Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

JARLEY VAZ DA SILVA

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO EM MASSA DE EXTRATO DE LEVEDURA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH E TEMPERATURA DE AUTÓLISE

Assis
2010

Av. Getúlio Vargas, 1200 – Vila Nova Santana – Assis – SP – 19807-634.
Fone/Fax: (0XX18) 3302 1055 homepage: www.fema.edu.br

JARLEY VAZ DA SILVA

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO EM MASSA DE EXTRATO DE LEVEDURA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH E TEMPERATURA DE AUTÓLISE

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Profª. Ms. Gilcelene Bruzon
Área de Concentração: Química

Assis
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Jarley Vaz

Avaliação do rendimento em massa de extrato de levedura em função da variação do pH e temperatura de autólise / Jarley Vaz da Silva. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2010.

75 p.

Orientador: Gilcelene Bruzon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Extrato de levedura. 2.Autólise.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO EM MASSA DE EXTRATO DE LEVEDURA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH E TEMPERATURA DE AUTÓLISE

JARLEY VAZ DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Profª. Ms.Gilcelene Bruzon
Analisador: Profª. Dra. Mary Leiva de Faria

Assis
2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, amigos e professores que me ajudaram nos momentos mais difíceis, demonstrando apoio, carinho e afeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, José e Terezinha e meus irmãos Tatiane e Leandro, que me ajudaram e incentivaram a seguir em frente.

Aos meus Amigos Rando, Luiz César, Graciele, Pamela e Ana Paula, pelo apoio e carinho.

Aos professores e colegas de curso, pelos conhecimentos transmitidos esses anos.

A minha orientadora Gilcelene Bruzon, pela dedicação ao término desta conquista.

À banca examinadora.

Em especial, ao Professor e amigo Dr. Antonio Martins Oliveira, pelo seu esforço, competência e dedicação.

Aos demais amigos e professores, pessoas boas que encontrei em minha vida.

A todos que, com boa intenção contribuíram para a realização deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein
(1879-1955)

RESUMO

Este trabalho visou um estudo detalhado sobre a maximização da produção do extrato de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato de levedura é um aditivo proteico amplamente utilizado para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos como sopas desidratadas, bolachas, *Snacks* e outros. É obtido industrialmente pelo processo de autólise da levedura e secagem da fração solúvel por *"spray dryer",* podendo ser utilizada em sua produção uma cultura pura de leveduras ou biomassa de recuperação. A autólise é um processo irreversível e ocorre devido à ação de enzimas endógenas da levedura, que submetidas á condições específicas de pH, temperatura e concentrações de sais, ocasionam o rompimento celular, liberando a fração solúvel interna da célula, denominado extrato de levedura. O objetivo deste trabalho foi avaliar as melhores condições de pH e temperatura para a maximização da produção do extrato de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*. As suspensões contendo a biomassa de levedura foram submetidas á autólise em banho-maria por um período de 32 horas com variações de pH 4,5, 5,5 e 6,5 e temperaturas 54, 55 e 56ºC e o extrato solúvel foi seco em estufa á 70ºC. A melhor faixa de temperatura compreendeu-se entre 53,3 a 54,6°C, sendo a temperatura ótima 53,9ºC. A melhor faixa de pH compreendeu-se entre 4,9 e 6,1, sendo o pH ótimo 5,5. Nas condições ótimas, o rendimento máximo de extrato obtido estatisticamente foi de 58% de extrato de levedura seco, sendo estes dados do processo otimizados pelo *software Statística 8.0*.

Palavras-chave: Extrato de levedura; Autólise.

ABSTRACT

This work was a detailed study on the maximization of production of the baker's yeast extract *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast extract is a protein widely used additive to the enhancement of flavors and complement the nutritional value of foods such as dehydrated soups, biscuits, snacks and others. It is obtained industrially by the process of yeast autolysis and drying the soluble fraction of spray dryer, which can be used in its production a pure culture of yeasts or biomass recovery. The autolysis is an irreversible process and due to the action of endogenous enzymes of yeast, which will undergo specific conditions of pH, temperature and salt concentrations, cause the cell disruption, releasing the soluble inside the cell, called yeast extract. The aim of this study was to evaluate the best conditions of pH and temperature to maximize the production of the baker's yeast extract *Saccharomyces cerevisiae*. The suspensions containing the biomass were submitted to the yeast autolysis in a water bath for a period of 32 hours with variations of pH 4.5, 5.5 and 6.5 and temperatures 54, 55 and 56 ° C and the soluble extract was dried at 70 ° C. The best temperature range is comprised between 53.3 to 54.6 ° C and the optimum temperature of 53.9 º C. The best pH range is comprised between 4.9 and 6.1, and the optimum pH 5.5. Under the optimum conditions, the maximum yield of extract obtained was statistically 58% dry yeast extract, and these process data optimized by the software *Statistica 8.0*.

Keywords: Yeast extract; Autolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura geral de uma célula de levedura.....	18
Figura 2	Reprodução da célula de levedura Saccharomyces cerevisiae.....	20
Figura 3	Via de degradação de ácidos nucleicos pelo organismo humano..	26
Figura 4	Estrutura da parede celular de levedura	36
Figura 5	Hidrólise enzimática da β-1,3 glucana.....	38
Figura 6	Hidrólise enzimática da quitina.....	39
Figura 7	Hidrólise enzimática da manoproteína.....	40
Figura 8	Estrutura química das bases nitrogenadas.....	45
Figura 9	Estrutura genérica de um nucleotídeo.....	46
Figura 10	Nucleotídeo e seus respectivos nucleosídeos.....	47
Figura 11	Deaminação enzimática do AMP à IMP	48
Figura 12	Determinação da viabilidade celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.....	53
Figura 13	Autólise de levedura Saccharomyces cerevisiae em banho-maria.	62
Figura 14	Suspensões de levedura após processo de autólise e plasmólise.	62
Figura 15	Secagem do extrato de levedura após a autólise e plasmólise.....	63
Figura 16	Extrato de levedura após secagem em estufa a 70ºC	66
Figura 17	Curva padrão dos rendimentos do extrato de levedura (Valores preditos x Valores observados).....	67
Figura 18	Rendimento de extrato em função da temperatura e pH de autólise. Tempo de autólise e plasmólise: 32 horas.....	69
Figura 19	Superfície de resposta da produção do extrato de levedura Tempo de autólise e plasmólise: 32 Horas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de cerveja no Brasil e em alguns países do mundo.....	22
Tabela 2	Composição química de leveduras de cervejaria e destilaria.....	23
Tabela 3	Teores de RNA em algumas espécies de levedura.....	23
Tabela 4	Concentração de vitaminas em leveduras.....	24
Tabela 5	Composição química de derivados de levedura de cerveja obtida por autólise.....	29
Tabela 6	Composição de aminoácidos de alguns derivados de levedura de cervejaria.....	30
Tabela 7	Consumo per capita domiciliar de realçadores de sabor por classe de produtos industrializados no ano de 2000.....	31
Tabela 8	O mercado de extratos de levedura no Brasil.....	31
Tabela 9	Consumo de flavorizantes na Europa em 1996.....	32
Tabela 10	Dosagem de biomassa proteica em alimentos nos Estados Unidos.....	32
Tabela 11	Fracionamento dos componentes da parede celular de levedura semipurificada, obtida por processo de autólise industrial.....	36
Tabela 12	Percentual de IMP e GMP em extrato levedura Saccharomyces cerevisiae em diferentes temperaturas.....	48
Tabela 13	Produção de nucleotídeos e nucleosideos.....	49
Tabela 14	Níveis de aplicação de nucleotídeos em alguns alimentos.....	50
Tabela 15	Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem animal.....	51
Tabela 16	Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem vegetal.....	51
Tabela 17	Delineamento realizado pelo *software Statistica 8.0*.....	64
Tabela 18	Percentual de matéria seca da biomassa de levedura prensada.	65

Tabela 19 Rendimento da produção do extrato na autólise da levedura (Análises feitas em duplicata). Tempo de autólise e plasmólise: 32 horas..... 66
Tabela 20 Análise de significância das variáveis pH e temperatura..... 68

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO..... .....**	**15**
2.	**O PROBLEMA DA FOME NO MUNDO E AS PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DE ALIMENTO.....**	**17**
3.	**LEVEDURAS.....**	**18**
3.1	MULTIPLICAÇÃO CELULAR DA LEVEDURA.....	19
3.2	LEVEDURAS, DERIVADOS E SUA INTRODUÇÃO NA DIETA HUMANA.....	20
3.3	BIOMASSA DE LEVEDURA E UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL.....	21
3.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE LEVEDURAS.....	22
4.	**O VALOR NUTRICIONAL DA PROTEÍNA DE LEVEDURA..**	**25**
4.1	PROTEÍNAS DE ORIGEM MICROBIANA E SUAS RESTRIÇÕES NA DIETA HUMANA.....	25
5.	**EXTRATO DE LEVEDURA.....**	**28**
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE LEVEDURA.....	29
5.2	O MERCADO DE EXTRATOS DE LEVEDURA.....	30
5.3	PROCESSOS DE OBTENÇÃO INDUSTRIAL DO EXTRATO DE LEVEDURA.....	33
6.	**O PROCESSO DE AUTOLISE.....**	**35**
6.1	CONSTITUIÇÃO DA PAREDE CELULAR DA LEVEDURA.....	35
6.2	PROCESSO DE LISE ENZIMÁTICA DA LEVEDURA.....	37
6.3	EFEITO DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE AUTÓLISE.....	41
6.4	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE AUTÓLISE.....	41
6.5	EFEITO DO PH NO PROCESSO DE AUTÓLISE.....	43
7.	**PLASMÓLISE.....**	**44**

8. ACIDOS NUCLEICOS, NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS..... 45
8.1 RNA, NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS NA APLICAÇÃO INDUSTRIAL..... 47
8.2 IMPORTÂNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO..... 50
9. VIABILIDADE CELULAR..... 52
10. APLICABILIDADE DO CONCEITO DE PH E TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS PARA ALUNOS DO ENSINO MÉDIO 54
10.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS..... 55
10.1.1 Materiais 55
10.1.2 Procedimento experimental..... 56
10.1.2.1 Copinho 1..... 56
10.1.2.2 Copinho 2..... 56
10.1.2.3 Copinho 3..... 56
10.1.2.4 Copinho 4..... 56
10.1.2.5 Anotações..... 57
10.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO PH NO CRECIMENTO DE MICRORGANISMO..... 57
10.2.1 Materiais 57
10.2.2 Procedimento experimental..... 57
10.2.2.1 Copinho 1..... 57
10.2.2.2 Copinho 2..... 57
10.2.2.3 Copinho 3..... 58
10.2.2.4 Anotações..... 58
10.3 METODOS DE AVALIAÇÃO..... 58
10.4 QUESTIONÁRIO EXPERIMENTO 1: EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS..... 59

10.5 QUESTIONÁRIO EXPERIMENTO 2: EFEITO DO PH NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS..... 59
11. METODOLOGIA..... 60
11.1 MATERIAIS E REAGENTES..... 60
11.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... 60
11.2.1 Delineamento experimental..... 60
11.2.2 Viabilidade celular da levedura..... 60
11.2.3 Determinação do percentual de matéria seca da biomassa da levedura..... 61
11.2.4 Processos de autólise e plasmólise..... 61
11.2.5 Centrifugação do autolisado total..... 63
11.2.6 Secagem do extrato de levedura..... 63
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 64
12.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 64
12.2 VIABILIDADE CELULAR..... 64
12.3 PERCENTUAL DE MATÉRIA SECA DA BIOMASSA DA LEVEDURA..... 65
12.4 RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DO EXTRATO APÓS AUTÓLISE..... 65
12.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 67
13. CONCLUSÃO..... 71
REFERÊNCIAS..... 72

1. INTRODUÇÃO

O extrato de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* é um aditivo proteico amplamente utilizado para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos como sopas desidratadas, bolachas, *Snacks* e outros (PACHECO, 1996). É constituído por 40 a 45% de proteínas e frações menores de aminoácidos, fibras, lipídeos, vitaminas do complexo B, ácidos ribonucleicos, nucleotídeos e nucleosídeos (SGARBIERI et al., 1999). É obtido industrialmente pelo processo de autólise e secagem da fração solúvel por "*spray dryer*" utilizando-se uma cultura pura de leveduras ou biomassa recuperada de processos fermentativos (CHAUD; SGARBIERI, 2006).

A autólise é um processo irreversível e ocorre pela ativação de enzimas endógenas, especialmente a glucanase, manase e quitinase que em condições específicas de pH e temperatura provocam o rompimento celular e consequentemente a liberação dos compostos intracelulares solúveis denominado extrato de levedura (OLIVEIRA; CASTRO-GÓMEZ, 2005). Existem vários processos para a produção de extratos de levedura, mas o mais utilizado industrialmente é a autólise e sua produtividade depende de importantes fatores como temperatura, pH, idade da cultura e presença de sais em solução (REED; NAGOWITHANA, 1991). Em condições controladas, o êxito da solubilização proteica e a obtenção de um produto organolepticamente aceitável, depende do efeito simultâneo de fatores tais como pH, temperatura e tempo. Se não aplicadas com máxima eficiência e controle, estas condições poderão levar a inativação das enzimas intracelulares, resultando em um processo de autólise pouco eficaz (JIMENEZ; BADIA; DIAZ, 1993).

A literatura menciona várias condições de pH e temperatura para autólise de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em estudos realizados por Oliveira e Castro-Goméz (2005); Oliveira e Oliva-Neto (2008), uma alta taxa de extração de proteínas de levedura pode ocorrer numa faixa de pH 3,8 á 5,0 numa temperatura de 53 a 55ºC. Por outro lado Tanekawa et al. (1981) mostram que para valores de pH acima

de 6,5 no processo de autólise há significante redução da produtividade em massa de extrato. Entretanto, verifica-se maior concentração de nucleotídeos em relação a um processo de autólise realizado em pH entre 4,5 e 5,5. Analisando a literatura, foi necessário um estudo mais detalhado sobre a melhor faixa de pH e temperatura para maximizar o rendimento da produção do extrato no processo de autólise da levedura de panificação.

O Brasil é o maior produtor mundial de levedura de panificação (OLIVEIRA, 2001). Atualmente tem havido um grande aumento na produção de extratos de levedura destinados à indústria alimentícia e rações para produção de aves de corte, suínos e peixes (RUTZ, 2006). As leveduras mais utilizadas para este fim tem sido a biomassa residual da produção de cerveja e etanol (OLIVEIRA e OLIVA-NETO, 2008). Devido a grande importância do extrato, algumas empresas brasileiras têm mostrado interesse pela utilização de culturas puras de levedura visando obter produtos de qualidade mais elevada. O processo envolve maiores custos, entretanto, justifica a escolha da levedura prensada de panificação para a produção do extrato, uma vez que apresenta grau alimentício e já possui aplicação na indústria de panificação.

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de extrato de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes faixas de pH e temperatura, por meio da metodologia da superfície de resposta segundo Box e Behnken (1989), sem considerar a concentração de nucleotídeos e hidrólise da molécula de RNA.

2. O PROBLEMA DA FOME NO MUNDO E AS PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DE ALIMENTO

No ano de 2010, relatórios apresentados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), previram uma grande perspectiva em faltar alimentos no mundo, devido ao aumento nos preços dos produtos alimentícios. Os relatórios destacaram ainda que cerca de 1bilhão de pessoas sofrem com a fome no mundo, sendo a maioria de países mais pobres e/ou menos subsidiados.

Com o aumento no preço e o esgotamento dos combustíveis fósseis, a probabilidade da utilização de fontes alternativas para produção de energia, como o biocombustível, será um dos possíveis métodos a serem adotados pela sociedade. Como consequência, haverá considerável redução na oferta destes produtos destinados à alimentação humana, podendo haver um considerável aumento de pessoas com indícios de desnutrição no mundo (FAO/OCDE, 2010).

Com o crescimento populacional e o aumento da demanda de alimentos, possíveis estudos vêm sendo realizados para suprir as necessidades de nutrientes na dieta humana, tendo destaque o aproveitamento da matéria-prima e os seus derivados como subprodutos durante a produção em escala industrial (FARFAN, 1998).

Oliveira (2001), relata como grande alternativa a reutilização de produtos de origem microbiana como fonte de proteínas na alimentação humana, devido o seu alto poder nutricional, destacando a utilização da biomassa de leveduras, por ser utilizada e produzida em grande escala industrial, podendo ser obtida como subprodutos destes processos.

3. LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos eucariotos utilizados em processos fermentativos caseiros e industriais. Sua estrutura é constituída por parede celular, membrana celular e núcleo. 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 figura 1 representa a estrutura geral de uma célula de levedura.

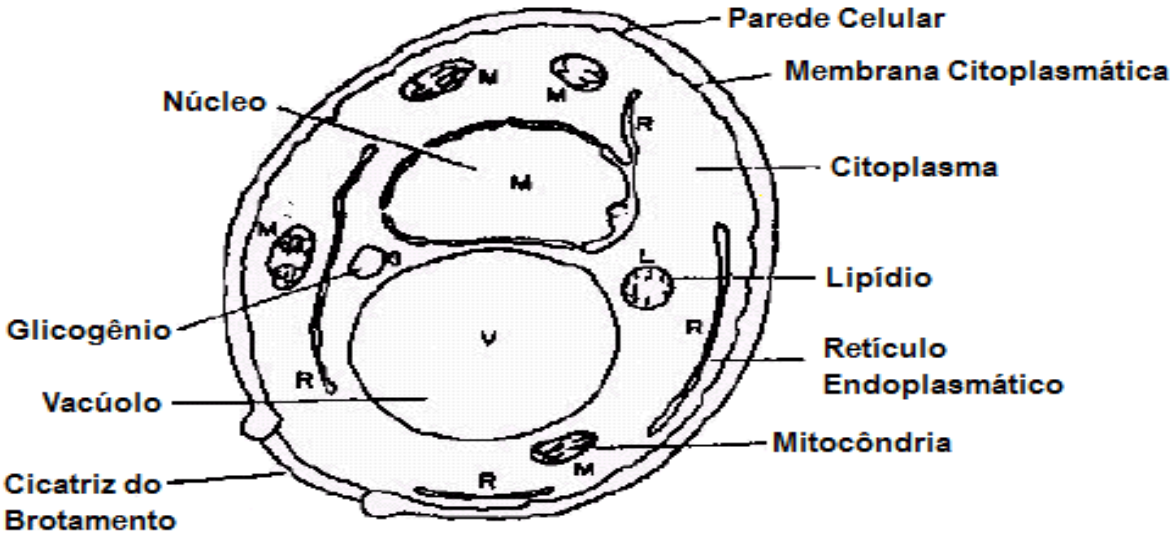


Figura 1 - Estrutura geral de uma célula de levedura (In: ANTONINI, 2004, p.10).

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). 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). No núcleo encontram-se os ácidos nucleicos constituídos em maior parte por RNA e têm variações quantitativas de acordo com a espécie, gênero, condições de desenvolvimento e crescimento da levedura, tendo variabilidade de 8 a 12% (BUNKER, 1978). A levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo muito utilizada devido a sua imensa facilidade de multiplicação e por apresentar considerável teor de RNA (CAR,1996 apud OLIVEIRA; CASTRO-GOMÉZ, 2005).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser usada na alimentação humana e animal sob diversas formas e para diversas finalidades (PEIXOTO, 1996), podendo ser utilizada em sua forma integra ou derivados de levedura (DZIEZAK,1987). É reconhecida mundialmente como excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

3.1 MULTIPLICAÇÃO CELULAR DA LEVEDURA

Em geral, a reprodução celular da levedura é assexuada e sua multiplicação é feita a partir de brotamentos, um processo ao qual a parede celular da célula mãe abre uma minúscula saliência e da origem a uma pequena célula, denominada célula filha (CORREA, 1992).

A figura 2 mostra a reprodução de uma célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

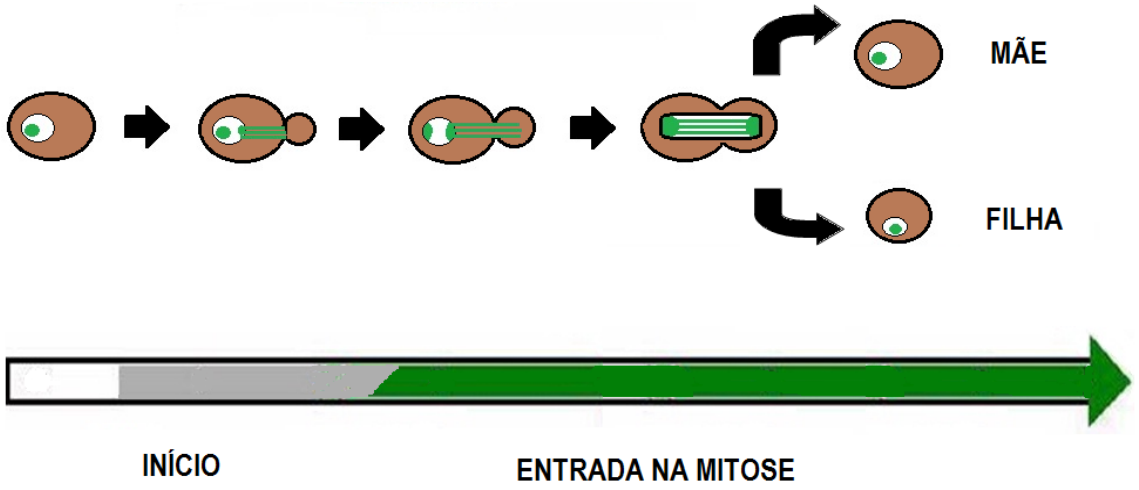


Figura 2 - Reprodução da célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Adaptado de CORREA, 1992, p.16).

3.2 LEVEDURAS, DERIVADOS E SUA INTRODUÇÃO NA DIETA HUMANA.

A levedura é utilizada na alimentação humana desde os tempos dos babilônios. O seu uso é descrito por volta de 2.300 anos A.C. (DZIEZAK, 1987). As leveduras são utilizadas há muitos anos no oriente médio para a fabricação de molhos, condimentos e demais produtos de sua fermentação. Dentre os microrganismos mais utilizados pode-se destacar o *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, a bactéria láctica *Pediococcus halophylus*, e as leveduras *Saccharomyces rouxii, Saccharomyces cerevisie*, *Candida versatilis* e *C. etchellsii* (CORREA, 1992).

Com o agravamento de problemas sociais após a Primeira e a Segunda Guerra Mundial, os países subdesenvolvidos sofreram uma grave escassez de alimentos pela falta de acesso a tecnologias e o seu grande crescimento da população, mesmo com os grandes avanços obtidos na indústria de fertilizantes (SERZEDELLO, 1970 apud OLIVEIRA e OLIVA-NETO, 2008).

3.3 BIOMASSA DE LEVEDURA E UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL

Em escala industrial, as leveduras mais utilizadas nos processos fermentativos são as da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Cândida utilis*, podendo ser utilizadas em forma de extrato, desidratada ou inativa, sendo a do gênero *Saccharomyces* a de maior destaque devido ao grande teor de lisina (DZIEZAK,1987).

Para os fins alimentícios, as leveduras podem ser classificadas em “leveduras de cultivo” ou “leveduras de recuperação”. Leveduras de cultivo são aquelas que são cultivadas para a utilização especifica na indústria de alimentos, especialmente na indústria de panificação, sendo as leveduras de recuperação aquelas que são subprodutos de processos fermentativos, que são desidratadas e utilizadas na alimentação animal (OLIVEIRA, 2001; CASTRO-GOMEZ, 2005).

A utilização do etanol no Brasil despertou bastante interesse no mundo inteiro, devido as enormes vantagens, destacando-se a sua sustentabilidade e por contribuir acentuadamente na amenização do aquecimento global. Nos processos fermentativos de produção alcoólica, pode-se obter acerca de 15 a 30 Kg por metro cúbico de etanol produzido (BUTOLO, 2002 apud OLIVEIRA, 2006), sendo indiretamente a forma mais significativa na obtenção da biomassa residual, capaz de ser utilizada como fontes de proteína se processada de forma adequada (OLIVEIRA,2001).

No Brasil, a produção de leveduras derivadas da fermentação de cana-de-açúcar e a produção da safra de 2001/2002 foram de aproximadamente 45 mil toneladas, sendo que 50% destinaram-se ao mercado interno na alimentação de suínos e peixes e 50% para o mercado externo, para alimentação de peixes e camarões (MORENO, 2002 apud HISANO et al.,2008).

Outra grande fonte na obtenção da biomassa de levedura no Brasil é a produção de cerveja, que compreende cerca de 8,2 milhões de litros ao ano (SINDCERV, 2010).

A Tabela 1 mostra a produção de cerveja por outros países, com uma produção mundial anual de 117,6 milhões de litros de cerveja.

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

Tabela 1 - Produção de cerveja no Brasil e em alguns países do mundo (In: SINDCERV, 2010).

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE LEVEDURAS

A qualidade dos substratos, a concentração de nutrientes e a suas condições de cultivo são fatores que determinam a composição química da biomassa da levedura. A quantidade de reciclos que a levedura passa nos processos fermentativos é considerada um fator importante na determinação de sua composição química, devido a processos mecânicos como a centrifugação e lavagem da biomassa (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991 apud OLIVEIRA; CASTRO-GÓMEZ, 2005).

As leveduras apresentam cerca de 40 a 48% de proteínas, sendo as de destilarias com menor concentração de nitrogênio em sua biomassa, variando de 5 a 6% em base seca de levedura, que constitui purinas, pirimidinas, aminoácidos, enzimas e vitaminas do complexo B (BUTOLO, 1996 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008). A tabela 2 mostra a composição centesimal da biomassa de levedura de diferentes processos fermentativos.

Componente (% em b.s.)	Levedura de cerveja*	Levedura de destilaria**
Proteína	48,74	39,60
RNA	7,6	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	7,8	14,90

Tabela 2 - Composição química de leveduras de cervejaria e destilaria (In: * SGARBIERI et al.,1999, p.122; ** YAMADA et al.,2003, p.427).

Na biomassa da levedura é possível encontrar alto percentual de carboidratos, dentre os quais constitui cerca de 5 a 55%, sendo 33% de trealose, 27% de glucanas, 21% de mananas e 12% de glicogênio (SARWAR, et al., 1985 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008).

Na tabela 3 são apresentados o percentual de RNA em algumas espécies de leveduras, do gênero *Saccharomyces e Candida*.

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

Tabela 3 - Teores de RNA em algumas espécies de levedura (In: ROSALES, 1994 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.23).

Dos ácidos nucleicos presentes nas leveduras o RNA é o que se encontra em maior quantidade, cerca de 8 a 12%, podendo ter variações de acordo com o gênero, espécie e as suas condições de cultivo (BUNKER, 1978).

Por natureza, as leveduras são pobres em vitaminas do complexo A e muito ricas em vitaminas do complexo B, que podem ser sintetizadas pela própria levedura, tendo variações conforme a sua forma de cultivo (CAR, 1996).

A tabela 4 mostra a concentração de algumas vitaminas presentes em leveduras *Saccharomyces cerevisiae e Candida utilis.*

Vitaminas (mg/100g)	*Saccharomyces cerevisiae*	*Candida utilis*
B1	2,9 - 9,0	0,95
B2	ND	4,41
B6	ND	7,91
PP	19,0 – 58,50	45,0
Ácido pantotêmico	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

Tabela 4 - Concentração de vitaminas em leveduras (In: CAR, 1996, p.28)

4. O VALOR NUTRICIONAL DA PROTEÍNA DE LEVEDURA

As proteínas são nutrientes essenciais na dieta humana e deve estar presente na alimentação. O valor nutricional da proteína depende de sua composição, ausência de toxicidade e propriedades antinutricionais, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e digestibilidade (SGARBIERI et al.. 1999).

Alvim; Sgarbieri; Chang (2002), elevaram o valor proteico em farinhas de milho extrusada utilizando derivados de levedura (extratos e autolisado), e obteve considerável melhora no valor nutricional do produto, elevando o valor de fibras, melhorando a absorção de água e diminuindo o teor de carboidratos e lipídios. Resultados similares foram obtidos por Santucci et al. (2003), que enriqueceram biscoitos do tipo “água e sal” com 5% de extratos de levedura, fazendo o biscoito adquirir 9% de proteína, 2% de fibra alimentar, 65% de carboidratos e 15% de lipídios.

Estudos realizados por Vilela; Sgarbieri; Alvim (2000), constataram um aumento significativo na massa corpórea de ratos tratados com dietas à base de misturas isoproteíca e isocalórica de extratos de levedura. Este aumento de peso pôde ser comparado aos mesmos obtidos no tratamento de ratos com dietas de caseína.

4.1 PROTEÍNAS DE ORIGEM MICROBIANA E SUAS RESTRIÇÕES NA DIETA HUMANA

Proteínas de origem microbiana ou *single-cell protein* (LITHFIELD, 1987 apud OLIVEIRA; CASTRO-GÓMEZ, 2005) vêm sendo estudadas nas últimas décadas com uma alternativa de melhorar o percentual de proteínas em produtos alimentícios industrializados. Os microrganismos mais utilizados como fontes de proteínas são algas, bactérias, fungos, e leveduras, sendo as leveduras a mais utilizada pelos diferentes derivados que são obtidos através das mesmas (CORREA, 1992). Porém,

as leveduras constituem parede celular, que necessita de técnicas especiais para facilitar o rompimento celular. Devido ao seu alto teor de RNA, a utilização da levedura em sua forma íntegra causa riscos a saúde humana, pois pode ocasionar o aumento da concentração de ácido úrico no organismo, ocasionando uma doença conhecida popularmente como “gota” (OLIVEIRA; CASTRO GOMÈZ, 2005).

A figura 3 mostra a via de degradação de ácidos nucleicos no organismo humano.

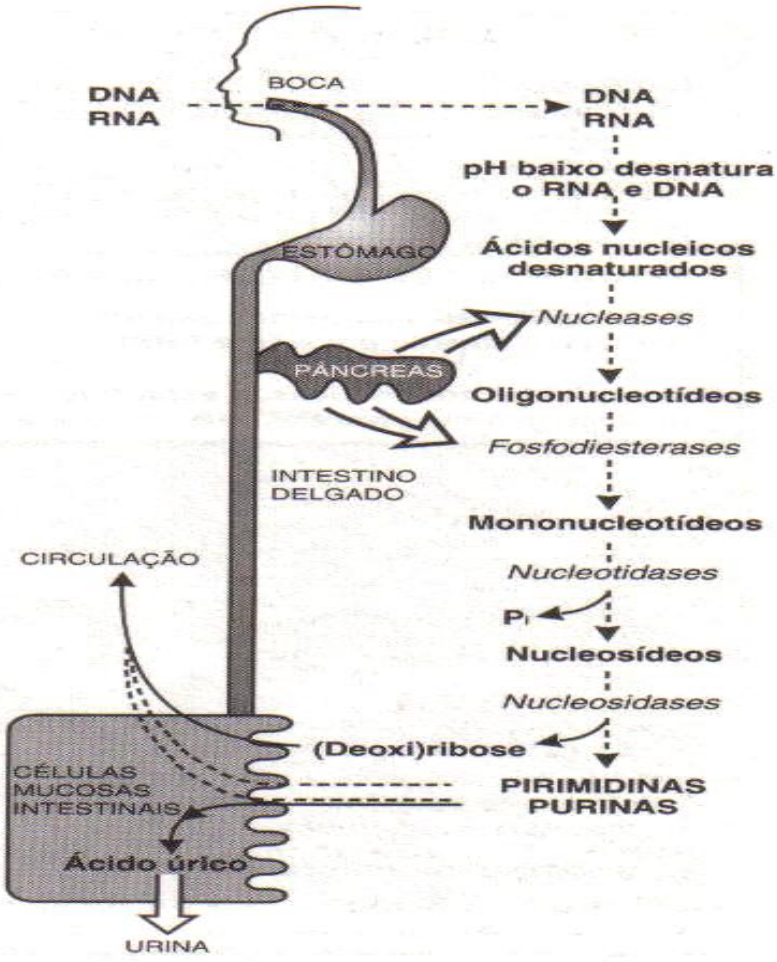


Figura 3 - Via de degradação de ácidos nucleicos pelo organismo humano (In: DZIEZAK, 1987 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.43).

O acúmulo de ácido úrico ocorre devido ao organismo humano não ser capaz de sintetizar a enzima uricase, responsável pela sua degradação.

5. 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. Sua composição química depende da qualidade e composição da biomassa utilizada e do processo industrial utilizado para a ruptura celular da levedura (DZIEZAK, 2005).

O extrato de levedura apresenta cerca de 8 a 12% de RNA em base seca (PACHECO, 1996), sendo o acido ribonucleico o produto de origem microbiana mais explorado na indústria de alimentos por ser utilizado na obtenção de nucleotídeos 5'-ribonucleotídeos (5'- guanosina monofosfato e 5'- inosina monofosfato), que são responsáveis pelo enaltecimento do sabor de produtos alimentícios como *snacks*, salgadinhos, caldos, sopas e outros (OLIVEIRA; CASTRO GOMEZ, 2005). Constitui-se de um pó fino e amarelo, características favoráveis para a utilização em produtos alimentícios.

O extrato de levedura, além de aumentar o valor nutricional de produtos alimentícios, também é um excelente antioxidante, permitindo o aumento do tempo de prateleira de alguns produtos cárneos antes de seu congelamento, como salsichas, mortadelas dentre outros (ANON, 1981; LÁSZTITY, 1987 apud VILELA et. al.,2000).

No Brasil o mercado de extrato de levedura se torna pouco explorado, mas nos últimos anos vem se despertando considerável interesse econômico devido á alta disponibilidade de matéria prima, reaproveitada de processos fermentativos industriais e pela crescente demanda de produtos com esta aplicação (OLIVEIRA; CASTRO-GOMEZ, 2005).

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE LEVEDURA

Além da qualidade da composição da biomassa utilizada, o processo industrial de ruptura celular vem sendo considerado um dos fatores mais importantes para a obtenção de um extrato com maior qualidade em sua composição química (DZIEZAK, 1987). Para a obtenção de isolados proteicos, os processos mecânicos de rompimento da parede celular da levedura apresentam um produto com boas propriedades funcionais. Embora o processo de autólise necessite de maior tempo para o rompimento da parede celular da levedura, foi relatado (OLIVEIRA e CASTRO-GÓMEZ 2005) que o gosto e sabor característico do extrato de levedura (doce, salgado, ácido e amargo), são superiores aos obtidos por processos mecânicos ou químicos.

A tabela 5 mostra a composição química dos diferentes derivados de levedura obtidos no processo de autólise na produção da cerveja, em estudo realizado por Sgarbieri et al.(1999).

Componente (%)	Biomassa	Autolisado	Extrato	Parede Celular
Proteína	48,74	46,45	61,54	32,70
RNA	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

Tabela 5 - Composição química de derivados de levedura de cerveja obtida por autólise (In: SGARBIERI et al.; 1999, p.122) Resultados de determinações feitas em duplicata

De acordo com a tabela 5 é possível verificar o alto teor de acido ribonucleico e proteínas, principalmente no extrato, que pode oferecer cerca de 61,54% de proteínas e 6,9% de RNA.

Em derivados de levedura obtidos em processos fermentativos de destilaria de álcool foram obtidos no extrato de levedura com cerca de 50,7% de proteínas e 8,3% de RNA em base seca (YAMADA et al.,2003).

Na tabela 6 são mostrados os diferentes percentuais de aminoácidos dos diferentes derivados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em processos fermentativos de cervejaria.

(Mg/100mg Proteína)	Biomassa	Autolisado	Extrato	P. 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
Cisteína	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	------

Tabela 6 - Composição de aminoácidos de alguns derivados de levedura de cervejaria (In: SGARBIERI et al., 1999, p.123).

5.2 O MERCADO DE EXTRATOS DE LEVEDURA

No Brasil, dentre os realçadores de sabor mais utilizados estão o glutamato monossódico (MSG), proteína vegetal hidrolisada e extratos de levedura.

A tabela 7 apresenta o consumo anual per capita destas substâncias, destacando os principais produtos de sua utilização.

Produtos	Consumo per capita anual (Kg)
Biscoitos, roscas, etc.	3,932
Mortadela, presunto, salsicha, linguiça	4,178
Outros sais	0,917
Massa/ molho de tomate	0,002
Salgadinhos	0,288

Tabela 7 - Consumo per capita domiciliar de realçadores de sabor por classe de produtos industrializados no ano de 2000 (In: IBGE apud RÉVILLION et al.; 2000, p. 248).

Neste mesmo ano, a arrecadação anual do mercado de extrato de leveduras atingiu a soma de 86,7 milhões de dólares, compreendendo 44,5% no setor de embutidos e cárneos, 41% para biscoitos, roscas, etc. e 9,7% no setor de molhos de tomate (REVILLION; BRANDELI; AYUBI, 2000).

A tabela 8 mostra os valores arrecadados no ano de 2000.

Produtos	Consumo médio per capita anual (Kg)	Mercado potencial anual (Kg)	Mercado anual (US$)
Biscoitos, roscas	0,0983	15.433.100	36.267.785
Mortadela, presunto, salsicha, linguiça	0,1045	16.406.500	38.555.275
Outros sais	0,0020	314.000	737.900
Massa de tomate	0,0229	3.595.300	8.448.955
Salgadinhos	0,0072	1.130.400	2.656.440
TOTAL	0,2349	36.879.300	86.666.355

Tabela 8 - O mercado de extratos de levedura no Brasil (In: IBGE apud RÉVILLION; BRANDELI; AYUBI, 2000, p. 248).

No ano de 1996, o consumo de flavorizantes com sabor carne anual na Europa era de 41.000 toneladas, sendo que 30.000 destas toneladas provinham do consumo de extratos de levedura e extratos vegetais utilizadas na produção de sopas desidratadas.

A tabela 9 mostra o consumo de flavorizantes na Europa no ano de 1996.

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

Tabela 9 - Consumo de flavorizantes na Europa em 1996 (In: PEIXOTO, 1996, p.90).

Por ser considerado um produto industrializado, nos Estados Unidos o uso do extrato de levedura é padronizado pelo Ministério da Saúde. Sua biomassa rica em proteínas é reconhecida e recomendada para o enriquecimento proteico de alimentos como farinhas de cereais, proteínas vegetais, sopas desidratadas e temperos (NÓBREGA, 1985 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008)

A tabela 10 apresenta as dosagens da biomassa de leveduras em produtos alimentícios nos Estados Unidos.

Alimento	Dosagem (%)
Massa de macarrão	6,0-10,0
Pastas: presunto, queijo, peixes, carnes e outros	2,0-7,0
Sopas/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

Tabela 10 - Dosagem de biomassa proteica em alimentos nos Estados Unidos (In: NÓBREGA, 1985 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.31).

5.3 PROCESSOS DE OBTENÇÃO INDUSTRIAL DO EXTRATO DE LEVEDURA

Para se produzir o extrato de levedura industrialmente, pode ser utilizada uma cultura pura de levedura ou biomassa recuperada de processos fermentativos. As etapas de produção correspondem à lavagem da biomassa, autólise, centrifugação, clareamento e secagem (OLIVEIRA, 2001).

Em leveduras recuperadas de cervejaria, dentro da etapa de lavagem, é necessária a realização do desamargamento da biomassa. Esta mesma pode ser realizada com a utilização de solução alcalina (SGARBIERI et al., 1999). O rompimento celular da levedura é realizado pelo processo de autólise, com variações de temperaturas entre 45 a 55º C num período de 24 a 32 horas sob agitação. Após o rompimento celular, o autolisado é pasteurizado e centrifugado, separando o extrato bruto solúvel em água das paredes celulares da levedura. Sucessivamente, o extrato bruto é clarificado e concentrado por secagem em *spray drier,* com variação de temperaturas entre 120 a 130º C (OLIVEIRA; CASTRO GÓMEZ, 2005).

Para a obtenção de um extrato de leveduras de processos utilizados na produção alcoólica, retira-se o leite de levedura, recuperado do processo por centrifugação. O leite de levedura constitui aproximadamente 20% de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suspensão e 7 a 10% de etanol.

Em seguida, o leite de levedura passa pelo processo de lavagem e clarificação, sendo bombeado para um tanque, onde é diluído em água e posteriormente centrifugado para a retirada do excesso de álcool. Após esta etapa, o leite é bombeado para um segundo tanque, onde se realiza o processo de autólise e plasmólise simultaneamente, acrescentando-se de 10 a 30% de cloreto de sódio. A suspensão é aquecida por trocadores de calor até temperaturas entre 40 a 60º C, controlando-se o pH pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio. O objetivo deste processo é o rompimento celular da levedura, que leva a liberação dos constituintes solúveis proteicos e outros derivados.

Após a autólise e plasmólise, o autolisado é diluído novamente em água e passa por centrifugação, retirando-se a fração insolúvel de parede celular. A fração solúvel da levedura é chamada de extrato de levedura. A fração solúvel é bombeada para um terceiro tanque, e a fração insolúvel é lavada e recentrifugada novamente, retirando-se o excesso de extrato, que é bombeado para o mesmo tanque que contém o extrato principal.

Novamente, o extrato líquido passa por uma nova centrifuga, onde é retirado o excesso da parede celular que não foram retiradas nas centrifugações anteriores. O extrato concentrado segue para o processo de pasteurização e resfriamento. Após este processo, o extrato é bombeado para um secador-pulverizador chamado de "*spray dryer"*. Neste secador, o extrato líquido é pulverizado num ambiente quente e seco, onde as gotículas entram em contato com o ar e a água é evaporada, restando um pó fino e seco de cor bege, chamado de extrato seco de levedura.

No processo para a obtenção do extrato de levedura, as paredes celulares também são aproveitadas na produção de outros derivados como isolados de mananas, que é utilizada como substitutos de gorduras em alimentos dietéticos.

O extrato de levedura obtido é finalmente transportado para um silo, onde é embalado em sacos de polietileno, sendo posteriormente mantido em ambiente climatizado com temperatura e umidade controlada. O extrato também pode ser comercializado em forma pastosa, e cabe a cada indústria determinar o padrão a ser adotado.

A limpeza dos equipamentos e tubulações é realizada de forma automatizada com a utilização de soda caustica a 2%, solução de acido fosfórico a 2% e água quente (OLIVEIRA, 2001). A água utilizada no processo é passada por tratamento em estação de tratamento de água (ETA) e reutilizada em diversos departamentos na indústria, de acordo com a forma de tratamento utilizada.

6. O PROCESSO DE AUTOLISE

A autólise é a solubilização do material presente no interior da célula da levedura, através da modificação da parede celular por enzimas endógenas encontradas na própria levedura (SGARBIERI et al., 1999).

A extração de ácidos nucleicos e o processo de autólise são fatores importantes para que a biomassa da levedura seja considerada fonte não convencional de proteínas destinada à alimentação humana, sendo que sua forma íntegra possui baixa digestibilidade e alto teor de RNA, fatores que impossibilitam o seu consumo direto (OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008).

No processo de autólise deve se incluir vários aspectos operacionais para a separação de insolúveis, tais como a clarificação, concentração, e secagem do extrato de levedura. Estes processos são beneficiados com a determinação de melhores parâmetros para o rompimento celular, um dos mais importantes durante o processo (JIMÉNEZ; BADIA; DIAZ, 1993).

As células de levedura, além de membrana plasmática, são constituídas por uma parede celular rígida, formada por polímeros de glucana, manana e quitina, e necessitam de condições apropriadas durante o processo de rompimento celular (CHARPENTIER et al., 1986 apud OLIVEIRA e CASTRO-GÓMEZ, 2005).

6.1 CONSTITUIÇÃO DA PAREDE CELULAR DA LEVEDURA

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 apud OLIVEIRA, 2002).

A figura 4 mostra os principais componentes da parede celular da levedura.

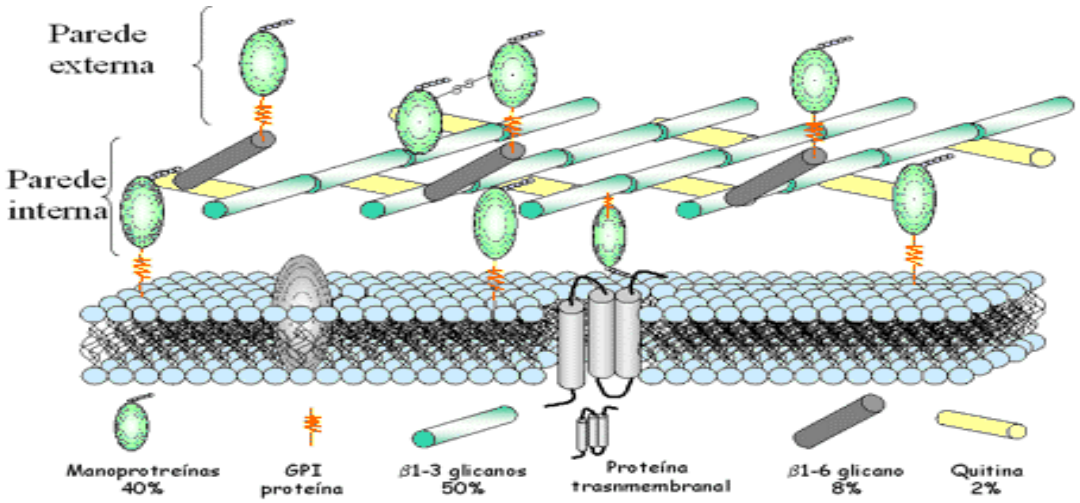


Figura 4 - Estrutura da parede celular de levedura (In: OLIVEIRA, 2002, p. 22).

A tabela 11 mostra o fracionamento dos componentes da parede celular da levedura obtida por 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

Tabela 11 - Fracionamento dos componentes da parede celular de levedura semipurificada, obtida por processo de autólise industrial (In: CHAUD e SGARBIERI, 2006, p. 374).

A glucana é insolúvel e responsável pela rigidez da parede celular e proteção contra choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos. É formada por 48 á 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 de 0,6 á 2,7% da biomassa da levedura (FLEURI; SATO, 2005).

Em células de levedura, a quitina encontra-se em septos primários e no ligamento da célula mãe e a célula jovem, sendo que 90% encontram-se na cicatriz do brotamento e 10% na parede celular da levedura (FLEURI; SATO, 2005).

A manana é formada por manoproteínas, constituídas 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).

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 é constituída de aproximadamente 30 á 40% da massa seca da célula e é uma estrutura em mudança e crescimento contínuo.

O mecanismo bioquímico empregado no processo de autólise se relaciona com a ação sinergística das enzimas endógenas glucanase, manase e quitinase. Este processo é irreversível, e pode ser acelerado com a utilização de biomassa fresca de levedura, na ordem de 15% (v/v), adição de NaCl, e controles específicos de pH e temperatura (KOLLAR et al., 1991 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008).

Knoor et al. (1979), utilizaram processos com o tratamento de células intactas de levedura, adicionando enzimas líticas comerciais como a zymolase e lisozima com o objetivo de aumentar a liberação de nitrogênio proteico.

6.2 PROCESSO DE LISE ENZIMÁTICA DA LEVEDURA

A lise enzimática da parede celular da levedura é um processo progressivo e, não depende somente da ação isolada das β-glucanases, mas sim da atividade sinergística de β-glucanases e proteases (SCOTT; SCHEKMAN, 1980 apud OLIVEIRA, 2001). A camada externa da manoproteína é atacada pela protease, permitindo o acesso sucessivo da β-1,3 glucanase à camada de β-glucana,

permitindo o rompimento da célula da levedura por diferença de pressão osmótica. Após a lise celular realizada pelas enzimas proteásicas e β-1,3 glucanase, ocorre o processo de solubilização da matriz da parede celular, realizado pela β-1,6 glucanase e manases que são inativadas por inibidores formados por complexos presentes na célula da levedura (McCORNICK, 1987 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008).

A figura 5 representa a hidrólise enzimática da β-1,3 glucana pela β-1,3 glucanase em suas respectivas unidades básicas.

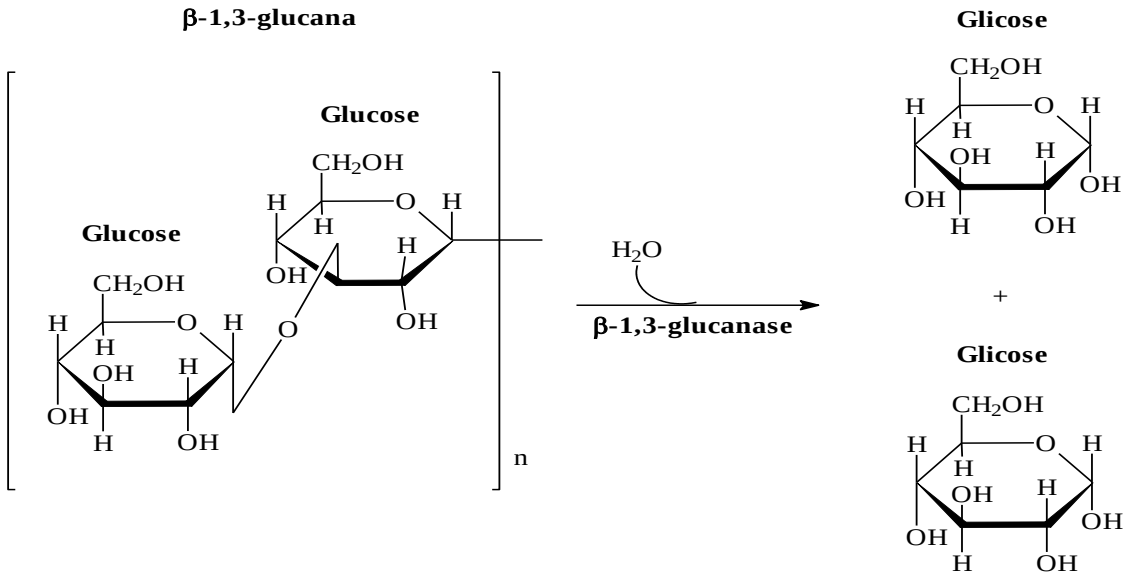


Figura 5 - Hidrólise enzimática da β-1,3 glucana (In: OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.39).

A figura 6 representa a hidrólise enzimática da quitina pela enzima quitinase em suas em suas respectivas unidades básicas.

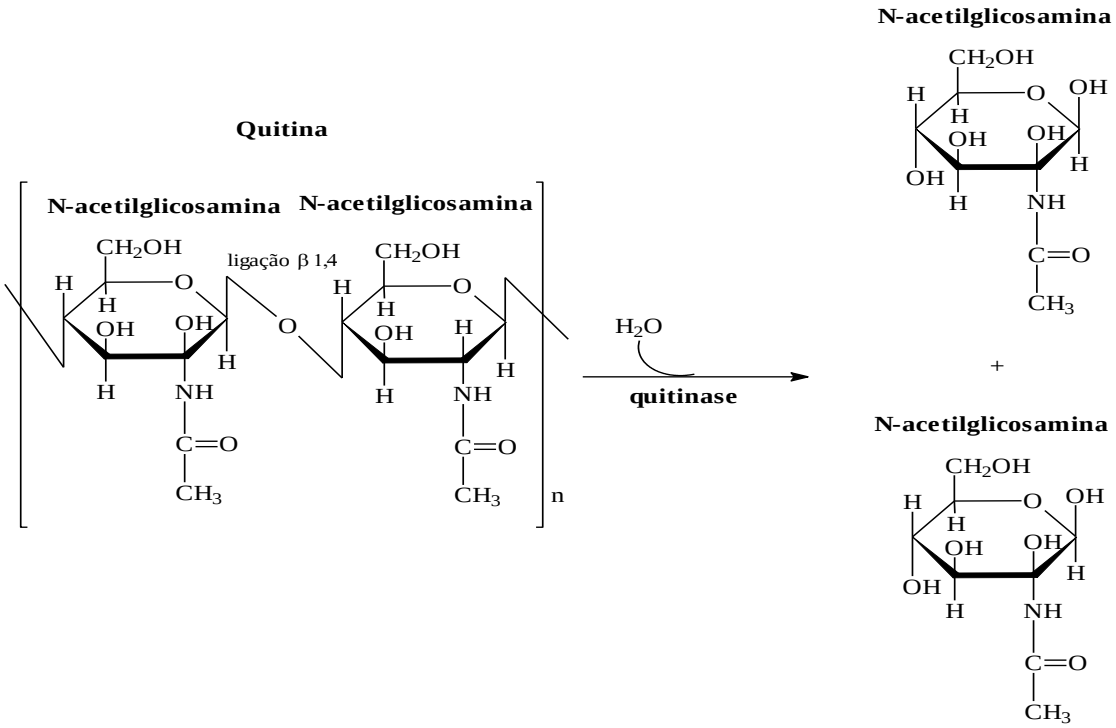


Figura 6 - Hidrólise enzimática da quitina (In: OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.39).

A figura 7 representa a hidrólise da manana pela manase e suas respectivas unidades básicas.

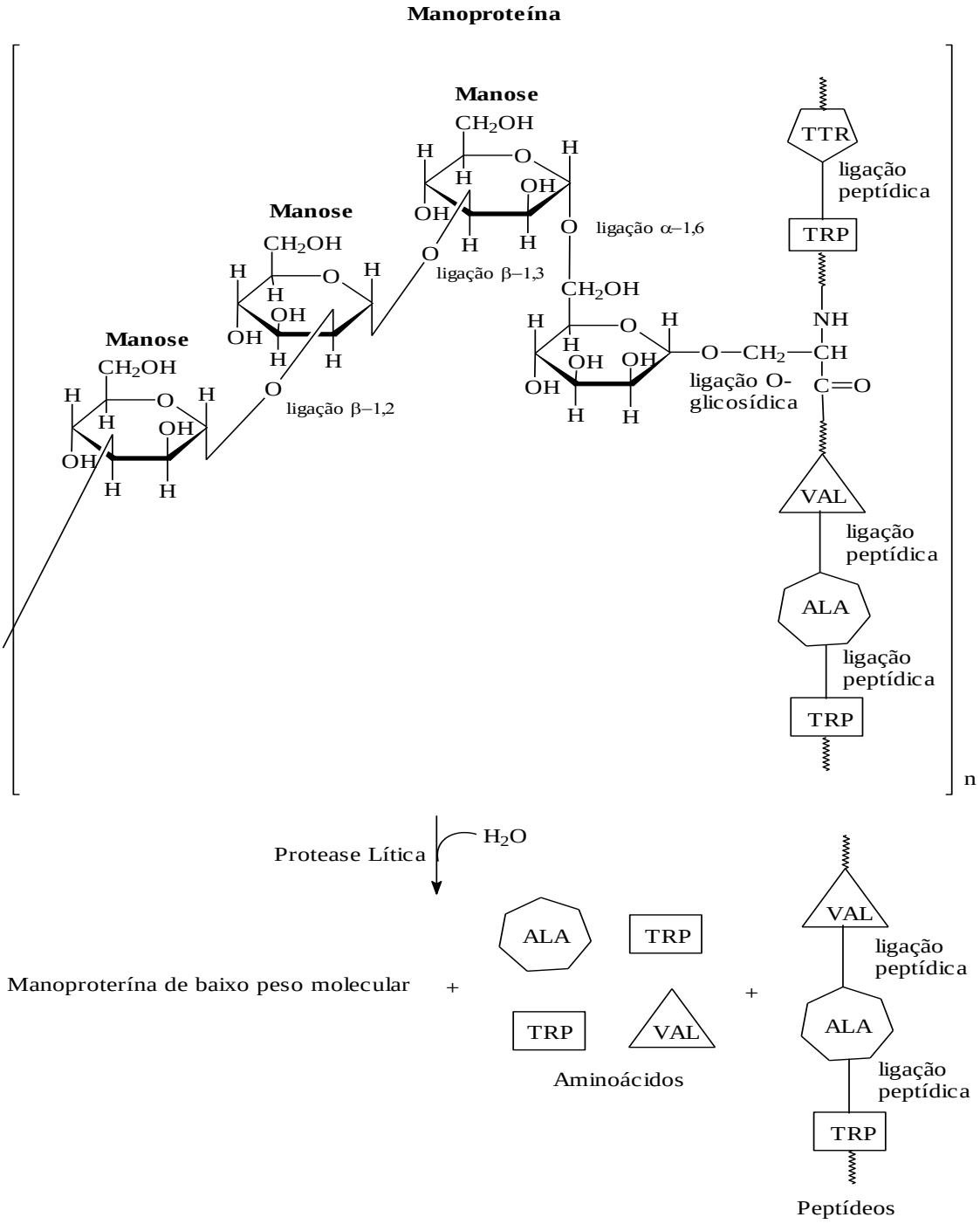


Figura 7 - Hidrólise enzimática da manoproteína (In: OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.40).

6.3 EFEITO DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE AUTÓLISE

Altas temperaturas causam a morte rápida das leveduras. A 48ºC, aproximadamente 95% delas morrem em 45 minutos, a 50ºC morrem em 18 minutos e a 52ºC, em 6 minutos. O efeito da temperatura em células de levedura interfere na atividade enzimática, no mecanismo de controle celular, transferência de informação anabólica dos genes aos ribossomos, absorção de íons e moléculas e na integridade das membranas semipermeáveis (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

As membranas celulares são constituídas de lipídios, proteínas e por cátions para sua estabilização. Em temperaturas variando de 20 a 30º C, a atividade enzimática irá diminuir e as membranas celulares irão se solidificar, diminuindo a sua permeabilidade. O contrário irá acontecer se utilizarmos temperaturas entre 30 e 40ºC, propiciado uma melhor ação das enzimas endógenas da levedura. Numa temperatura igual ou superior a 40°C, a levedura não se multiplica, aumentando a porcentagem do autolisado, diferentemente de processos realizados a temperaturas menores, que propiciam a multiplicação da levedura (RÉVILLION; PIBERNAT, 1996).

Segundo estudos realizados por Feuillat (1986) apud Révillion e Pibernat (1996), rompimentos autolíticos em temperatura de 30ºC durante 48 horas forneceram um autolisado com menos teor de nitrogênio e nucleotídeos.

6.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE AUTÓLISE

Quando células sem parede celular são imersas em uma solução, ela tende a absorver ou perder água para o meio, tentando igualar o seu diferencial de pressão osmótica. Ao ser imersa em solução salina, a célula se contrai na tentativa de igualar o conteúdo de solutos com o meio. Contraindo-se, a célula perde água para o meio, consequentemente ocasionando a perda do material intracelular. Se as células

forem imersas em solução isenta de sais, o inverso pode ocorre, causando o seu inchamento e rompimento celular, perdendo também o seu material intracelular. Mesmo apresentado parede celular, a arquitetura da membrana celular da levedura é semelhante, constituída de camadas de lipídios e algumas proteínas, possuindo as mesmas funções das demais células (NELSON; COX, 2000).

A maioria das proteínas de leveduras são insolúveis ou pouco solúveis em água, podendo ter sua solubilidade aumentada pela adição de sais neutros, como o NaCl, numa proporção de 2 á 10%. Isso ocorre devido á afinidade dos íons salinos presentes na solução com as proteínas da levedura, ocorrendo á repulsão entre elas, aumentando a sua solubilização. Este processo do aumento da solubilidade denomina-se *"salting in"*. Se houver aumento na concentração de íons na solução, o processo contrário, denominado *"salting out"* poderá ocorrer, diminuindo a solubilidade das proteínas. Isso ocorre devido á solvatação de íon salinos pela água, aumentando a atração das moléculas de proteína, ocasionando o aparecimento de precipitados proteicos (SGARBIERI, et al., 1999).

Embora a utilização de NaCl seja vantajoso no processo de obtenção do extrato de levedura, a alta utilização deste sal em produtos alimentícios é prejudicial a saúde humana, podendo haver restrições na comercialização do produto final. O uso otimizado da concentração de NaCl poderá auxiliar uma ótima obtenção do material citoplasmático da levedura e melhorar a qualidade e produtividade do extrato (REED; NAGODAWITHANA, 1995).

Alguns autores citam diferentes concentrações de NaCl utilizados em processos de plasmólise. Jimenez; Badia; Diaz (1993) utilizaram processos com concentração de 15 a 30% de NaCl (m/v), Sgarbieri et al. (1999) mencionaram processos com 2% de NaCl (m/v) e Oliveira (2001), obteve resultados satisfatórios na extração de proteínas de biomassa de levedura de cervejaria, utilizando 12% de NaCl em base seca de levedura.

6.5 EFEITO DO PH NO PROCESSO DE AUTÓLISE

Dentre as variáveis utilizadas na autólise para obtenção do extrato de levedura, o estudo do pH vem tendo maior destaque e importância . Autores como Feuillat e Charpentier (1982) apud Révillion e Pibernat (1996), mencionam processos realizados em solução tampão pH 5,0 , onde obtiveram um extrato com maior índice de compostos nitrogenados. Sugimoto et al. (1973) e Jimenez et al. (1996), mencionam processos ao qual utilizaram suspensão com pH 4,0 e Behalová et al. (1991), obtiveram resultados com maior atividade autolítica em faixas de pH entre 3,0 e 5,0.

Em patente descrita por Tanekawa et al. (1981), relata-se que em atividades autolíticas realizadas em faixa de pH 3,0 e 5,0, o caráter polimérico do RNA é preservado e há uma excelente queda na perca de proteínas e aminoácidos, porém há uma drástica diminuição no rendimento da produção do extrato seco. Em pH acima de 6,6 ocorre a diminuição significativa da taxa de matéria sólida, tornando o processo economicamente inviável. Quando o pH da autólise está abaixo de 6,0 (5,5 à 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 á 6,6 o fenômeno mais observado é a diminuição da quantidade de extrato obtida, todavia, com aumento da concentração média de GMP.

Oliveira e Oliva-Neto (2008), obtiveram resultados significativos em processo realizado a pH 5,1, obtendo um rendimento de 51,3% em massa de extrato, com aproveitamento proteico de 57,9%.

7. PLASMÓLISE

Células mais simples, constituída apenas por membrana celular, apresentam facilidade de rompimento, sofrendo lise apenas por diferença de potencial osmótico ou aplicando-se ultrassom de baixa intensidade. O processo de plasmólise consiste na solubilização do material presente no interior da célula através da diferença de pressão osmótica. A adição de NaCl na suspensão é um fator determinante na solubilização de proteínas (SGARBIERI, et al., 1999).

Existem processos em que a plasmólise é aplicada sucessiva ao processo de autólise, mas se torna pouco viável no ponto de vista econômico, pois necessita- se de mais tempo para a preparação do extrato. Se aplicada a plasmólise simultaneamente ao processo de autólise, o tempo de obtenção do extrato se torna menor, viabilizando o processo.

8. ÁCIDOS NUCLEICOS, NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

Os ácidos nucleicos desempenham importante função no metabolismo animal. Eles são responsáveis pelo armazenamento das informações genéticas, tais como a transferência de informações sobre elas pelas células. São constituídos por cadeias poliméricas de unidades denominadas nucleotídeos. Os nucleotídeos são formados por um açúcar (pentose), uma base nitrogenada, podendo ser pirimidinas (citosina, uracila, timina e adenina) ou purina (guanina) e um grupo fosfato.

A figura 8 mostra a estruturas químicas das bases nitrogenadas.

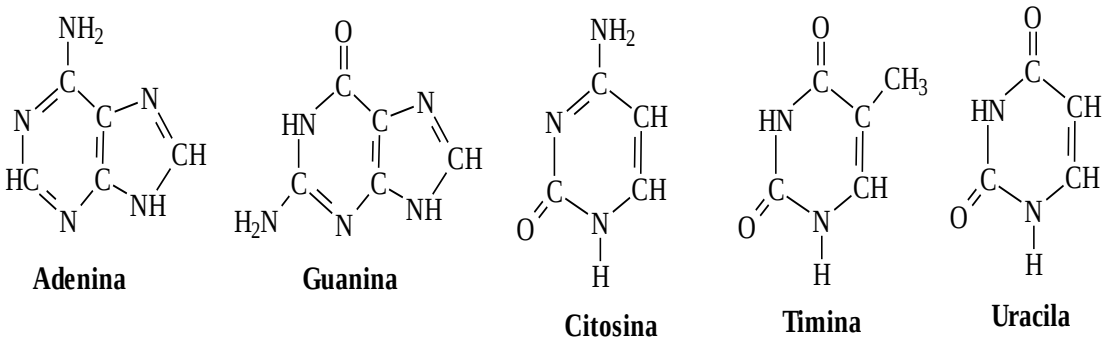


Figura 8 - Estrutura química das bases nitrogenadas (In: NELSON; COX, 2000, p.13).

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é encontrado no núcleo da célula, especificamente nos cromossomos, enquanto o RNA, em sua maioria, encontrado no citoplasma (NELSON; COX, 2000).

A figura 9 mostra a estrutura genérica de um nucleotídeo.

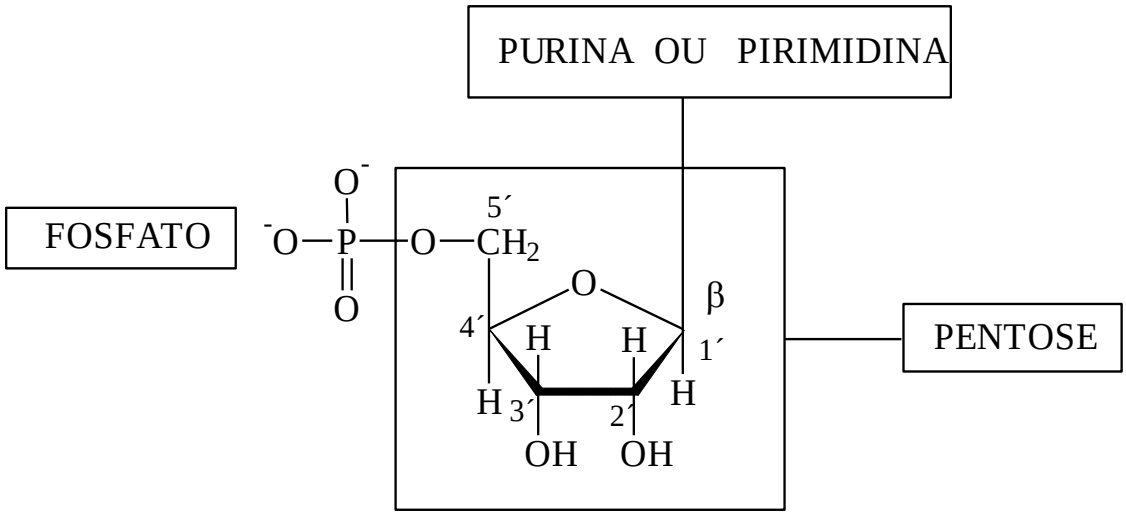


Figura 9 - Estrutura genérica de um nucleotídeo (In: NELSON; COX, 2000, p.13).

O DNA é constituído pelas bases nitrogenadas adenina, timina, guanina e citosina, enquanto o RNA possui diferentemente do DNA a base nitrogenada uracila, que é encontrada no lugar da timina. No DNA, o açúcar presente é a desoxirribose enquanto o RNA apresenta a ribose. Quando está presente na estrutura, o grupo fosfato juntamente com a base e o açúcar, recebe o nome de nucleotídeo, porém, se o grupo fosfato estiver ausente, é chamado de nucleosídeo.

A figura 10 mostra a estruturas de alguns nucleotídeos e seus respectivos nucleosídeos.

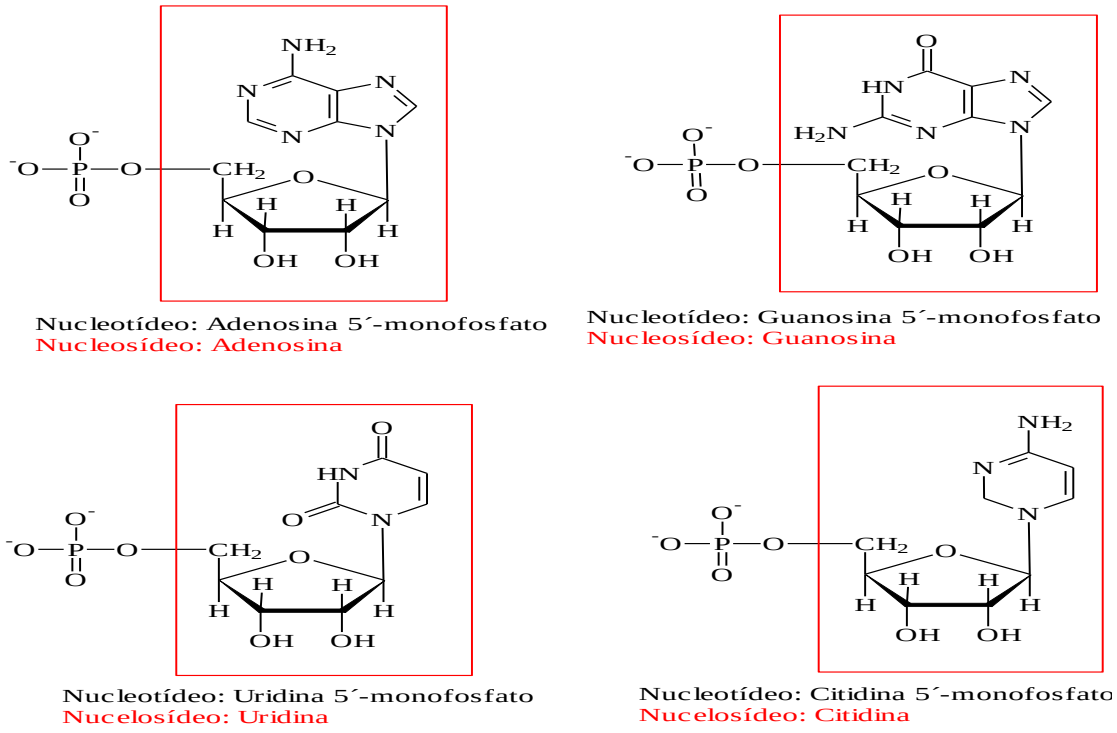
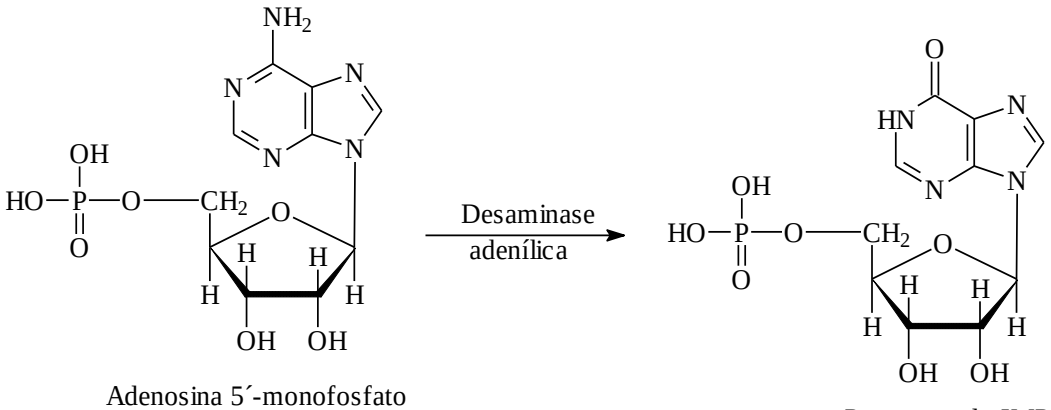


Figura 10 - Nucleotídeo e seus respectivos nucleosídeos (In: NELSON; COX, 2000, p.57).

8.1 RNA, NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS NA APLICAÇÃO INDUSTRIAL.

Em extratos de levedura podem ser encontrados RNA, nucleotídeos e nucleosídeos. Estes derivados de levedura são explorados em diversas áreas industriais, como na alimentação, fabricação de medicamentos e na medicina. Na indústria de alimentos, os nucleotídeos utilizados pelo enaltecimento de sabor cárneo é o ácido guanílico (5'-GMP), ácido inosílico (5'-IMP) e o ácido xantílico (5'-XMP). Nucleotídeos pirimidínicos como o 5'-AMP e 2' e 3' isômeros e 5'-desoxirribonucleotídeos não possuem características enaltecedoras (OLIVEIRA; CASTRO GÓMEZ, 2005). Embora o ácido adenílico (5'-AMP) não apresente tal característica, ele pode ser convertido facilmente em ácido inosílico (5'-IMP) pela adição da enzima desaminase adenílica, conforme a figura 11.



Adenosina 5´-monofosfato

Precursor do IMP

Figura 11 - Deaminação enzimática do AMP à IMP (In: OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p. 50).

A tabela 12 mostra o percentual de nucleotídeos GMP e IMP em extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtidos através de biomassa de levedura de destilaria e panificação.

Tipos de levedura	Temperatura (ºC)	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

Tabela 12 - Percentual de IMP e GMP em extrato levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes temperaturas (In: OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008, p.43). ND*: não detectado

A adição destes compostos em alimentos como batata chips, caldos e sopas dentre outros também é utilizado pelas indústrias com o objetivo de diminuir a utilização de cloreto de sódio, pois a adição elevada de cloreto de sódio pode ser prejudicial á saúde humana.

O IMP não possui uma alta absorção de água, podendo ser utilizado harmoniosamente em produtos secos, como caldos desidratados e outros. O GMP é o agente potencializador mais forte dentre eles, e ambos toleram drástica faixa de pH sem alterar a sua forma natural (DZIEZAK, 1987 apud OLIVEIRA; CASTRO GÓMEZ, 2005).

A adição de IMP e GMP é frequente em alimentos como maionese, catchup e demais molhos, mas deve ser usado cuidadosamente em alimentos em conserva, como picles, pois nucleotídeos são destruídos por enzimas, podendo aderir ao produto sabor indesejável e até mesmo diminuir o sabor picante destes alimentos (LIESKE, 1994 apud OLIVEIRA; CASTRO-GÓMEZ, 2005). A FDA (Food and drug administration) permite o uso de 500 mg de GMP e IMP por quilo de alimento. A medida deve ser expressa em mg de ácido guanílico por Kg de alimento (IGUTI, 1996).

As principais indústrias produtoras de potencializadores de sabor no mundo são as indústrias japonesas Ajinomoto Co, Asahi Chemical Industrial, Kyowa Hakko Kogyo Co., Takeda Chemical Industrial Ltd. e Yamasa Shoyu Co. Ltd. (IGUTI, 1996).

A tabela 13 mostra a produção mundial anual de nucleotídeos e nucleosídeos.

Substância	Produção (Tonelada/ano)
5'-IMP	2000
5'-GMP	1000
ATP	6
FAD, NAD	pequenas quantidades
Adenina	11
Adenosina	5
5'-AMP	não estimada
Camp	não estimada

Tabela 13- Produção de nucleotídeos e nucleosideos (In: IGUT, 1996, p.37).

A tabela 14 mostra alguns alimentos que são utilizados potencializadores de sabor em proporção de 50% da mistura de GMP/IMP e MSG.

Alimento	MSG* (%)	GMP/IMP 1:1(%)
Sopa enlatada	0,12-0,18	0,002-0,003
Aspargo enlatado	0,08-0,16	0,003-0,004
Caranguejo 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	0,020-0,100

Tabela 14 - Níveis de aplicação de nucleotídeos em alguns alimentos (In: SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.87).

8.2 IMPORTÂNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO

Compostos enriquecidos com ácidos nucleicos são de alta importância na dieta humana, pois é através deles que o organismo obtém nucleotídeos e nucleosídeos, que funcionam como substratos, cofatores de enzimas, transdutores de energia, modulação de lipoproteínas, modificações da composição da microflora intestinal, melhorando as funções gastrointestinais tais como a resposta imune dos linfócitos T (FRATA, 2006).

A adenosina trifosfato (ATP) e a guanosina trifosfato (GTP) são fontes de energia em várias reações do metabolismo. Esta última também possui principal papel na síntese de proteínas, sendo indispensável para algumas outras funções metabólicas. Com mediadores de ação hormonal, tem- se a adenosina monofosfato cíclica (AMP) e guanosina monofosfato, sendo a base nitrogenada adenina maior componente das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), flavina adenina dinucleotideo (FAD) e coenzima A (CoA), responsáveis pelo processo de glicólise no organismo (YAMAUCHI, 2002 apud OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008). A tabela 15 mostra a quantidade de nucleotídeos presentes em alguns alimentos de origem animal.

Alimento	AMP*	GMP*	IMP*
Carne 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	----	0	630
Lula	184	0	0
Polvo	26	0	0
Lagosta	82	0	0
Caranguejo	11	0	0
Molusco	81	0	0
Escalope	116	0	0

Tabela 15 - Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem animal (In: SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.87). (*) mg/100g

A tabela 16 mostra a quantidade de nucleotídeos presentes em alguns alimentos de origem vegetal.

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

Tabela 16 - Distribuição de nucleotídeos em alguns alimentos de origem vegetal (In: SUGITA, 2002 apud FRATA, 2006, p.88). (*) mg/100g

9. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular da levedura consiste em determinar a atividade de células vivas existente em determinada amostra. Existem várias técnicas empregadas para a determinação da viabilidade celular, sendo a mais utilizada á técnica da coloração com azul de metileno (OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008).

Para a comercialização de leveduras prensadas, a biomassa fresca deve apresentar 98% de células vivas (OLIVEIRA; OLIVA-NETO, 2008). A viabilidade celular pode ser determinada através da visualização das células da levedura em microscópio ótico. Esta técnica consiste em diluir parte da suspensão de uma pequena amostra contendo células de levedura em água, adicionando, em seguida, solução de azul de metileno ou eritrosina. As células vivas não se colorem, enquanto as inativas apresentam coloração azul. A porcentagem de células vivas é determina transferindo-se, com uma pipeta de Pasteur, a suspensão para uma câmara de Neubauer, para possível contagem das mesmas (ANTONINI, 2004 apud OLIVEIRA et al., 2006).

A figura 12 mostra a coloração de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* por azul de metileno no processo de determinação da viabilidade celular.

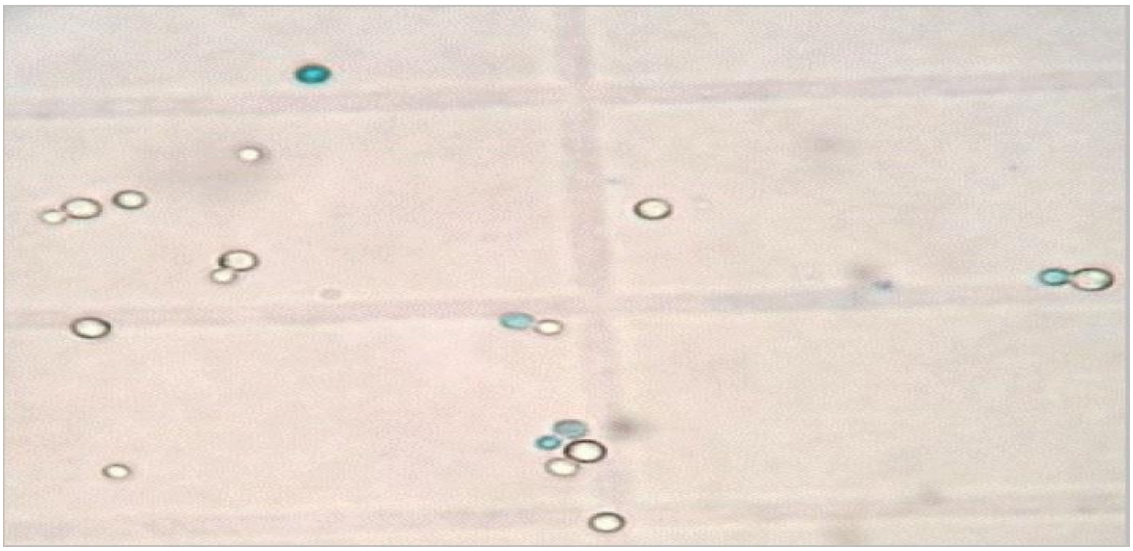


Figura 12 - Determinação da viabilidade celular de levedura Saccharomyces cerevisiae (In: ANTONINI, 2004 apud OLIVEIRA et al., 2006, p. 32).

10. APLICABILIDADE DO CONCEITO DE PH E TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS PARA ALUNOS DO ENSINO MÉDIO

A microbiologia é um ramo da ciência dedicada ao estudo dos seres microscópicos, que são pequenos organismos que não podem ser vistos a olho nu. Esta área da ciência aborda a existência de pequenas formas de vida, que podem ser classificadas como bactérias, fungos, protozoários, vírus e algas unicelulares (LOURENÇO, A., 2008 apud CASSANTI, et al., S/D). Os conceitos básicos de microbiologia são de extrema importância para a aprendizagem no ensino médio, pois abrange vários aspectos relacionados ao dia-a-dia, como higiene pessoal, funcionamento do meio ambiente, dentre outros. Na maioria das vezes, os microrganismos são relacionados como inimigos dos seres humanos, devido algumas espécies causarem doenças, mas apenas 2% destes mesmos são agentes causadores. Algumas espécies de microrganismos são utilizadas nas indústrias alimentícias, bem como na produção de combustíveis utilizados pela sociedade (CASSANTI et al., S/D).

A aplicação dos conceitos de microbiologia básica para alunos do ensino médio é um assunto de grande repercussão e de grande importância no processo de ensino-aprendizagem, devido na maioria das vezes, serem negligenciados pelos professores por terem dificuldades na elaboração e desenvolvimento em estratégias de ensino-aprendizagem.

O procedimento de ensino-aprendizagem consiste nas ações, processos ou comportamentos expressos pelo professor, para colocar o aluno em contato direto com fatos, fenômenos ou acontecimentos, tais como fornecer métodos para facilitar a compreensão, auxiliando-os na construção do conhecimento. Quando o aluno pratica o que aprende na teoria, a aula se torna mais produtiva e é despertado o interesse de buscar novos conhecimentos (HAYDT, 1997).

Outra dificuldade encontrada pelos professores em aplicar aulas práticas no ensino médio é que, no Brasil, 90% das escolas são de rede publica e poucas têm a oportunidade de ter um laboratório de ensino de química e, as que possuem, estão em péssimas condições de uso ou não possuem materiais necessários para auxiliar nas aulas devido á falta de recursos financeiros. Para que este fato não possa prejudicar a aprendizagem do aluno, métodos alternativos podem ser utilizados no processo de ensino aprendizagem, como a utilização de matérias recicláveis e reagentes caseiros, por serem materiais de fácil acesso e baixo custo, tornando-se acessível a todas as pessoas.

Como objetivo de auxiliar os professores em ensinar na prática o conceito de pH e temperatura na área de microbiologia no ensino médio, um método alternativo foi proposto por este trabalho como ferramenta de ensino-aprendizagem, colocando o aluno em contato com uma prática muito comum em seu cotidiano, o processo biofermentativo.

10.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

10.1.1 Materiais

4 copinhos de leite fermentado com aproximadamente 200 mL, palitos de madeira, caixa de isopor com gelo, 4 bexigas, fita crepe, panela com água fervida, água em temperatura ambiente, água gelada, açúcar, fermento biológico de pão.

10.1.2 Procedimento experimental

10.1.2.1 Copinho 1

Diluir uma porção de fermento em água a temperatura ambiente, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.1.2.2 Copinho 2

Diluir uma porção de fermento em água gelada, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Encaixe a bexiga na boca do copinho de iogurte e depois vede com fita crepe. Manter o copinho na caixa de isopor com gelo.

10.1.2.3 Copinho 3

Diluir uma porção de fermento em água fervente, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.1.2.4 Copinho 4

Diluir uma porção de fermento em água morna, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.1.2.5 Anotações

Após 30 minutos, anotar o ocorrido com o volume das bexigas nos copinhos 1, 2, 3 e 4 para possíveis discussões em sala de aula.

10.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO PH NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

10.2.1 Materiais

3 copinhos de leite fermentado com aproximadamente 200 mL, palitos de madeira, água morna, açúcar, 3 bexigas, suco de limão, solução de soda caustica diluída (aproximadamente 4 g/L), fermento biológico de pão.

10.2.2 Procedimento experimental

10.2.2.1 Copinho 1

Diluir uma porção de fermento em água morna, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Acrescentar suco de limão. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.2.2.2 Copinho 2

Diluir uma porção de fermento em água morna, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Acrescentar a solução de soda cáustica. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.2.2.3 Copinho 3

Diluir uma porção de fermento em água morna, até metade do copinho. Acrescentar 2 medidas de açúcar utilizando o palito de madeira. Encaixe a bexiga na boca do copinho e depois vede com fita crepe.

10.2.2.4 Anotações

Após 30 minutos, anotar o ocorrido com os volumes das bexigas nos copinhos 1, 2, e 3 para possíveis discussões em sala de aula.

10.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

A avaliação pode ser aplicada pelo professor de duas maneiras: por meio de participação em grupo e através de questionário proposto, podendo o aluno responde-los pelas anotações feitas observando os experimentos realizados.

Algumas perguntas foram elaboradas para avaliação do desenvolvimento do aluno durante a aula, podendo ser aplicadas pelo professor após os experimentos realizados, de forma oral ou escrita.

10.4 QUESTIONÁRIO EXPERIMENTO 1: EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

1) Descreva o que aconteceu com o volume das bexigas em cada um dos tubos.
2) Em que tubos há produção de bolhas? O que as bolhas indicam?
3) Que processo as leveduras realizam para a obtenção de energia?
4) Que relação pode ser estabelecida entre a temperatura e a atividade de leveduras?

10.5 QUESTIONÁRIO EXPERIMENTO 2: EFEITO DO PH NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

1) Ao colocarmos suco de limão na solução de levedura, o que acontece com o pH da suspensão? O que podemos observar neste experimento?
2) Ao colocarmos solução de soda cáustica na solução de levedura, o que acontece com o pH da suspensão? O que podemos observar neste experimento?
3) Na solução onde não foi alterada o pH da suspensão, o que ocorreu com o volume da bexiga? Explique?

11. METODOLOGIA

11.1 MATERIAIS E REAGENTES

Biomassa de levedura de panificação prensada (Fleschman Royal), estufa (Tecnal TE-397/4), Banho-maria (Tecnal TE-056), Banho-maria (Tecnal TE-054) centrífuga (Excelsa Baby II, modelo 206-R), filtro 6 micras, balança analítica (Tecnal AG200), vidrarias comuns de laboratório, pH-metro, cloreto de sódio (Synth), solução de ácido clorídrico 0,1M (Synth), solução de hidróxido de sódio 0,1M (Synth), água destilada e deionizada, microscópio óptico (Opton TIM-2005-B), solução de azul de metileno 1%.

11.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

11.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado pelo *software Statística 8.0,* de acordo com os dados de pH e temperatura obtidos através do estudo da literatura, que foram respectivamente pH 4,5 , 5,5 , 6,5 e temperatura 54ºC, 55ºC, 56ºC.

11.2.2 Viabilidade celular da levedura

Dissolveu-se em um Becker de 200 mL 1g de levedura prensada e completou-se o volume até oberter-se 100 mL solução. Pipetou-se 10 mL desta solução para outro Becker e diluiu-se para 100 mL. Retirou-se 1 mL desta solução e acrescentou-se 1 mL de solução de azul de metileno 1%. Transferiu-se uma gota desta solução com azul de metileno para uma câmara de Neubauer. Transferiu-se a câmara de

Neubauer para um microscópio eletrônico e em seguida fez-se a contagem das células vivas, determinando a viabilidade celular.

11.2.3 Determinação do percentual de matéria seca da biomassa da levedura

Pesou-se em 3 placas de Petri aproximadamente 12g de levedura prensada úmida. Deixou-se em estufa a 105ºC por um período de 6 horas.

Após este período, as amostras foram colocadas num dessecador por 20 minutos. Pesou-se as placas de Petri e determinou-se o percentual de matéria seca na levedura prensada.

11.2.4 Processos de autólise e plasmólise

Preparou-se em béqueres 9 suspensões de 100 mL de biomassa de levedura, constituída por 15% em massa seca de levedura e 10% de cloreto de sódio. Corrigiu-se de acordo com os valores do delineamento experimental o pH das suspensões para 4,5, 5,5 e 6,5 com NaOH 0,1M e HCl 0,1 M. As suspensões foram mantidas em banho-maria em temperaturas de 54°C, 55°C e 56°C por um período de 32 horas, conforme figura 13. A figura 14 mostra as suspensões após a autólise e plasmólise, em destaque as suspensões 1, 2 e 3.

Figura 13 - Autólise de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em banho-maria.

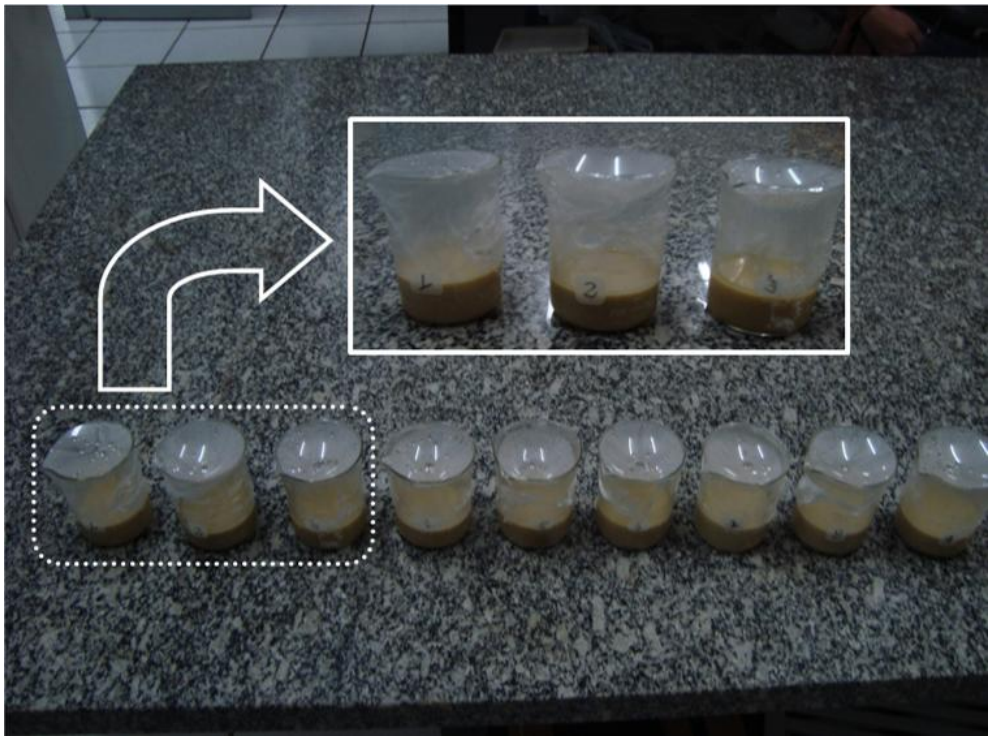


Figura 14 - Suspensões de levedura após processo de autólise e plasmólise.

11.2.5 Centrifugação do autolisado total

Após 32 horas de autólise e plasmólise simultâneas, as suspensões foram centrifugadas para a remoção das paredes celulares. O sobrenadante contendo o extrato de levedura foi retirado e filtrado em filtro 6 micras. Corrigiram-se os seus respectivos volumes até 100 mL, para a etapa de secagem do extrato.

11.2.6 Secagem do extrato de levedura

Pipetou-se 10 mL do extrato liquido de cada amostra em 9 placas de Petri. Colocou-se as amostras para secar em estufa a 70ºC por um período de 6 horas. Após a secagem, as placas de Petri foram colocadas em dessecador por 20 minutos. Pesou- se as amostras e anotaram-se as massas de extrato seco obtidos. Realizou-se o processo de secagem novamente para a obtenção em duplicata dos valores de massa seca do extrato autolisado, conforme a figura 15.

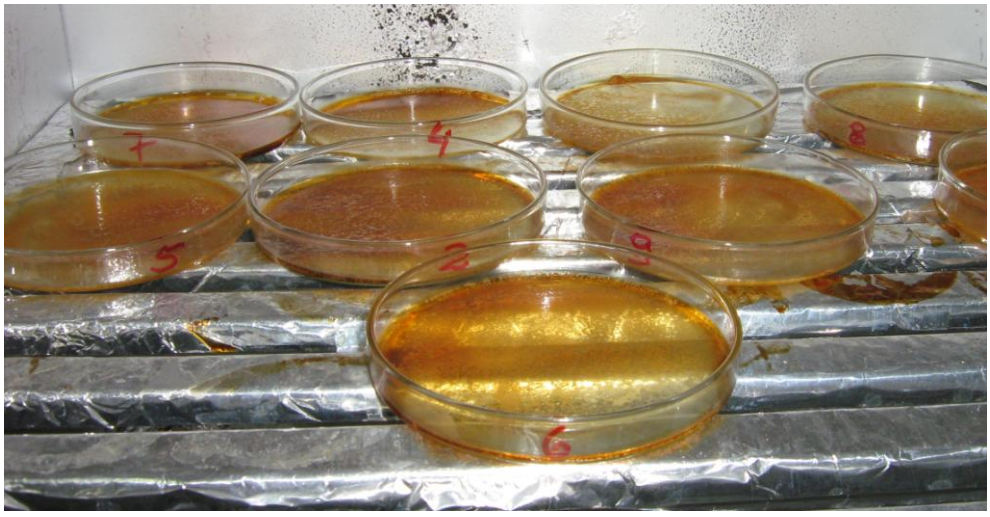


Figura 15 - Secagem do extrato de levedura após a autólise e plasmólise.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento dos ensaios realizado pelo software *Statística 8.0* é mostrado na tabela 17.

Experimento	pH	TºC	pH	TºC
01	-1	-1	4,5	54
02	-1	0	4,5	55
03	-1	1	4,5	56
04	0	-1	5,5	54
05	0	0	5,5	55
06	0	1	5,5	56
07	1	-1	6,5	54
08	1	0	6,5	55
09	1	1	6,5	56

Tabela 17- Delineamento realizado pelo software *Statistica 8.0*

Para a variável pH, foram considerados como nível -1(menos um) o valor de pH 4,5, como nível 0(zero) o pH 5,5 e como nível 1(um) o pH 6,5. Para a variável temperatura, o nível -1(menos um) foi ocupado pela temperatura de 54ºC, o nível 0 (zero) pela temperatura 55ºC e como nível 1(um) a temperatura de 56ºC. Todos estes dados foram obtidos através do estudo da literatura e os valores das variáveis foram inseridos no *software statística 8.0* na ordem crescente de numeração.

12.2 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular da biomassa utilizada foi determinada através da coloração das células mortas com solução de azul de metileno 1% e sucessiva contagem das células da levedura em câmara de Neubauer através de um microscópio eletrônico.

A viabilidade celular determinada foi de 99,2% de células vivas e 0,8% de células mortas, estando á biomassa dentro dos melhores padrões para a comercialização e utilização na obtenção o extrato.

12.3 PERCENTUAL DE MATÉRIA SECA DA BIOMASSA DA LEVEDURA

O percentual de matéria seca de levedura foi determinado pelo método gravimétrico através da secagem da biomassa em estufa a 105ºC, conforme a tabela 18.

	Tara(g)	Peso da Biomassa Úmida(g)	Peso Seco da amostra(g)	% Matéria Seca da Biomassa
Ensaio 1	31,5515	11,7115	35,2163	31,29
Ensaio 2	41,8582	11,4342	45,4403	31.32
Ensaio 3	51,5892	11,4481	55,1754	31,32
MÉDIA DA TRIPLICATA				**31,31**

Tabela 18- Percentual de matéria seca da biomassa de levedura prensada.

Para a determinação do percentual da matéria seca na biomassa da levedura descontou-se o peso seco da amostra após a secagem, do peso inicial da amostra (tara+peso seco da biomassa úmida), obtendo-se o peso da água presente na levedura. Considerando-se o peso da biomassa úmida como 100% e o peso da água (peso inicial da amostra – peso seco da amostra) eliminada, determinou-se o percentual de matéria seca da levedura.

12.4 RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DO EXTRATO APÓS AUTÓLISE

O rendimento da produção do extrato foi determinado através de sua secagem após a centrifugação do autolisado total. Descartou-se a parede celular e recuperou o sobrenadante contendo o extrato. Após a centrifugação, o volume do extrato

sobrenadante contendo o extrato foi corrigido para 100 mL. Após a correção, pegou-se 10 mL do extrato e secou-se em estufa a 70ºC.

A tabela 19 mostra o percentual dos rendimentos obtidos nos experimentos de autólise realizados.

Experimento	pH	TºC	Massa seca em 10mL	Massa seca em 100mL	Rendimento(%)
01	4,5	54	0,9190	9,190	55,70
02	4,5	55	0,8872	8,872	53,75
03	4,5	56	0,7240	7,240	43,87
04	5,5	54	0,9368	9,368	56,78
05	5,5	55	0,8996	8,996	54,53
06	5,5	56	0,8204	8,204	49,72
07	6,5	54	0,9278	9,278	56,22
08	6,5	55	0,8604	8,604	52,14
09	6,5	56	0,7254	7,254	43,96

Tabela 19- Rendimento da produção do extrato na autólise da levedura (Análises feitas em duplicata). Tempo de autólise e plasmólise: 32 horas.

A figura 16 mostra o extrato de levedura após a secagem em estufa a 70º C.

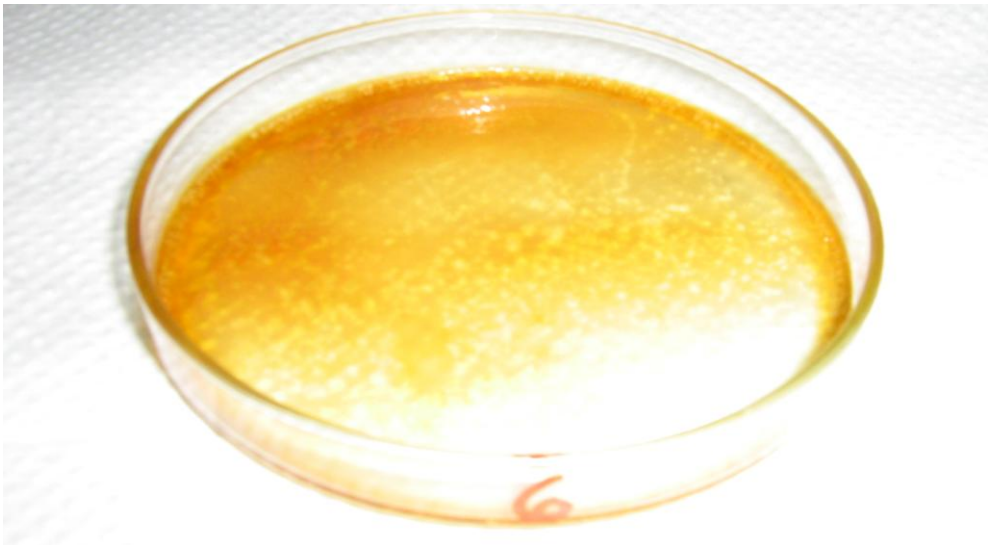


Figura 16 - Extrato de levedura após secagem em estufa a 70ºC.

Para efeito de cálculo, pode-se considerar 10mL de água como 10g, pois a diferença da densidade da água é desprezível. O rendimento foi calculado com base na biomassa inicial da levedura utilizada, mais a quantidade de NaCl utilizada juntamente na autólise, sendo 15g de levedura em base seca e 1,5g de NaCl (16,5g em suspensão).

12.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de rendimentos obtidos foram apresentados e auxiliados pelo *software Statística 8.0.* A curva padrão é apresentada na figura 17, mostrando os valores dos rendimentos preditos pelo modelo matemático e os valores dos rendimentos observados (obtidos) nos ensaios.

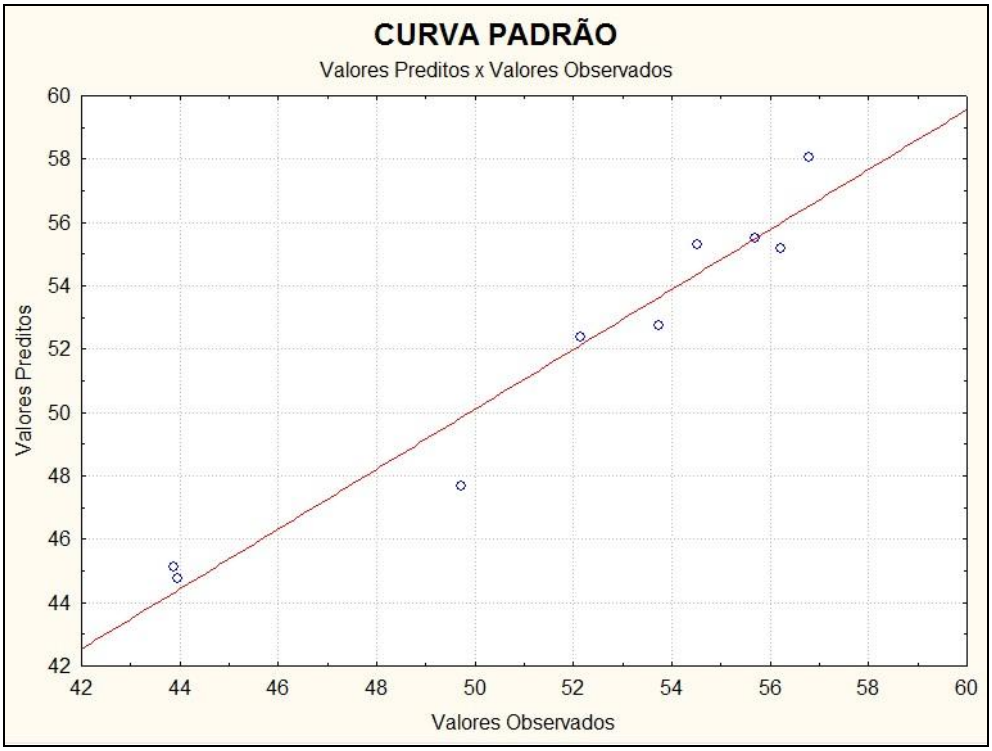


Figura 17- Curva padrão dos rendimentos do extrato de levedura (Valores preditos x Valores observados).

A tabela 20 mostra a análise da significância (p) entre pH e temperatura de autólise dos experimentos de autólise. Para o modelo matemático, as variáveis são consideradas significativas quando o valor de “p” é menor que 0,05. As análises mostraram que a temperatura linear foi significativa (p=0,001522), enquanto as demais variáveis, temperatura quadrática (p=0,105390), pH linear (p=0,816666) e pH quadrático (p=0,078786) não foram significativas pelo modelo matemático apresentado.

Variáveis	Significância(p)
pH Linear	0,816666
pH Quadrático	0,078786
Temperatura Linear	0,001522
Temperatura Quadrática	0,105390

Tabela 20- Análise de significância das variáveis pH e temperatura.

Apesar de algumas variáveis não terem sido significativas, a significância das mesmas podem ser obtidas através de experimentos realizados com a faixa ótima de temperatura e pH interpretados na análise de superfície de resposta. Tais experimentos não foram realizados porque não houve necessidade de sua realização, pois foi possível observar com perfeição no gráfico de superfície de resposta o ponto de maximização da produção do extrato de levedura.

A interação das variáveis na otimização da produção do extrato de levedura é apresentada na figura 18 (superfície de contorno).

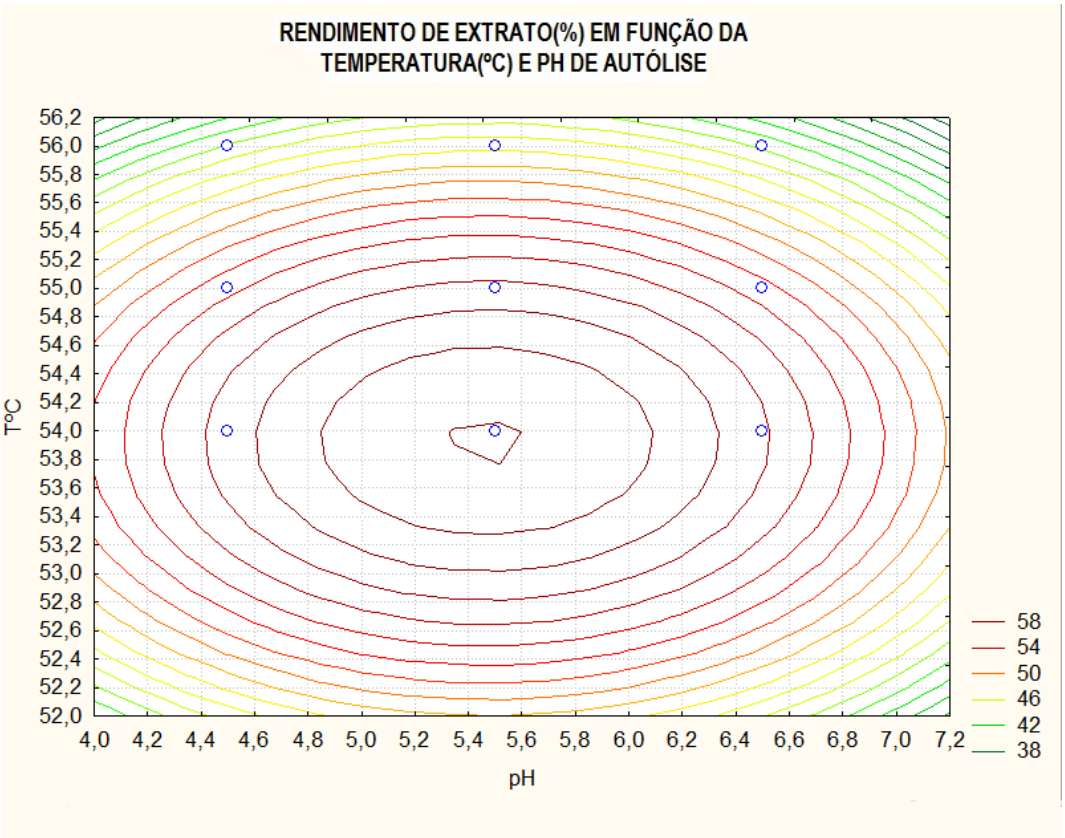


Figura 18- Rendimento de extrato em função da temperatura e pH de autólise. Tempo de autólise e plasmólise: 32 horas.

A superfície de resposta apresentada na figura 19 complementa as análises estatísticas, mostrando o rendimento máximo de extrato produzido (58% em base seca), tais como o pH (5,5) e temperatura (53,9ºC) ótima para autólise e plasmólise.

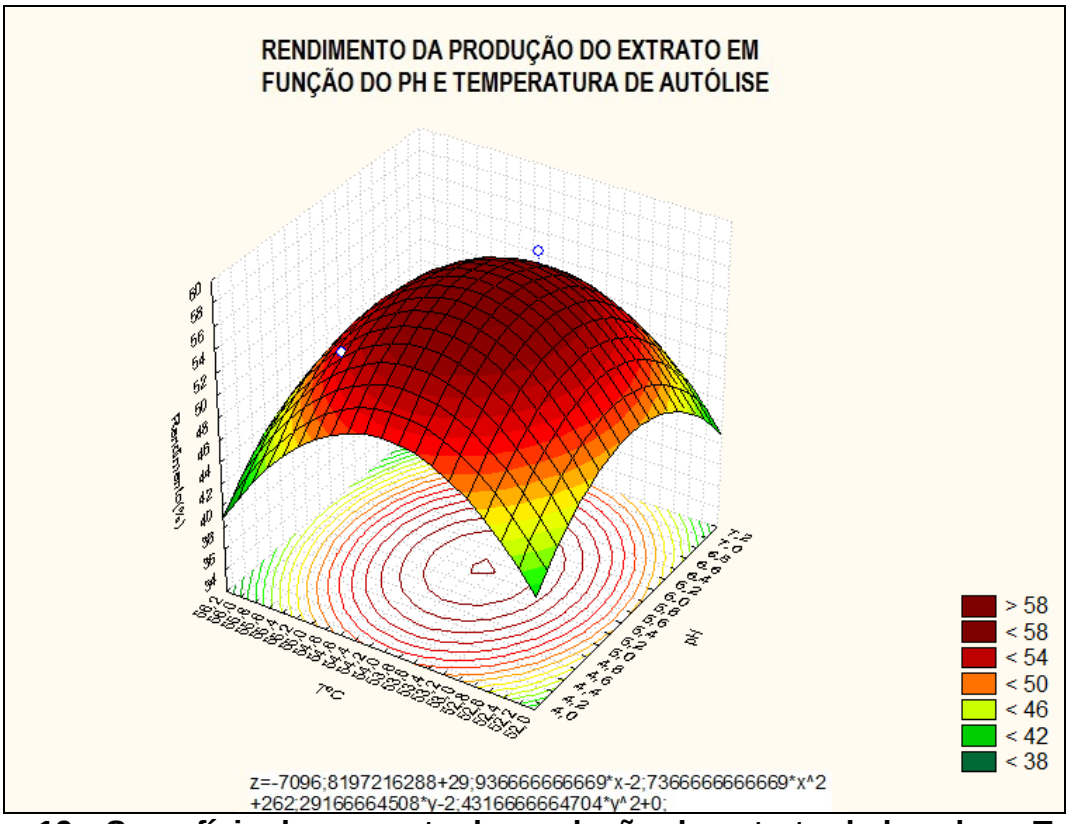


Figura 19 - Superfície de resposta da produção do extrato de levedura. Tempo de autólise e plasmólise: 32 Horas.

No gráfico apresentado na figura 19, tem-se a superfície de resposta da produção do extrato(Z) em função do pH(X) e temperatura(Y) de autólise e plasmólise, sendo o ponto ótimo da análise identificado na cor vermelho escuro. Á medida em que a tonalidade da cor vermelha vai diminuindo, alcançando a cor laranja, amarela e verde, pode-se observar a diminuição da produção do extrato (%), tais como as faixas de pH e temperatura (°C) relacionadas à queda.

A equação do gráfico também é apresentada na figura 19, mostrando as coordenadas vetoriais da variável do rendimento da produção do extrato(Z), em função do pH (X) e temperatura (Y) de autólise e plasmólise.

13. CONCLUSÃO

Observando os dados das análises estatísticas realizado para a maximização da produção do extrato de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, a melhor faixa de temperatura compreendeu-se entre 53,3 a 54,6°C, sendo a temperatura ótima 53,9ºC, estando de acordo com estudos realizados por Révillion e Pibernat (1996). A melhor faixa de pH compreendeu-se entre 4,9 e 6,1, sendo o pH ótimo 5,5, estando de acordo com patente escrita por Tanekawa et al. (1981). O rendimento máximo de extrato obtido estatisticamente no pH e temperatura ótima para autólise e plasmólise foi de 58% de extrato de levedura seco.

REFERÊNCIAS

ALVIM, Izabela Dutra; SGARBIERI, Valdemiro Carlos; CHANG, Yoon Kil. Desenvolvimento de farinhas mistas extrusadas à base de farinha de milho, derivados de levedura e caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.22, n.2, maio/ago. 2002. p. 170-176.

ANTONINI, Sandra Regina Ceccato**. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria.** (Apostila de curso de fermentação alcoólica). Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de São Carlos. Fev, 2004. 34p.

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, p. 91-96.

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

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

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 e Nutrição Aplicada, 1996. p.28.

CASSANTI, Ana Claudia; CASSANTI, Ana Carla; ARAUJO, Eliana Ermel; URSI, Suzana. **Microbiologia democrática: estratégias de ensino aprendizagem e formação de professores. Oficina: Microbiologia e Democracia**. Departamento de Ciências da Natureza. Colégio Dante Alighieri. S/D. 27 p.

CHAUD, Saula Goulart.; SGARBIERI, Valdemiro. Carlos. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, abr.-jun, 2006, p. 369-379.

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. São Paulo. Brasil. 1992.

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

FAO/OCDE, 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://www1.folha.uol.com.br/mercado/751326-onu-pede-codigo-de-conduta-contra-fome-a-produtores-agricolas.shtml. Acesso em: 18 de jun. de 2010.

FARFAN, J. A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Cad. Saúde Pública**. v.14, n.1, jan./mar., 1998, p. 205-212.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Arumi. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**. Campinas, V. 28, nº 5, Abr/Mai, 2005, p.871-879.

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

HAYDT, Regina Célia Cazaux. Curso de didática geral. 4. ed. São Paulo: Editora Ática, 1997.

HISANO, Hamilton; SAMPAIO, Fernanda Garcia; BARROS, Margarida Maria; PEZZATO, Luiz Edivaldo. Digestibilidade aparente de rações contendo levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular pela tilápia do Nilo. **B. Inst. Pesca**, v. 34, n. 2, 2008, p. 281 – 287.

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 e Nutrição Aplicada, p.32-40, 1996.

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

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

NELSON, D. L.; COX. M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier. 2000.

OLIVEIRA, Antonio Martins; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. Otimização da extração de proteínas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Semina**: **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, out./dez. 2005, p. 521- 534.

OLIVEIRA, Antonio Martins. **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. 2001.

OLIVEIRA, Antonio Martins. OLIVA-NETO, Pedro. **Otimização da extração de RNA de levedura de cerveja na produção de extrato de levedurra**. Rio Claro, 2008. 120p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2008.

OLIVEIRA, Celso Guarani Ruiz. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura *SACCHAROMYCES Cerevisiae* rica em selênio orgânico**. Curitiba, 2006. 77 p. Dissertação de Mestrado do curso de pós-graduação em tecnologia de alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

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, 2002.

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, 1996.

PEIXOTO, N. **Processamento de Produtos de Biomassa de Levedura para Alimentação Humana:** Potencial, Mercado Interno e Externo. "WORKSHOP": Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas, 1996. p.90.

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

RÉVILLION, J. P.; BRANDELI, Adriano. AYUBI, Marco A.Z. 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, p. 246-249.

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

ROCHA-FILHO, Romeu C. Canais de água e de íons: processos da vida na escala molecular**. Química Nova na Escola**, n.18, nov., 2003, p. 9-12.

RUTZ, Fernando; ANCIUTI, Marcos Antonio; RECH, José L.; GONÇALVES, Fernanda M.; DELGADO, Aline D.; ROSA, Elizelle R.; ZAUKI, Niédi; RIBEIRO, Carmem L.G.; SILVA, Rodrigo R.; DALLMANN, P.R**.;** Desempenho e características

de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de leveduras na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, out/dez, 2006, p. 349-355.

SANTUCCI, Marjori Carelli Costa; ALVIM, Izabela Dutra; FARIA, Eliete Vaz; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Efeito do enriquecimento de biscoitos tipo água e sal, com extrato de levedura (Saccharomyces sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, set. 2003, p.441-446.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos; ALVIM, Izabela D.; VILELA, Elke Simone D.; BALDINI, Vera Lucia S.; BRAGAGNOLO, Neura. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces sp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Braz. J. Food Technol**., v. 1,2, n. 2; agosto, 1999, p.119-125.

SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. **Produção Mundial de Cerveja**. Disponível em: <www.sindicerv.com.br>. Acesso em: 18 jun. 2010. 1p.

SUGIMOTO, H. et al. Process for autolysis of yeast. **United States Patent**. 1973.

TANEKAWA, Tetsuo; TAKASHIMA, Hiroshi; HACHIYA, Tomoyshi. Production of yeast extract containing flavoring. **United States Patent**. Dec. 1, 1981.

VALENTÍN, E; HERRERO; RICO, H.; MIRAGALL, F.; SENTRANDEU, R.; Cell wall manoproteins during the population growth phases in Saccharomyces cerevisiae. **Journal Archives of Microbiology**. n. 148, Julho, 1997. p. 88-94.

VILELA, Elke S. Dias; SGARBIERI, Valdemiro Carlos; ALVIM, Izabela Dutra. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista de Nutrição**. v.13, n.3; set/dez, 2000, p. 127-134.

YAMADA, Eunice Akemi, ALVIM, Izabela Dutra, SANTUCCI, Marjorie C. Costa, SGARBIERI, Valdemiro Carlos. 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, p.423-432.