior acesso das endoenzimas líticas à parede celular, acelerando assim o rompimento da parede celular e a liberação dos compostos intracelulares para o meio externo.

A avaliação da extração do RNA foi feita a partir de 8 horas de autólise/plasmólise, perfazendo 24 horas, conforme mostra a Tabela 45. Ao final de cada intervalo foi adicionado a uma alíquota de 100mL do pré-autolisado 12,2% amônia, em massa, visando a extração do RNA remanescente na biomassa. Observou-se que, para um período de 24 horas, a adição de amônia torna-se desnecessária, uma vez que os rendimentos finais do sistema foram praticamente os mesmos.

Tabela 45. Taxa de extração de RNA pelos processos de autólise/plasmólise e hidrólise com NH_3 (Y%).

Respostas dos sistemas	Tempo de autólise/plasmólise					
	8 hs	10 hs	12 hs	14 hs	16 hs	24 hs
Y(%)- autólise/plasmólise	21,16	34,75	47,84	65,41	80,27	89,72
Y(%)- hidrólise alcalina ^(*)	57,24	42,65	36,88	22,58	13,84	3,88
Taxa global de extração	78,40	77,40	84,72	87,99	94,11	93,60

(*) Taxa de extração de RNA da biomassa em meio alcalino (NH_3).

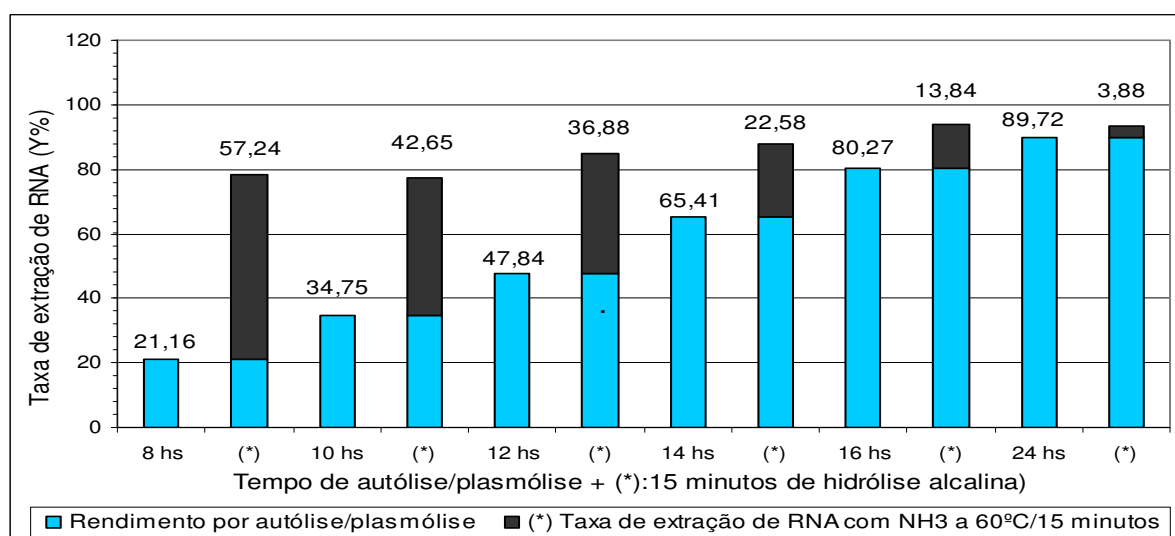


Figura 40. Avaliação cinética da extração de RNA nas condições otimizadas.

A Figura 41 relaciona as taxas de extração de RNA para o processo autólise/plasmólise antes e após a adição de amônia. Observa-se que, à medida que se aumenta o tempo de processo de autólise/plasmólise, embora o rendimento final com amônia seja superior, ao final de 24 horas o rendimento global praticamente torna-se o mesmo, indicando que a adição de amônia só se faz interessante quando se quer reduzir drasticamente o tempo de processo. Talvez a redução do tempo pelo uso da amônia seja irrelevante, uma vez que possa ocorrer uma apreciável perda de proteína. Deve-se considerar também que, pelo processo de autólise, o extrato apresenta qualidade superior em relação ao flavor e capacidade de realçar o sabor do alimento, uma vantagem em relação à hidrólise alcalina, mesmo sendo maior o tempo de processo.

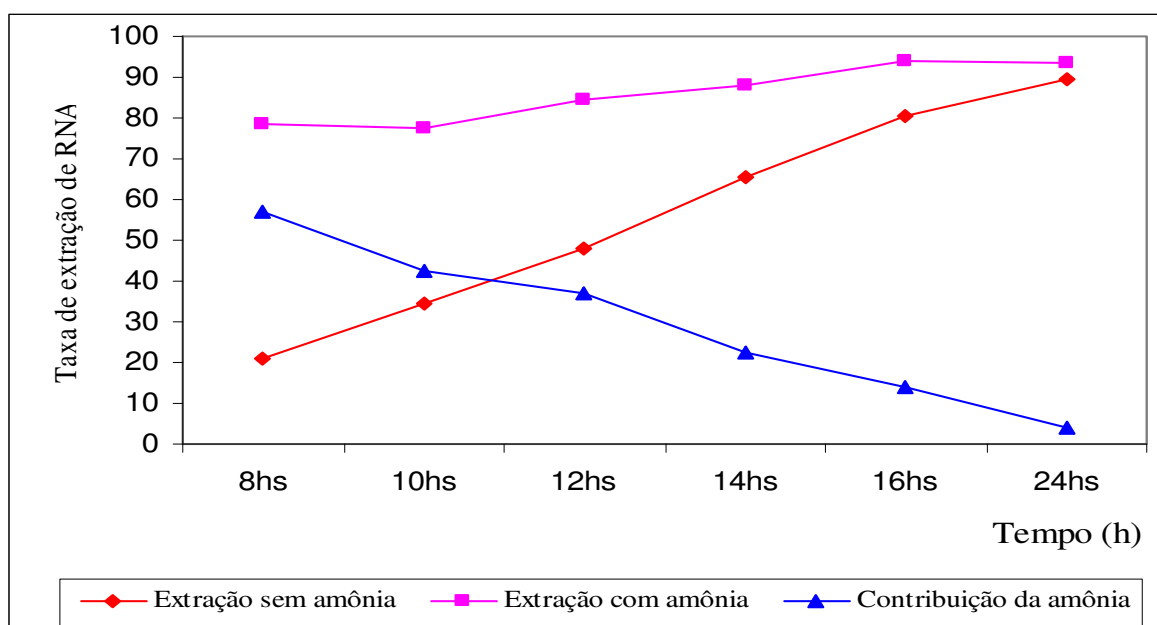


Figura 41: Eficiência da extração de RNA por processos combinados em função do tempo.

4.2.6. Caracterização química e balanço de massa do extrato de levedura autolisado

Para a obtenção do extrato autolisado, as condições aplicadas no processo de rompimento celular foram aquelas concluídas no ensaio IV, como segue:

1. Concentração de levedura em base seca: 15g/100g de suspensão
2. pH: $5,1 \pm 0,1$
3. Temperatura: $55,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
4. NaCl em base seca de levedura: 9,8%
5. Tempo de processo: 24 horas

A Tabela 46 mostra os resultados do balanço de massa das frações de extrato e parede celular assim como sua composição química.

Tabela 46. Composição química da biomassa de levedura de cerveja e balanço das frações de extrato e parede celular obtido por autólise/plasmólise.

Biomassa/frações	Biomassa íntegra	Extrato seco	Parede celular
Massa (g)	100,00	51,30	48,70
Balanço de massa			
Proteína	43,24	29,73	10,60
RNA	9,70	7,27	1,38
Fibra total	28,90	1,23	Nd
Cinza	7,90	8,79	Nd
Nd	10,26	4,28	36,72

Nd: não determinado

O extrato obtido com a utilização de amônia não foi caracterizado quimicamente, mas visualmente, uma diferença significativa de coloração foi observada, conforme mostram as Figuras 42 e 43, provavelmente devido a o escurecimento enzimático.



Figura 42. Coloração do extrato autolisado sem utilização de amônia.



Figura 43. Coloração do extrato autolisado com utilização de amônia.

4.2.7. Recuperação do RNA da biomassa autolisada

Três métodos, descritos no item 3.4.4, foram testados para extração e recuperação do RNA. Método (1): autólise/plasmólise; Método (2): autólise/plasmólise após choque térmico; Método (3): hidrólise alcalina, nas seguintes condições otimizadas:

Temperatura de autólise/plasmólise: 55,20°C

Temperatura de hidrólise alcalina: 60°C/15 minutos

pH de autólise/plasmólise: 5,1

Concentração de NaCl: 9,8% em massa seca de levedura

Concentração de amônia: 12,2% em massa seca de levedura

Tempos de processo: autólise/plasmólise (24 horas), hidrólise química alcalina (15 minutos).

A Tabela 47 fornece a concentração de RNA na biomassa e nas respectivas frações obtidas. O teor de RNA determinado na biomassa de levedura íntegra foi de 6,25% em base seca de biomassa. A menor taxa de recuperação de RNA seco foi observada no método 3, quando se utilizou o meio alcalino. Neste processo recuperou-se apenas 1,20g de RNA com uma pureza de 38,7% de pureza. O baixo grau de pureza deveu-se provavelmente pela hidrólise da molécula do RNA. Os experimento realizados pelos métodos 1 e 2 também apresentaram baixa recuperação de RNA, provavelmente devido a baixa eficiência de precipitação.

Tabela 47. Recuperação do RNA obtido por diferentes métodos de extração: (1) autólise, (2) choque térmico/autólise, (4) hidrólise alcalina.

Métodos de Extração	RNA* na biomassa	Massa de RNA ¹ no sobrenadante pH=4,3	Massa seca obtida* sobrenadante pH=2,0	Pureza do RNA
1	6,25	2,56	1,94	49,85
2	6,25	2,40	1,67	51,70
3	6,25	2,32	1,20	38,70

(¹) Massas em gramas obtidas a partir de 100g de levedura íntegra (b.s). (²): pH=3,5

A Tabela 48 mostra, dentre outros resultados, a taxa de extração de RNA da biomassa que se situou entre 78,80 a 91,40%. O melhor resultado foi obtido pelo método 2, onde utilizou-se o choque térmico seguido da autólise. Em relação à redução de RNA da biomassa os métodos apresentaram resultados próximos na ordem de 37 a 41%. O processo de precipitação fracionada no ponto isoelétrico não foi eficiente, mostrando uma perda de 24 a 30%.

Tabela 48. Porcentagens de extração e recuperação do RNA da biomassa de levedura por precipitação fracionada no pH e etanol 2(v/v).

Método (*)	% de extração de RNA da biomassa	% de recuperação de RNA	Perda de RNA na precipitação
1	87,45	15,47	25,44
2	91,40	13,80	24,48
3	78,80	7,42	29,76

(*) Método de extração: (1) autólise, (2) autólise/fosforilação, (3) choque térmico/autólise, (4) NH₃.

Embora a literatura citada por ANDREU et al. (1987) aponte que é possível a precipitação de RNA em pH=2, verificou-se que a precipitação com decantação ocorre somente quando se faz a adição de etanol (2v) após ajuste pH=2, conforme pode se observar na Figura 44.



Figura 44. Precipitação do RNA com etanol em pH=2,0.

As Figuras 45 e 46 representam respectivamente as curvas-padrão de 5'-IMP (Inosina-5-monofosfato) e 5'-GMP (guanosina-5'-monofosfato) 250 ppm. A fase móvel foi preparada com fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 0,25 M, pH=4,5.

As leituras foram realizadas em 260nm e os tempos de retenção foram de 3,7 minutos para o IMP e 3,8 minutos para o GMP. Desta forma, a concentração desses nucleotídeos foi expressa como (I+G), inosina mais guanosina.

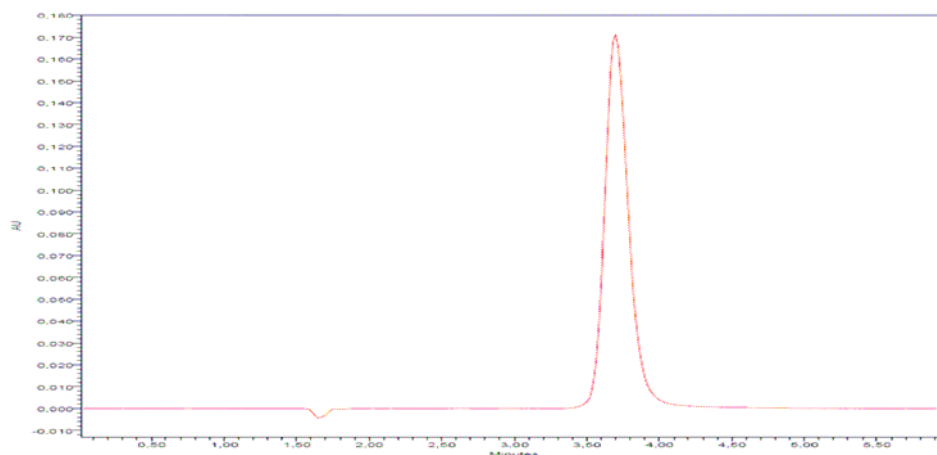


Figura 45. Curva padrão de IMP/250ppm (tempo de retenção 3,7 minutos).

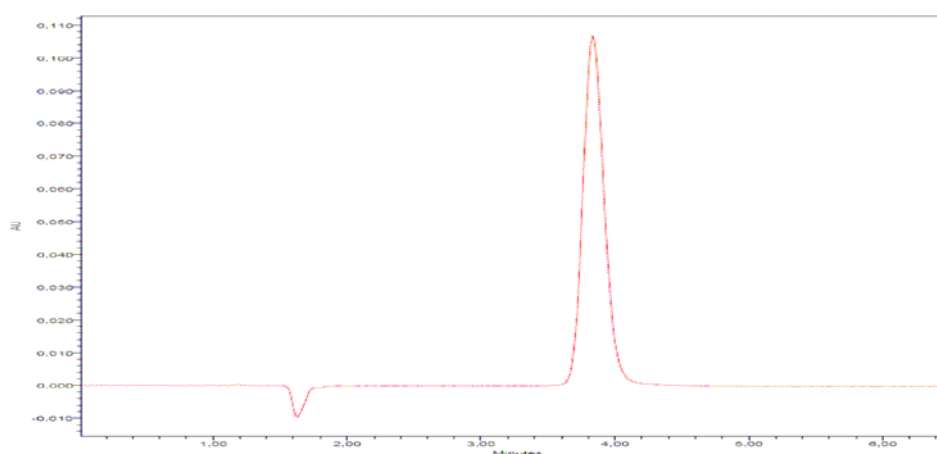


Figura 46. Curva padrão de GMP /250ppm (tempo de retenção 3,8 minutos)

As Figuras 47 a 49 representam respectivamente as análises dos nucleotídeos nos extratos obtidos pelos métodos 1, 2 e 3. Ambos os nucleotídeos GMP e IMP apresentaram tempos de retenção praticamente coincidentes, portanto as porcentagens foram expressos em termos de GMP + IMP. Os resultados determinados foram respectivamente 0,39% (método 1), 1,43 % (método 2) e 0,28% (método 3). Esses resultados mostraram que, por meio do choque térmico é possível obter extratos de levedura com concentrações mais elevadas nestes nucleotídeos, o que pode ser uma alternativa econômica para produção de extratos ricos em 5'-ribonucleotídeos.

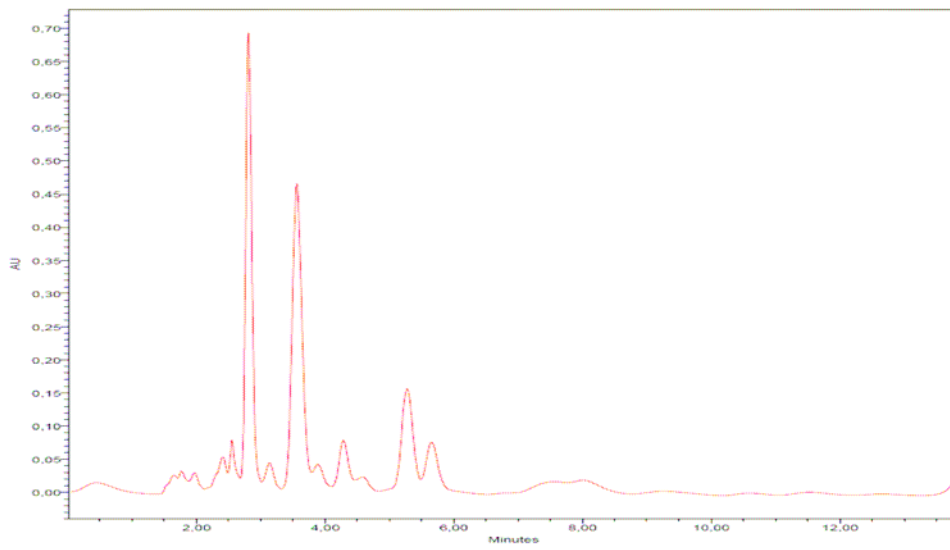


Figura 47. Análise de GMP + IMP (Método 1).

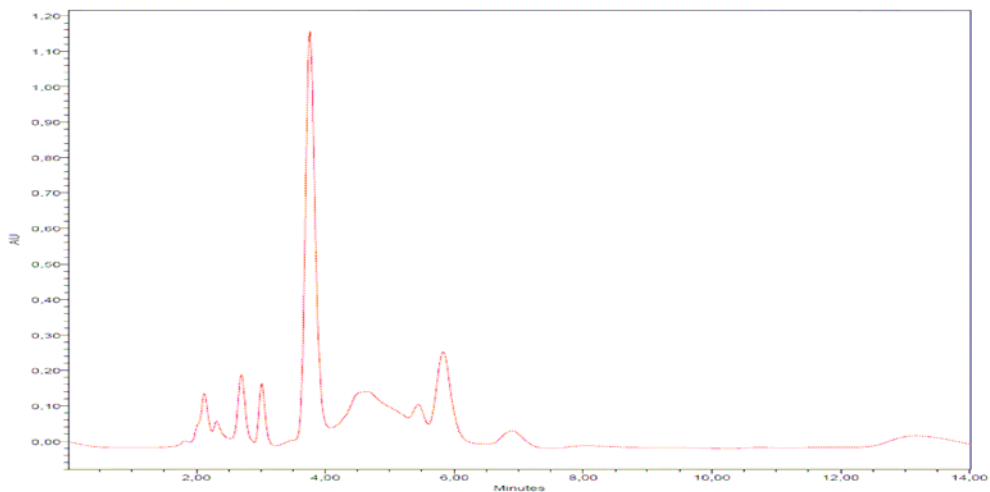


Figura 48. Análise de GMP + IMP (Método 2).

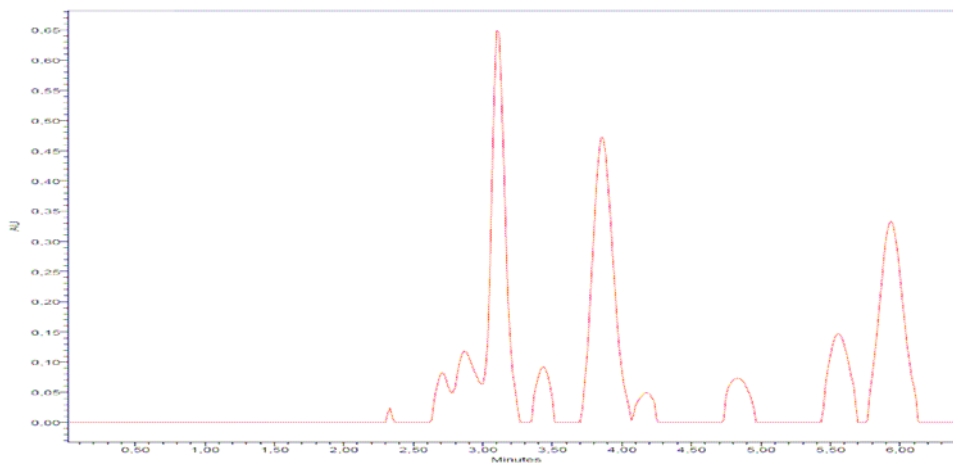


Figura 49. Análise de GMP + IMP (Método 3).

5. CONCLUSÕES

1. A levedura residual de cervejaria consiste numa fonte rica em proteína e ácidos ribonucléicos, sendo que o RNA varia entre 6,5 e 11%.
2. O RNA de levedura foi extraído pelo processo de autólise da biomassa no pH 5,1, 55,2°C e 9,8% de NaCl.
3. A técnica de choque térmico da biomassa a 68°C por 1 minuto antecedendo a autólise, permite maior extração de RNA e maior quantidade de ácidos nucleicos no extrato, o que pode ser aplicado industrialmente para obtenção de um extrato de melhor qualidade para fins comerciais.
4. A extração de RNA com amônia é eficaz e reduz o tempo de processo, porém escurece o extrato e promove a degradação dos ácidos nucleicos.
5. A técnica de autólise com a utilização de NaCl por 24 horas permite rendimento de extração semelhante aquele obtido com amônia, entretanto o processo mais recomendado para uso industrial é a autólise pois evita a perda de proteínas e formação de compostos tóxicos..
6. A extração do RNA proposta neste trabalho abre uma perspectiva de utilização de proteína unicelular de levedura e outras fontes para uso humano.

6. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, R.; ENRIQUEZ, A. Nucleic acid reduction in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.29, 1988.

ALVIM, I. D. et al. Desenvolvimento de farinhas mistas extrusadas à base de farinha de milho, derivados de levedura e caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.2, maio. 2002.

ANDREU, G. et al., A simple method for RNA extraction from yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, n.7, p. 927-29, 1987.

ANGSTADT, C.N. Purine and pyrimidine Metabolism. 1997. Disponível em: <http://www.medli.med.utah.edu/NetBiochem/pupyr/pp.html>. Acesso em: ag. 2006.

A.O.A.C. **Association of Official Agricultural Chemists**. Official methods of analysis. HORWITZ W. (ed), 17th ed., Gaithersburg, Maryland, 2000.

ARAÚJO, K. G. L et al. Influência da ingestão de spirulina (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.

ASSIS, E. M. Componentes da parede celular de leveduras: Proteínas e polissacarídeos de interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos. In: "WORKSHOP": Produção de biomassa de levedura - utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, p. 41-43, 1996.

BALDINI, V. L. et al. Adaptação de metodologia para determinação de ácidos nucléicos em leveduras de cana de açúcar. In: **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, SP. 1999.

BARNETT, J. A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Ress: a short review for non-taxonomists. **Yeast**, v.8, n.1, p.1-23, 1992.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 1995, 299p.

BEHALOVÁ, B. et al. Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. **Acta Biotechnology**, n.11, 1991.

BELEM et al. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Journal of Food Science**, v. 62, n.4, 1997.

BONNEU, M. et al. Direct detection of yeast mutants with reduced viability on plates by erytrosine B staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225-230, 1991.

BOX, G. E. P.; BENKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics: A journal of Washington**, v.2, n.4, p.455-475, 1989.

BOZE, H. et al. Production of food and fodder yeasts. **Critical Review Biotechnology**, v.12, n.1, p.65-86, 1992.

BUENO, G. E. et al. Nucleic acid reduction from yeast activation of intracellular RNase. Department of Biochemistry ICIDCA. Havana, **Acta Biotechnology**, n.5, p.91-100, 1985.

BUNKER, H. J. Sources of single-cell protein. In: MATHELES, R.I. TANEMBAUM, S.R. (ed.). **Single-cell protein**, Cambridge: M.I.T., 1978, v.3, p. 67-78.

BUREN, C. T. V. et al. The role of nucleotides in adult nutrition. **Symposium: Nucleotides and Nutrition**. American Institute of Nutrition, 1994.

BUTOLO, J. E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras fontes nutrientes. In "Workshop": Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos e nutrição aplicada, 1996. p.70.

CABALLERO-CÓRDOBA et al. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp*) e determinação do valor nutritivo da proteína de células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n. 8, p. 102-106, maio/ago., 1997.

CAR, P. R. N. Leveduras como fonte de micronutrientes. Composição e análise de vitaminas. In: "WORKSHOP": produção de biomassa de levedura - utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, 1996. p.28.

CASTELLAN, G. W. **Físico Química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1983. v. 1. Cap. 13, p. 313-315.

CHARPENTIER, C. et al. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. **Applied Microbiology and Biothechnology**, n.24, p. 405-413, 1986.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, abr.-jun. 2006.

CHEN, S. H. et al. Studies on the protein isolates and nucleic acids from brewer's yeast. **Journal Agriculture Chemistry Society**, v. 23, p. 318, 1986.

CONN, H. Umami-The fifth basic taste. **Nutrition & Food Science**, n.2, mar./apr., p. 21-23, 1992.

CORREA, M. F. **Produção de proteína monocelular com baixo teor de ácidos ribonucléicos a partir de *Cândida utilis***. Rio Claro, 1992. 99p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista..

CUNNINGHAM, S. D. et al. Rupture and protein extraction of petroleum-grown yeast. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 732-735, 1975.

CTC. Centro de tecnologia canavieira. Produção de etanol no Brasil. Disponível em: <http://www.zebuparaomundo.com/zebu>. Acesso em: 4 jul. 2008.

DAMODARAM, S. Removal of nucleic acids from yeast nucleoprotein complexes by sufitolysis. **Journal Agricultural Food Chemical**, v.34, n.1, 1986.

DE ROOIJ, J.F.M.; HAKKAART, M.J.J. Yeast extract food flavor. Unilever PLC, Int. Cl. A23 1/28, 1985.

DZIEZAK, J. D. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, v.41, n.2, p.104-121, 1987.

ENEI, H. et al. 5'-Guanosine monophosphate. In: **Comprehensive biotechnology**. The principles applications and regulations of biotechnology in industry agriculture, and medicine. v.3. Murray: Moo-Young, 1985.

FAO/OCDE (2008), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. **Perspectivas sobre a produção de alimentos e o problema da fome no mundo**. Disponível em: <http://br.news.yahoo.com/s/29052008/40/economia-fao-ocde-preveem-fome-no-mundo-escassez-alimentos.html>. Acesso em: jul. 2008.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization. Protein quality evaluation. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Food and Nutrition Paper**, n.51. Rome; 1989. 72p.

FAO/WHO/UNU. Food and Agricultural Organization/World Health Organization -United Nations University. Energy and protein requirements. **Report of the joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report**. Series n.724. Geneva: The United Nations University, 1985.

FARFAN, J. A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v.14, n.1, jan./mar., 1998.

FILHO, W. G. V.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap.4, p.91-144.

FLEURI, L. F. & SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, set./out., 2005.

FRATA, M. T. **Sucos de laranja**: abordagem química, física, sensorial e avaliação de embalagens. Londrina, 2006. 228p. Tese (Doutorado em Ciencia de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Paraná, Brasil.

FUGIMOTO, M. et al. Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*. **Agriculture Biological Chemistry**, v.38, p.777-783, 1974.

GALVEZ, A. et al. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Guatemala, v.40, n.2, p. 252-262, 1990.

GIEC, A. et al. A protein isolate for food by foshphorylation of yeast homogenate. **Food Chemistry**, Washington, v.31, n.4, p. 279-288, 1989.

GUZMAN-JUAREZ, M. Development in foods proteins. **Applied Science Publishers**, p. 339, 1983.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, Boca Raton, 1991, 312p.

HEDENSKOG, G.; EBINGHAUS, J. Reduction of the Nucleic Acid Content of Single-Cell Protein Concentrates. Division of applied biochemistry. **The Royal Institute of Technology**, 1972.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.

HERBERT, D. et al. Chemical analisys of microbiol cells. In: NORRIS, J. R.; RIBBORS, P. W. **Methods of Microbiology**. London, Academic Press, v. 5B, p. 695, 1971.

HOUGH, J. S.; MADDOX, I. S. Yeast Autolysis. **Process Biochemistry**, p. 50-52, may, 1990.

HUANG, Y. T.; KINSELLA, J. E. Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1684-1688, 1987.

HUANG, Y. T.; KINSELLA, J. E. Phosphorylation of yeast protein: reduction of ribonucleic acid and isolation of yeast protein concentrate. **Biothecnology and Bioengineering**, v.25-28, p.16-90-1698, 1986.

HUNTER, J. B.; ANSENJO, J. A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p. 929-943, 1988.

HURST, D. T. An introduction to the chemistry and biochemistry of pyrimidines, purines and pteridines. **John Wiley & Sons Ltd**, p.266. 1980.

IGUTI, A. M. Levedura como fonte de ácidos nucleicos e nucleotídeos: Métodos de produção de nucleotídeos, aplicação em alimentos. In: "WORKSHOP" : produção de biomassa de levedura-utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, p.32-40, 1996.

IIMURA et al. Fatty acids associated with the cell wall in film strains of *Saccharomyces*. **Agricultural Biology Chemistry**. National research institute of brewing, kita-ku, Tokio. N.45, p.1113-1119. 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: O Instituto, 1985. v.1: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos.

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CANA DE AZÚCAR. **Manual de los derivados de la cana de azúcar**. México: GEPLACEA/PNUD, 1988, 225p.

IZZO, H. V.; HO, C. T. Ammonia affects Maillard Chemistry of an Extruded Autolyzed yeast Extract: Pyrazine Aroma Generation and Brown color formation. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, 1992.

JIMENEZ, R.; BADIA, M.; DIAZ, C. Quick procedure for the production of yeast autolysate for a wide range of uses. **Alimentaria**, Madrid, v. 30, n. 245, p. 87-89, 1993.

KELER, R.; MERTEN, S. Process for the preparation of 5'-ribonucleotides. Disponível em: <http://www.freepatensonline.com/46911.html>. Acesso: abr. 2007.

KINSELLA, J. E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In: KNORR, D. **Food biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987. Cap. 14, p.363-391.

KINSELLA, J. E.; SHETTY, K. J. Yeast protein recovery, nutritional and functional properties. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 107, n.5, p. 797-825, 1978.

KITAMURA, K. Re-examination of zymolyase purification. **Agricultural Biological Chemistry Journal**, v.46, p.963-969, 1982.

KNOOR, D. et al. An enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, v.44, n.5, p.1362-1365, 1979.

KOLLAR, R. et al. Induction and acceleration of yeast lysis by addition of fresh yeast autolysate. **Biotechnology Letters**, v. 13, n.8, p.543-546, 1991.

KULKARNI, A. D. et al. Influence of dietary nucleotide restriction on bacterial sepsis and phagocytic cell function in mice. **Journal Applied Physiology**, v.121, 1986.

LAHR-FILHO, D. et al. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: "Workshop": Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos e nutrição aplicada, 1996. p. 59.

LEE, H. Studies on kinetics of inosine 5'-monophosphate instability. **Journal of Food Science**, n.44, 1979.

LERNER, A.; SHAMIR, R. Nucleotides in infant nutrition: a must or an option. **IMAJ**, v.2, n.10, p.772-774, 2000.

LERNER, M. Nucleotides are entering food additive mainstream. **Chemical Marketing Reporter**, v.248, n.19, p.18, 1995.

LEVANDER, O. A. Selenium, chromium and manganese. In: AHIIS, M. D.; VERMON, R.Y. **Modern nutrition in health and disease**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1989. p. 263-267.

LINDBLOM, M. The Influence of Alkali and Heat Treatment on Yeast Protein. Division of applied biochemistry. **The Royal Institute of Technology**, v.16, p. 1495-1506, 1974.

LINDBLOM, M. Properties of intracellular ribonuclease utilized for RNA reduction in disintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Royal Institute of thechnology**, Stockolm, 1977.

LIPINSKY, E. S.; LITCHFIELD, J. H. Single-cell protein in perspective. **Food Technology**, v.28, n.5, p. 16-24, 40, may, 1987.

LITCHFIELD, J. H. Comparative, technical and economic aspect of single-cell protein process. **Advances in Aplied Microbiology**, v.22, p.267-305, 1987.

MAHAN, L. K.; SCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 11ª ed. Tradução de Andrea Favano. São Paulo: Roca, 2005.

MARTINEZ, A. O. et al. Dietary nucleotides may influence the humoral immunity in immuno compromised children. **Nutrition**, v.13, n.5, p.465-469, 1997.

MATHEIS, G. Phosforilation of food proteins with phosphorus oxychloride-improvement of functional and nutritional properties: A Review. **Food Chemistry Barking**, v.39, n.1, p.13-26, 1991.

MATOBA, T. et al. Thermal degradation of flavor enhancers, inosine 5'-monophosphate, and guanosine 5'-monophosphate in aqueus solution. **Journal of Food Science**, v.53, n. 4, p. 1156-1170, 1988.

McCORNICK, R. Uncoventional protein sources diversity development choises. **Prepared Foods**, v.156, n.12, p.135-136, 1987.

MESSINA, M. Modern aplications for na ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. **Journal Nutrition**, p.125, 1995.

NAKAO, Y. Microbial Production of Nucleosides and Nucleotides. In: **Microbial Technology**, 2. ed., v.1. N.Y: Academic Press, 1979. Cap. 10, p. 311-354.

NAND, K. Debittering of spent brewer's yeast for food purposes. **Die Nahrung**, v.31, n.2, p. 127-131, 1987.

NAS. National Academic of Science. **Recomended Dietary Allowances**. 10. ed. Washington: National Academic Press, 1989.

NELSON, D. L.; COX. M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000. Cap. 2 e 4, p. 13 e 57.

NEWELL, A. J. et al. **Isolated yeast ptoein product with intact RNA and process for making same**. US Patent 3888839, nov., 1972.

NÓBREGA, F. J. **Desnutrição ultrainterina e pós-natal**. 2. ed. São Paulo: Panamed, 1985.

OLIVEIRA, A. M. **Determinação das melhores condições de extração de proteínas de levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Londrina, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Paraná, Brasil.

OLIVEIRA, A.M; CASTRO GÓMEZ, R.J. **Otimização da extração de proteínas de levedura *Saccharomyces cerevisiae***. SEMINA. Universidade Estadual de Londrina. P. 521-534, 2005.

OLIVEIRA, S. S. **Otimização dos parâmetros para processamento de extrato de levedura**. Rio Claro, 2002. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, Brasil.

PACHECO, M. T. B. Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de leveduras (*Saccharomyces sp.*) obtidos por diferentes processos de extração. Campinas, 1996. 158p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

PEIXOTO, N. Processamento de Produtos de Biomassa de Levedura para Alimentação Humana: Potencial, Mercado Interno e Externo. In: "WORKSHOP": produção de biomassa de levedura-utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, 1996. p.90.

PENY, C. Rinsing prospecties for yeast products. **Food Ingredients & Procesing International**, n.10, p.18-21, 1991.

PESSOA Jr, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

REED. G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast Technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 369-445.

REED. G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Savory Flavors**. New York: Estiekay Associates, 1995.

REIHOLD, K. United States Patent 4649111. **Process for the preparation of 5'-ribonucleotides**. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4649111.htm>. Acesso em: jan. 2005.

RÉVILLION, J.P.P; PIBERNAT,C.C. Utilização de extratos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinhos espumantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, n.3,p. 196-205, 1996.

RÉVILLION, J. P. et al. Produção de extrato de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, maio/ago., 2000.

ROCHA-FILHO, R. C. Canais de água e de íons: processos da vida na escala molecular. **Química Nova na Escola**, n.18, nov., 2003.

ROSSI, P. et al. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.05-12, jan./mar., 2007.

ROSÁLEZ, F. H. Yeast protein source for human nutrition. A review. **Acta Microbiologica Academical Scienntirum Hungaricae**, Budapest, v.31, n.3, p.159-172, 1984.

RUDOLPH, F. B. et al. Role of RNA as a dietary source of pyrimidines and purines in immune function. **Nutrition**, v.6, n. 1, jan./febr., 1990.

RUTZ, F. et al. Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de leveduras na dieta. **Ciência animal Brasileira**, v.7, n.4, p. 349-355, out./dez. 2006.

SANTUCCI, M. C. C. et al. Efeito do enriquecimento de biscoitos tipo água e sal, com extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3. Campinas, set. 2003.

SARWAR, G. et al. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, v.50, p.353-357, 1985.

SATO, S.; LIMA, U. A. Proteínas de origem microbiana. In: **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.4, Cap.15, p.421-445.

SCOTT, J. H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Jounal of bacteriology**, v.142, p. 414-423, 1980.

SERZEDELLO, A. et al. Estudos sobre obtenção de levedura alimentar em substratos de vinhaça. *Revista Agricultura*, v.45, n.1, p.22-27, 1970.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela, 1996. Cap. 1-2. p. 9-257.

SGARBIERI, V. C. et al. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces sp.*) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. **Brazillian Journal Food Technology**, n.2, p.119-125, 1999.

SHETTY, K. J.; KINSELLA, J. E. Preparation of yeast protein isolate with low nucleic acid by succinylation. **Journal of Food Science**, v.44, 1979.

SHETTY, K. J.; KINSELLA, J. E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylation reagent: some properties of the isolated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, n. 6, p. 1166-1971, 1982.

SINDCERV. Sindicato nacional da indústria da cerveja. Produção mundial de cerveja. Disponível em <http://www.google.com.br/search?hl=pt-BR&q=sindcerv&meta=>. Acesso em julho de 2008.

SNYDER, H. E.; KNOW, T. W. **Soybean utilization**. New York: Van Nostrand Reinold, 1987.

SOMBUTYANUCHIT, P. et al. Preparation of 5'-GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, mar. 2001.

SUGIMOTO, H. et al. United States Patent. **Process for autolysis of yeast**. Int. Cl². A23/L 1/28; C12C 11/34, 1973.

SUNG, H. et al. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. **Journal of Food Science**, v.48, n.3, p.716-721, 1983.

TANEKAWA, T. et al. United States Patent. **Production of yeast extract containing flavoring**. Int. Cl³. A23L 1/28; A23L 2/26; C12N 1/06; C12N 1/08, 1981.

TAVARES, V. B. et al. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v.21, p. 722-725, 1998.

VALENTÍN et al., Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**. n. 148, p. 88-94.

VANANUVAT, P.; KINSELLA, J. Preparation of succinylated yeast protein: composition and solubility. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 20, n. 9, p. 1329-1344, 1978.

VILELA, E. S. D. et al. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista Nutrição**. Campinas, v.13(3), p. 185-192, set./dez., 2000.

WOODART, C. J.; SHORT, D. D. Toxicity of álcali-treated soybean in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, n.103, p. 569-574, 1973.

XAVIER, E. G. et al. Cuidados críticos na nutrição inicial de aves: alternativas para melhorar o desempenho e o papel essencial dos nucleotídeos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.4, 2005.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, out./dez, 2003.

YAMAUCHI, K. et al. Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. **Journal Applied Physiology**, n. 93, p.161-166, 2002.

Anexo

Curva-padrão de ácido ribonucléico

O teor de RNA na biomassa íntegra de levedura e nos derivados foi determinada pela técnica de HERBERT et al. (1971), cujo princípio baseia-se no fato de que a ribose é convertida a furfural durante tratamento ácido a quente, produzindo complexo de cor esverdeada pela reação com orcinol. No cálculo da concentração utilizou-se a curva-padrão representada na Figura 21, baseada nos resultados da Tabela 34.

Tabela 34. Curva-padrão de RNA (absorbâncias x concentração do padrão).

Tubo n°	mL (padrão)	mg RNA (na amostra)	Absorbância (670nm)
00	0,0	0,00	0,016
01	0,1	0,01	0,092
02	0,2	0,02	0,182
03	0,3	0,03	0,277
04	0,4	0,04	0,415
05	0,5	0,05	0,495
06	0,6	0,06	0,598
07	0,7	0,07	0,697
08	0,8	0,08	0,815
09	0,9	0,09	0,907
10	1,0	0,10	1,000

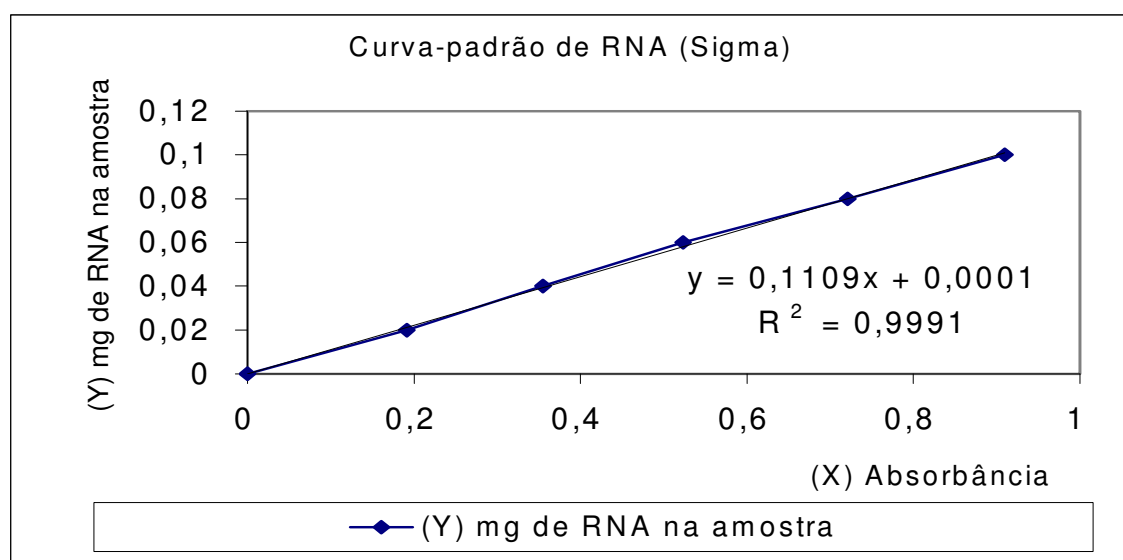


Figura 21. Curva-padrão de RNA purificado (Sigma).

Diluições do extrato tornaram-se necessárias visando obter leituras adequadas de absorbância e evitar erros analíticos previstos pela Lei de Lambert Beer.

A curva-padrão, preparada com RNA purificado Sigma (Ribonucleic acid from baker's yeast - *Saccharomyces cerevisiae* - type III), apresentou coeficiente de regressão linear 0,9991 e é representada pela equação linear $Y = 0,1109X + 0,0001$. Para o cálculo das massas de RNA inseriram-se na equação da curva-padrão as seguintes variáveis: a) volume total de extrato autolisado (V_E); b) o volume de extrato diluído utilizado na leitura da absorbância (V_L); c) o fator de diluição do extrato (F_d); d) o peso da biomassa em grammas utilizada na autólise (p_a).

As diluições do extrato situaram-se ente 10 e 100 vezes, de forma a se obter leituras de absorbâncias adequadas.

Da equação original da regressão linear, $Y = 0,1109X + 0,001$, a equação gerada para cálculo da massa de RNA é:

$$(Y) = \frac{(0,02218) \times (\text{Abs}) \times (F_d) \times (V_E)}{(p_a \times V_L)}$$

Onde:

Y = massa em grama de RNA

0,02218 = fator gerado do modelo de regressão linear da curva-padrão

Abs = absorbância de leitura a 670nm

F_d = Fator de diluição de extrato bruto líquido

V_E = volume total de extrato líquido obtido na autólise

P_a = peso da amostra de levedura em base seca

V_L = volume utilizado na leitura da absorbância (0,0 a 1,0 mL)

$$(Y\%) = \frac{Y_E}{Y_M} \times 100$$

Onde:

$Y\%$ = taxa de extração de RNA (gRNA obtido no extrato/g de RNA na biomassa íntegra)

Y_E = massa de RNA presente no volume total do extrato obtido

Y_M = massa de RNA presente na biomassa íntegra total em base seca