



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

**Piero Fumagalli Scalada**

**EFEITO DO TEMPO E PH DE AUTÓLISE NA CONCENTRAÇÃO DE RNA  
DO EXTRATO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

Assis  
Ano 2010

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

Piero Fumagalli Scalada

**EFEITO DO TEMPO DE AUTÓLISE NA CONCENTRAÇÃO DE RNA DE  
EXTRATO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em  
Química Industrial do Instituto Municipal de Assis, como  
exigência para obtenção do título de Química Industrial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Batista de Souza

Assis  
2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Scalada, Piero Fumagalli

Efeito do tempo de autólise na concentração de RNA do extrato de levedura  
*Saccharomyces cerevisiae*. / Piero Fumagalli Scalada.

Fundação Educacional do Município de Assis – Fema: Assis, 2010

38 p.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Batista de Souza

Trabalho de conclusão de curso (TCC) – Química Industrial – Instituto Municipal  
de Ensino de Assis.

1. RNA, 2. Autólise.

CDD: 660

Biblioteca Fema

**EFEITO DO TEMPO DE AUTÓLISE NA CONCENTRAÇÃO DE RNA DE  
EXTRATO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

Piero Fumagalli Scalada

Trabalho de conclusão de curso de graduação em  
Química Industrial do Instituto Municipal de Assis, como  
exigência para obtenção do título de Química Industrial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Batista de Souza

Analizador (1): Prof<sup>a</sup>. Gilcelene Bruzon

Assis  
2010

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais e avos, a minha irmã, e aos meus grandes e eternos amigos.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me dado forças para concluir o curso com êxito, por me confortar nos momentos de dificuldades e me dar forças para continuar ultrapassando as barreiras que a vida impõe.

Aos meus pais Roberta e Ulisses, que sempre tiveram do lado me apoiando, em todos os momentos difíceis, me confortando, me animando e sempre mostrando o lado bom para que eu nunca desistisse de conquistas meus objetivos.

Aos meus avós Francisco, Tereza e Edth, que cuidavam de mim, quando meus pais estavam trabalhando e que sempre me apoiaram em tudo.

Aos meus grandes e eternos amigos, Priscila, Danilo, Ana Paula Borges e Oziliana, que ao decorrer da faculdade passaram a ser mais do que amigos e sim irmãos, que me ajudaram e me confortaram em todos os momentos difíceis que passei, e nos tornamos uma família e agradeço todos os dias por fazerem parte da minha vida e da minha história.

Agradeço aos meus professores por terem compartilhado seus conhecimentos em um grande período de convivência, e também por fazerem parte da minha vida.

Em especial a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Batista de Souza, que teve muita paciência, e tranquilidade, por pegar um aluno que não era seu e sim de outro orientador, e assumiu como seu e deu todo apoio possível e impossível.

A todos os outros amigos, e aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse realizar este trabalho, muito obrigado, a todos.

## Resumo

O extrato de levedura é um aditivo protéico amplamente utilizado para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos como sopas desidratadas, bolachas, snacks e outros. É constituído em maior parte por proteínas, aminoácidos, fibras, lipídios, vitaminas de complexo B, ácidos ribonucléicos, nucleotídeos e nucleosídeos. É obtido industrialmente pelo processo de autólise e secagem de fração solúvel por “spray drier” utilizando-se uma cultura pura de leveduras ou biomassa recuperada de processos fermentativos. A levedura de panificação *Sacchamyses cerevisiae* é constituída por cerca de 50 a 60% de proteína e 8 a 12% de ácidos ribonucléicos, componente estes de maior interesse para a composição de extrato de levedura. A autólise é um processo irreversível e ocorre pela ação de enzimas endógenas que provocam o rompimento celular e a liberação dos compostos solúveis denominados extrato de levedura. O RNA obtido do extrato de levedura tem sido muito explorado pelas indústrias produtoras de extrato visando prover mediante sua hidrólise, altas concentrações de nucleotídeos potencializadores de sabor, o GMP (Guanina-5'-monofosfato) e IMP (Inosina-5'-monofosfato). Esses subprodutos do RNA além de promover o enaltecimento do sabor, apresentam alto potencial para prevenir o sistema imunológico de humanos e animais, possibilitando assim a redução do uso excessivo de antibióticos principalmente em animais de corte como frangos, suínos e peixes de criadouro. O presente trabalho busca explorar a técnica de autólise e o efeito do tempo na produção do extrato rico em RNA. No procedimento de extração de RNA, trabalhou-se com três variáveis: o tempo que foi dividido em 12, 24 e 36 horas, e o pH que foi de 4,5, 5,5 e 6,5 e % de RNA. Os resultados da extração do RNA em função do tempo, pH, e % de RNA, foi melhor obtido na amostra 4 onde foi obtido 50,41% de extrato de levedura para as condições de pH 4,5 no tempo de 24 horas. A pior eficiência de extração ocorreu em pH 6,5 e em 36 horas obtendo-se um rendimento de 27,88%.

**Palavras chave:** RNA; Levedura; Autólise

## Abstract

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 consists in large part by proteins, amino acids, fiber, fat, B-complex vitamins, ribonucleic acids, nucleotides and nucleosides. It is obtained industrially by the process of autolysis and drying of the soluble fraction by spray drier "using a pure culture of yeasts or recovered from biomass fermentation processes. The bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* consists of approximately 45 to 60% protein and 8-12% of ribonucleic acids, these components of most interest to the composition of yeast extract. The autolysis is an irreversible process and occurs through the action of endogenous enzymes that cause cell disruption and release of soluble compounds called yeast extract. The RNA obtained from yeast extract has been widely exploited by industries producing extract by hydrolysis in order to supply, high concentrations of nucleotide flavor enhancers of the GMP (guanine-5- monophosphate) and IMP ( inosine-5- monophosphate). These RNA products and to promote the enhancement of flavor, have a high potential to prevent the immune system of humans and animals, thus allowing the reduction of excessive use of antibiotics in animals mainly cutting as chickens, pigs and farmed fish. This paper seeks to explore the technique of autolysis and the effect of time in producing the extract rich in RNA. The procedure for RNA extraction, three variables have the time it was divided into 12, 24 and 36 hours, and the pH was 4.5, 5.5 and 6.5 and % RNA. As RNA extraction results a function of time, pH, and % RNA, was better in the sample 4 was obtained where a percentage of 50.41% of yeast extract to the conditions of pH 4.5 at 24 hours. The worst extraction efficiency occurred at pH 6.5 and 36 hours resulting in a yield of 27.88%.

**Keywords :** RNA ; Yeast extract ; Autolysis



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema de classificação dos cinco reinos .....	14
Figura 2 - Estrutura do fungo .....	15
Figura 3 - Tipos de fungos que causam doenças .....	16
Figura 4 - Tipos de fungos úteis ao ser humano. ....	17
Figura 5 - Leveduras utilizada na indústria de bebidas e alimentos . ....	18
Figura 6 - Reação de fermentação .....	21
Figura 7 - Reação alcoólica.....	21
Figura 8 - Diagrama de uma célula vegetal, com a parede destacada em verde.....	26
Figura 9 - Reação alcoólica .....	28
Figura10 - Gráfico de superfície de linhas .....	34
Figura11 - Gráfico de superfície de resposta.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de autólise .....	30
Tabela 2 - Diluição das amostra após a autólise .....	30
Tabela 3 - Tabela de extração de RNA em porcentagem .....	33

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>MICRORGANISMOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	REINO FUNGI .....	15
2.2	FUNGOS QUE CAUSAM DOENÇAS .....	16
2.3	FUNGOS UTEIS AO SER HUMANO .....	17
2.4.	LEVEDURAS .....	17
<b>3.</b>	<b>LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>A UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA .....</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>RNA .....</b>	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b>AUTÓLISE .....</b>	<b>25</b>
<b>7.</b>	<b>APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.....</b>	<b>28</b>
<b>8.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>29</b>
8.1	MATERIAL E REAGENTES .....	29
8.2	PROCEDIMENTO.....	29
8.2.1	Preparação percentual em base seca.....	29
8.2.2	Preparação das amostras .....	29
8.2.3	Extração do RNA .....	31
8.2.4	Procedimento da análise de RNA de levedura .....	31
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de levedura na alimentação humana data do período mais remoto da humanidade. Sua utilização na panificação era descrita em documentos babilônicos e egípcios, datados de 2003 a.C. No oriente, fungos e leveduras são utilizados à séculos na elaboração de alimentos tais como molhos, condimentos e outros. Entre os fungos destacam-se o *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, a bactéria láctica *Pediococcus halophylus* e as leveduras *Saccharomyces roixii*, *Candida versatilis* e *Candida etchellsii*. Atualmente o uso de levedura é aplicado na 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, fez a incorporação de 16000 toneladas de *Candida utilis* na complementação de alimentação humana de forma a elevar o conteúdo protéico. (OLIVEIRA, 2008).

Atualmente o extrato de levedura é um aditivo protéico utilizado para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos como sopas desidratadas, bolachas, snacks e outros. O extrato de levedura é obtido pelo processo de autólise e secagem da fração solúvel e “*spray drier*” utilizando-se uma cultura pura de levedura ou biomassa recuperada de processos fermentativos, sendo constituído em maior parte por proteínas, aminoácidos, fibras, lipídios, vitaminas do complexo B, RNA, (nucleotídeos e nucleosídeos).

Extratos de levedura ricos em nucleotídeos têm sido muito valorizados pelas industriais de enaltecimento de sabor. O presente trabalho se justifica pelo fato da autólise tratar-se de um processo natural, econômico e com possibilidade da complementação da hidrolise do RNA a nucleotídeos no próprio autolisado utilizando-se uma enzima comercial como por exemplo a RNase. Neste contexto o objetivo deste

trabalho é produzir extrato de levedura pelo processo de autólise e avaliar o efeito do tempo e pH na concentração de RNA de extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. MICRORGANISMOS

Um dos sistemas de classificação taxonômica mais aceita para os organismos vivos é o sistema em cinco reinos (figura 1). Ele coloca todos os procariontes (organismos desprovidos de núcleo, no reino Monera (Prokaryotae) e coloca a maioria dos eucariontes (organismos cujas células contêm um núcleo distinto) no reino Protista (BLACK, 2002).

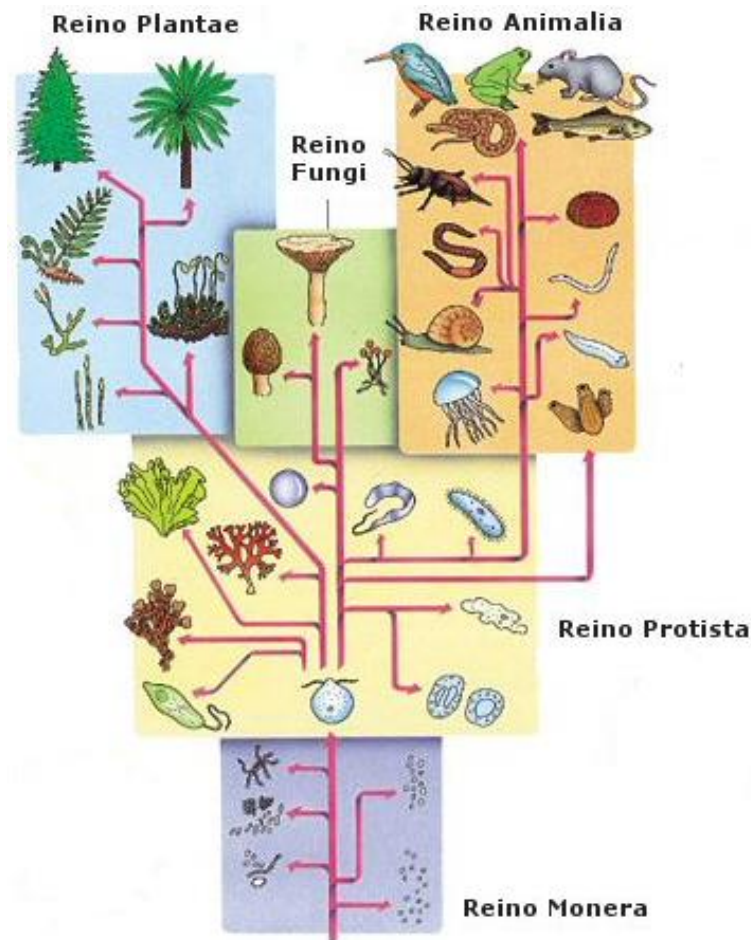
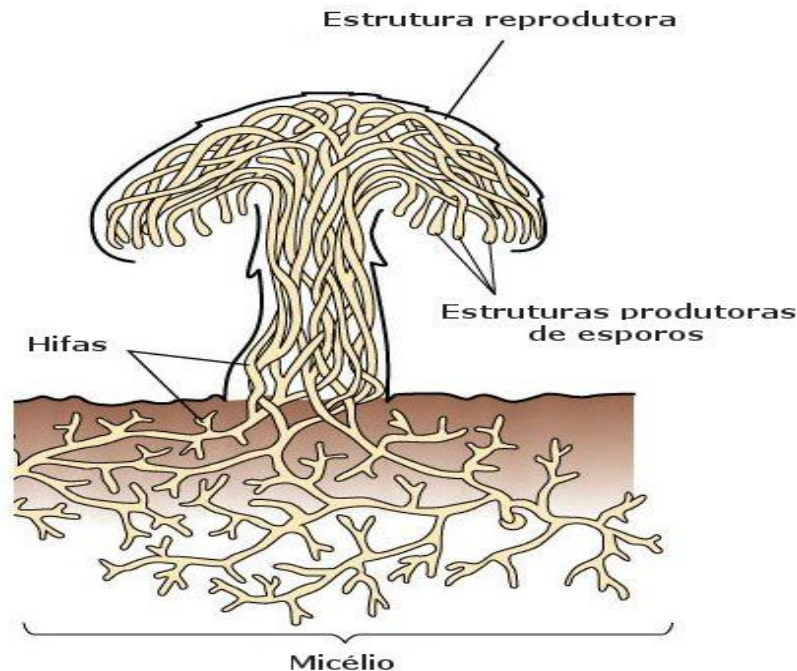


Figura 1: Sistema de classificação dos cinco reinos (In: [www.cientic.com](http://www.cientic.com))

As leveduras se encontram no reino fungi desta forma dar-se-á ênfase a este reino.

## 2.1 REINO FUNGI

O reino Fungi inclui principalmente organismos multicelulares e alguns unicelulares. Os fungos obtêm o seu alimento somente através da absorção de matéria orgânica oriunda de organismos mortos. Quando invadem organismos vivos, os fungos matam as células e então absorvem delas os nutrientes. Apesar dos fungos possuírem características em comum com as plantas, suas estruturas são muito mais simples em organização do que as folhas ou caules verdadeiros.



**Figura 2 : Estrutura do fungo (In: [www.infoescola.com](http://www.infoescola.com))**

Os fungos estão classificados como eucariotos e podem ser tanto unicelular como pluricelular, todos os tipos são heterótrofos, vivem em lugares úmidos e se reproduzem por esporos. Os bolores e as leveduras são exemplo de fungos. Podem provocar doenças dolorosas, como micoses, rinites, bronquites e asma; e manifestarem-se como

pragas nos meios de agricultura, como nas frutas e nas plantas, visto que são atraídas por meios com açúcar (SILVA, 2007).

As micoses são infecções na pele, unhas, ou outros sítios húmidos, provocadas pelos fungos. O nosso organismo está em equilíbrio com esses fungos, visto que estes residem na parte das células mortas da nossa pele. Nas plantas os fungos provocam doenças que tanto podem ser a nível da folha ou do fruto.

## 2.2 FUNGOS QUE CAUSAM DOENÇAS

Os bolores são espécies de fungos filamentosos que se desenvolvem em matéria orgânica, pois possuem a capacidade de decompor esta matéria orgânica. Possui um aspecto de algodão e podem ter uma coloração em tons esverdeados, azulados, avermelhados ou esbranquiçados. Alguns tipos de bolores são danosos aos alimentos (figura3).



(a)



(b)

**Figura 3: Tipos de fungos que causam doenças. Fruto da laranja, *Penicillium sp* (a); pão, *Rhizopus nigricans* (b); ((a)In:www.olhares.aeiou.pt, (b)In: www.biocurioso.blogspot.com)**



## 2.3 FUNGOS ÚTEIS AO SER HUMANO

Existem bolores que são úteis aos seres humanos, como as do gênero *penicillium* que são utilizados pelos cientistas como base para a produção de antibióticos (penicilina), usados para combater vários tipos de doenças ou ainda, os utilizados para a fabricação de alguns tipos de queijos (figura 4) tais como *Torulopsis osmofílica* e *Debaryomyces*.



(a)

(b)

**Figura 4: Tipos de fungos úteis ao ser humano. Gorgonzola, *Penicillium roquefortii* (a); ROQUEFORT, *Penicillium roquefortii* (b); (a)In:www.queijos-ap.blogspot.com, (b)In:www.houveumaocasiao.blogspot.com**

## 2.4 LEVEDURAS

As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente sob a forma unicelular, da ordem de 4 a 8 micras de largura por 7 a 12 de comprimento, havendo, evidentemente, espécies maiores e espécies menores. A maioria das leveduras apresenta-se no formato oval ([www.enq.ufsc.br](http://www.enq.ufsc.br))

A reprodução das leveduras ocorre de maneira assexuada (sem intervenção de gametas), através de um processo conhecido como brotamento. Desta forma, uma levedura pode gerar outras, sem a necessidade de outra levedura. A respiração das leveduras é anaeróbia facultativa, dependendo do ambiente em que se encontra; ou

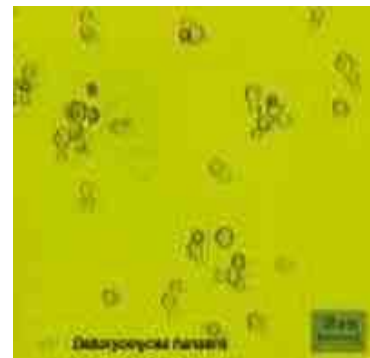
seja, se existe oxigênio suficiente ou não. Neste caso, o modo de obter energia, dependendo da quantidade de oxigênio, pode ser a fermentação ou a respiração aeróbia. O habitat ideal para as leveduras deve conter matérias orgânicas disponível, vivas ou mortas, geralmente as leveduras gostam de lugares com calor e umidade. Água, solo, troncos, folhas, frutos, sementes excrementos, insetos, alimentos frescos e processados, têxteis e inúmeros outros produtos fabricados pelo homem constituem substratos para o desenvolvimento de fungos. As leveduras possuem um faixa de temperatura de crescimento em torno de 0 – 35°C, a temperatura ótima é de 20 – 30°C e também um faixa de pH de crescimento em torno de 2,0-8,5, e o pH ótimo é de 4,5 - 5,5. Há em torno de 350 espécies de leveduras, algumas são apresentadas na (figura 5).



*Cândida utilis*



*Cryptococcus*



*Debaromyces*



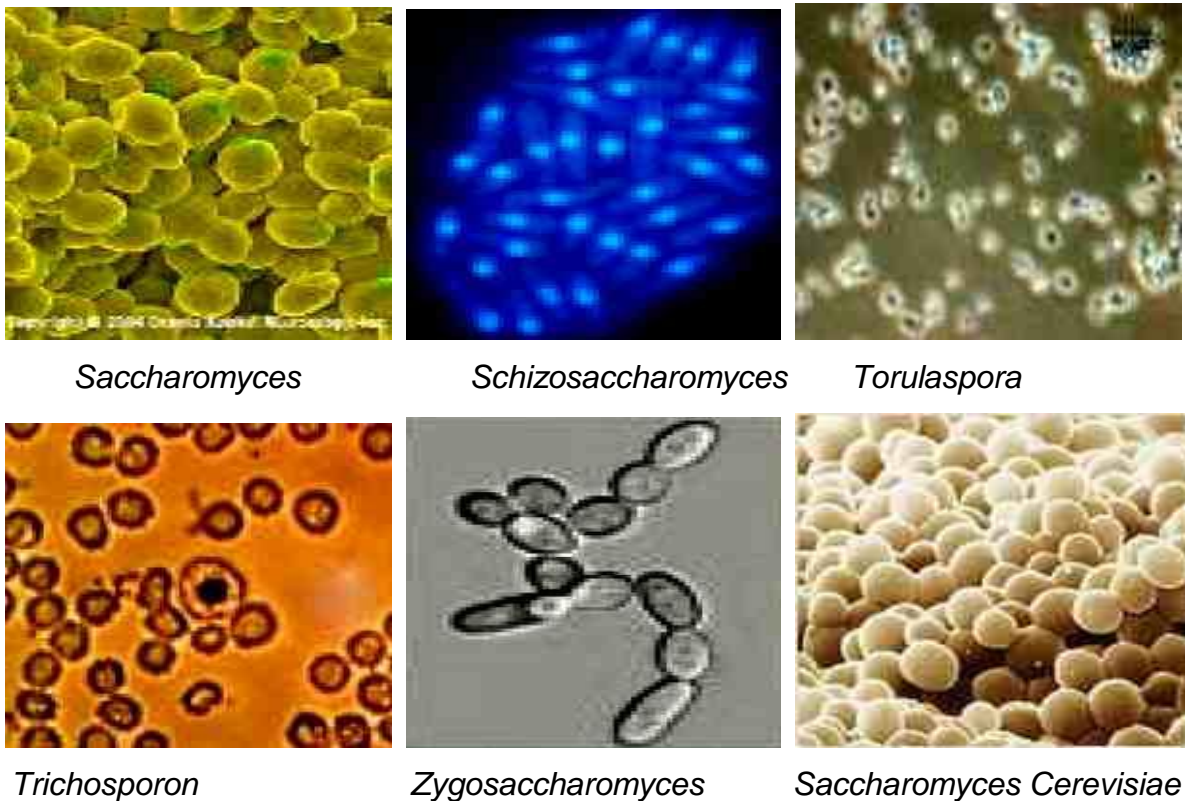
*Hanseniaspora*



*Kluyveromyces*



*Rhodotorula*



**Figura 5: Leveduras utilizadas na indústria de bebidas e alimentos. (In: [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br))**

As leveduras apresentam grande importância na indústria alimentícia e de bebidas, sendo os agentes da fermentação alcoólica. São utilizadas na produção do álcool industrial, em bebidas alcoólicas destiladas ou não destiladas, são utilizadas na panificação, e são importantes fontes de proteína e de fatores de crescimento, passíveis de serem utilizadas na alimentação animal e, mesmo, humana. Muitas espécies de fungos tem sido testadas e utilizadas para a produção de substâncias de interesse industrial ou médico (SILVA, 2007).

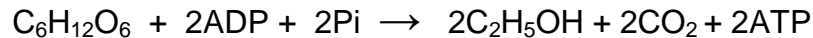
Além da aplicação em indústrias de fermentação, novos aspectos biotecnológicos têm sido explorados, inclusive de caráter ambiental, ou seja, os fungos podem atuar como agentes benéficos à melhoria do meio ambiente. No tratamento de resíduos líquidos e de solos poluídos; na mineralogia, na produção de biomassa, na tecnologia de combustíveis e no controle biológico.

Segundo J. Wang, C. Chen (2006), a poluição por metais pesados tem-se tornado um dos mais graves problemas ambientais da atualidade. Estes autores utilizaram a *Saccharomyces cerevisiae* no estudo de biossorção. E o resultado destas pesquisas demonstra que este microrganismo consegue adsorver metais pesados.

### 3. LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

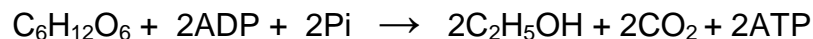
*Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariota unicelular que pertence ao Reino dos Fungos. É a levedura utilizada na produção do pão e também da cerveja, além de ser usada para a produção de etanol (RETTORI; VOLPE, 1999).

Esse fungo é utilizado como fermento biológico, por liberar dióxido de carbono, por exemplo, na massa de pão, fazendo-a crescer, conforme a reação da figura 6.



**Figura 6 : Reação de fermentação**

No caso das bebidas alcoólicas produzidas pelo processo de fermentação, a *Saccharomyces cerevisiae* converte o açúcar em álcool etílico e também pode contribuir na formação de constituintes secundários responsáveis pelo sabor - é o caso da cerveja, rum e uísque.



**Figura 7 : Reação alcoólica**

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo utilizado como modelo no estudo da Bioquímica, Genética e Biologia Celular de eucariotas. Isto porque é de fácil manutenção em laboratório e o conhecimento biológico sobre ela é bem desenvolvido - o seu genoma já foi sequenciado.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais estudadas para fins alimentícios. É utilizada na forma inativa desidratada ou como extrato. De todas as leveduras a desse gênero é a de maior valor industrial e comercial como realçador de sabor, aromatizantes e como complemento nutricional (YAMADA; ALVIM; SANTUCCI, 2003).

O extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* além de conter vitaminas apresenta elevado teor em proteína (30 % a 70%). Os produtos de levedura são ricos do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, ácido pantotênico , niacina , ácido fólico e biotina ), minerais em, em macro e microelementos , selênio e fibra dietética. Sua parede celular é composta por carboidratos , mananas e glicanas (YAMADA; ALVIM; SANTUCCI, 2003).

#### **4. A UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.**

Dentre todos os microrganismos a levedura é a que reúne as características mais favoráveis à sua utilização na alimentação animal. As leveduras aumentam a resistência a infecções, por possuírem componentes que aumentam a resposta imunológica. As leveduras também têm sido utilizadas por sua alta concentração de nutrientes que são facilmente disponíveis e de alto valor nutricional, sendo um excelente componente alimentar para todos os animais jovens e de rápido crescimento. Existe ainda na levedura o componente de função anti-stress aliviando o stress natural das operações de desmame, vacinação, transporte entre outros sendo muito utilizada na área veterinária ([www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br))

Nas décadas de 70 e 80, diversos trabalhos em zootecnia foram realizados tendo como único objetivo viabilizar a levedura no uso animal como uma fonte proteica alternativa (BARBALHO, 2009). Com isso, até ao início dos anos 90, as leveduras permaneceram "esquecidas", sendo seu uso viabilizado na alimentação animal apenas quando o custo se tornava interessante em função de sua composição nutricional de base protéica.

A partir de 1990, o crescente interesse por parte dos produtores de ração para criação de camarões e para o desmame de leitões, tanto da Europa como da Ásia, fez com que as indústrias adequassem seus procedimentos industriais, procurando o processamento de leveduras com alta qualidade, possibilitando o crescimento do mercado (BARBALHO, 2009).

Durante esta década o enfoque dos trabalhos zootécnicos realizados mudaram, visando a obtenção de resultados em melhorias de desempenho, prevenção de doenças e reforço do sistema imunitário e como resultado deste esforço científico, a indústria mundial passou a ver as leveduras como um aditivo profilático, com capacidade de melhorar a desempenho dos animais sujeitos a condições de stress ([www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br)).

## 5. RNA

Um grande número de pesquisas foram realizados nas décadas de 70 e 80, essas pesquisas utilizavam álcalis e ruptura mecânica de células para a produção de concentrados e isolados protéicos com menores concentrações de ácidos nucléicos da biomassa de leveduras.

Esses métodos mostraram-se eficientes na ruptura celular e na redução de RNA, embora provocam a perda de cerca de 30% de proteínas, a destruição dos aminoácidos, tornando a lisina indisponível, pela formação a lisinoalanina, prejudicial à saúde (OLIVEIRA, 2008).

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 maneira, 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.

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.

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 (OLIVEIRA, 2008).



## 6. AUTÓLISE

A autólise corresponde à destruição da célula por liberação de enzimas no citoplasma. Ela resulta da ruptura dos lisossomos no interior da célula, liberando suas enzimas digestivas, o que leva à destruição da célula por dissolução. Nos organismos pluricelulares, a provável função desse processo, quando não patológico, é a de remoção de células mortas ([www.klickeducacao.com.br](http://www.klickeducacao.com.br)).

Sempre que ocorre morte de alguma célula, instala-se a autólise, pela liberação de enzimas líticas do interior da célula, que realizam a digestão dos tecidos. Se uma célula é lesada ou agredida, ela pode se regenerar, mas existe um ponto de dano para o qual não há mais retorno, e então se instala a morte celular. A partir daí inicia-se a autólise. As enzimas são ativadas pelos íons  $\text{Ca}^{++}$  presentes no citoplasma das células (ao sair das lisossomas). A autólise cessa em determinado momento, com a entrada de uma quantidade excessiva de  $\text{Ca}^{++}$  na célula. Ocorre então a coagulação do citoplasma (WANG, 2006).

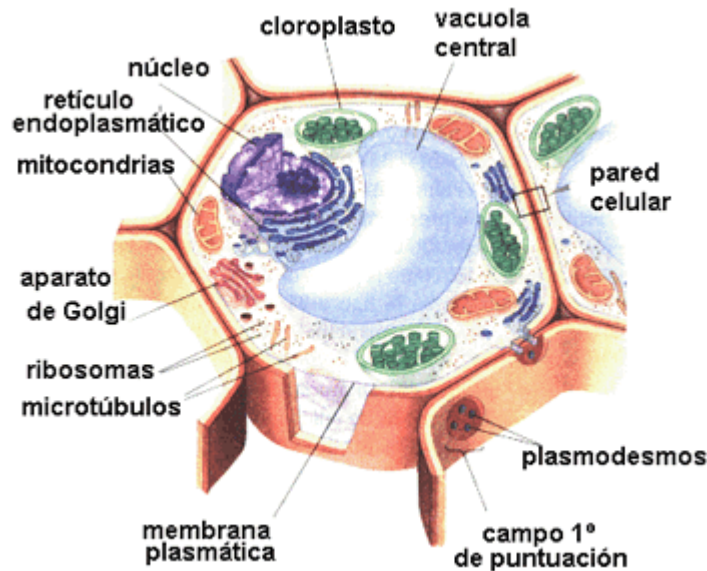
O estudo para produção de extrato de levedura por processo de autólise deve incluir várias formas operacionais, tais como a separação de insolúveis, classificação, concentração e secagem, mas o mais importante é a determinação dos melhores parâmetros de rompimento celular.

Células que são envolvidas apenas por membranas celulares apresentam uma relativa facilidade de ruptura pelo fato de serem frágeis, que pode ocorrer por simples variação da pressão osmótica ou aplicação de ultra-som de baixa intensidade.

As células que são constituídas por parede celular necessitam de condições mais específicas de rompimento. Como no caso das leveduras que apresentam membrana plasmática, e parede celular constituída principalmente por polímeros rígidos de glucanas, mananas e quitina (OLIVEIRA, 2008).

O mecanismo bioquímico que leva a ruptura da parede celular da levedura está relacionado há enzimas endógenas (glucanas, mananas e quitinases) da própria célula.

Esse 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. A parede celular da levedura é constituída por duas camadas principais, uma interna que é de glucana e uma externa de manana, sobreposta á camada de glucana (figura 6).



**Figura 8: Diagrama de uma célula vegetal, com a parede celular destacada (In:www.sobiologia.com.br/figuras/Seresvivos/celulavegetal.gif)**

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 e mudança e crescimento contínuo. ( OLIVEIRA, 2008).

O desempenho produtivo e a composição químico-bromatológica do filé de tilápia-do-nilo alimentada com rações contendo levedura íntegra desidratada, levedura autolisada e parede celular. Foram avaliadas as rações práticas, isoprotéicas (32% de proteína digestível) e isoenergéticas (3.200 kcal de energia digestível por kg) suplementadas com levedura íntegra (1, 2 e 3%), levedura autolisada (1, 2 e 3%) e parede celular (0,1; 0,2 e 0,3%), e uma controle, sem ingredientes-teste. O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado, com dez tratamentos e quatro repetições. Peixes que receberam rações suplementadas com levedura e derivados apresentaram índice de desempenho produtivo superior ao controle. A suplementação da levedura autolisada proporcionou melhor resposta quanto ao ganho de peso ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença na composição química bromatológica do filé, quando se compararam os contrastes entre totais de tratamento (HISANO, 2007).

.A suplementação de levedura e derivados em rações para alevinos de tilápia-do-nylo melhora o desempenho produtivo, sem alterações na composição do filé, e entre os microingredientes avaliados, a levedura autolisada proporciona desempenho superior, quando utilizada entre 1,30 e 1,59% (HISANO, 2007).

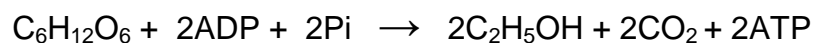
## 7. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

No ensino de química pode-se utilizar o tema deste trabalho para demonstrar a importância do uso de microrganismos no cotidiano. Neste contexto o professor pode explorar a importância histórica do uso das leveduras, bem como o conceito e aplicação do processo de fermentação.

A área de alimentos é um ramo da química em destaque sendo uma área da ciência que envolve outras áreas de conhecimento como a Biologia, Biotecnologia, Física e engenharias.

A fermentação alcoólica (figura 9) é um fenômeno que se realiza pela ação de microrganismos (leveduras), através da respiração anaeróbica de algumas bactérias e leveduras que são fungos unicelulares, sobre os açúcares, produzindo etanol e gás carbônico.

A matéria-prima é *saccharomyces cerevisiae* utilizada na indústria de panificação e vendida comercialmente, portanto de fácil obtenção, o que permite que o professor faça um experimento demonstrando o processo da fermentação (FERREIRA, 1999).



**Figura 9 : Reação alcoólica**

## **8. METODOLOGIA**

### **8.1 MATERIAL E REAGENTES**

Biomassa de levedura de panificação (Fleischman Royal), trocador de calor tubular Banho-maria(Tecnal),espectrofotômetro UV (Fento), centrífuga refrigerada (Hitachi), agitador mecânico e magnético (Fisatom), balança analítica (Metler), vidrarias comuns de laboratório, cloreto de sódio (Synth), ácido clorídrico (Synth), ácido perclórico (Merck), cloreto férrico (Merck), orcinol (Sigma).

### **8.2 PROCEDIMENTO**

#### **8.2.1 Preparação percentual em base seca**

Foram pesados 1Kg de fermento e triturados num recipiente plástico. Pesou-se três amostras. Colocou-se as amostras na estufa a 100°C por 4 horas.Tirou-se as amostras da estufa que novamente foram pesadas para obter uma média denominada extrato de base seca.

#### **8.2.2 Preparação das amostras**

Pesou-se as nove amostras, a partir do extrato de base seca, em um Becker de 600mL, e em seguida foi adicionado 47g de fermento fresco, 1,5g de cloreto de sódio e completou-se com água destilada até atingir o volume de 100mL. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 55°C.

As amostras foram divididas em três grupos: o primeiro grupo foi constituído das amostras 1,2 e 3 e retiradas após 12horas do banho-maria, o segundo grupo foi constituído das amostras 4,5 e 6 e retiradas após 24horas e o terceiro grupo constituído pelas amostras 7,8 e 9 e retiradas após 36horas conforme apresentado na Tabela 1.

Grupo	Tempo	Amostra
1	12 horas	1,2,3
2	24 horas	4,5,6
3	36 horas	7,8,9

**Tabela 1 - Tempo de autólise**

Em seguida, as amostras foram centrifugadas duas vezes por cinco minutos. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para a extração de RNA.

As amostras foram diluídas para um volume de 150 mL o conforme a tabela 2. Em seguida procedeu-se a extração de RNA aplicando-se tempo e temperatura estipulados.

Amostras	T°C	Tempo	Volume de extrato	diluição
1	55	12h	150 mL	10 vezes
2	55	12h	150 mL	10 vezes
3	55	12h	150 mL	10 vezes
4	55	24h	150 mL	20 vezes
5	55	24h	150 mL	20 vezes
6	55	24h	150 mL	20 vezes
7	55	36h	150 mL	50 vezes
8	55	36h	150 mL	50 vezes
9	55	36h	150 mL	50 vezes

**Tabela 2 – Diluição das amostra após a autólise**

### 8.2.3 Extração do RNA

- Pesou-se 1 g de amostra em base seca. Adicionou-se 25 mL de  $\text{HClO}_4$  0,25 N gelado.
- As amostras foram então deixadas por 30 minutos em banho de gelo com agitação.
- Após os 30 minutos as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm/15min.
- O sobrenadante foi descartado.
- No resíduo adicionou-se mais 10 mL de  $\text{NaOH}$  0,3N e deixou-se em banho a  $37^\circ\text{C}$ /1hora, e depois centrifugou-se a 3000 rpm/15minutos.
- O sobrenadante I foi armazenado em um recipiente plástico.
- Ao resíduo, adicionou-se 10 mL de  $\text{HClO}_4$  1N e deixou-se em repouso por 20 minutos em banho de gelo, e depois centrifugou-se a 3000 rpm/15minutos.
- O sobrenadante II foi misturado ao I e armazenado em um recipiente plástico.
- Ao resíduo adicionou-se 10 mL de  $\text{HClO}_4$  1N e deixou-se em repouso por 20 minutos em banho de gelo, e depois centrifugou-se a 3000 rpm/15minutos.
- O sobrenadante III foi misturado ao I e II e armazenado em um recipiente plástico.
- O resíduo foi descartado.

### 8.2.4 Procedimento da análise de RNA de levedura

- Colocou-se em um tubo 5mL de extrato e 5mL de  $\text{HClO}_4$  0,25N.
- Levou-se o tubo a ebulição por 30 minutos.
- Resfriou-se em banho de gelo.

- Preparou-se um série de tubos. Nesses tubos foram adicionados extrato, HCl 0,1N e orcinol.
- Levou-se os tubos a ebulição por 30 minutos.
- Resfriou-se em seguida no banho de gelo.
- Fez-se a leitura da absorbância em 670nm.



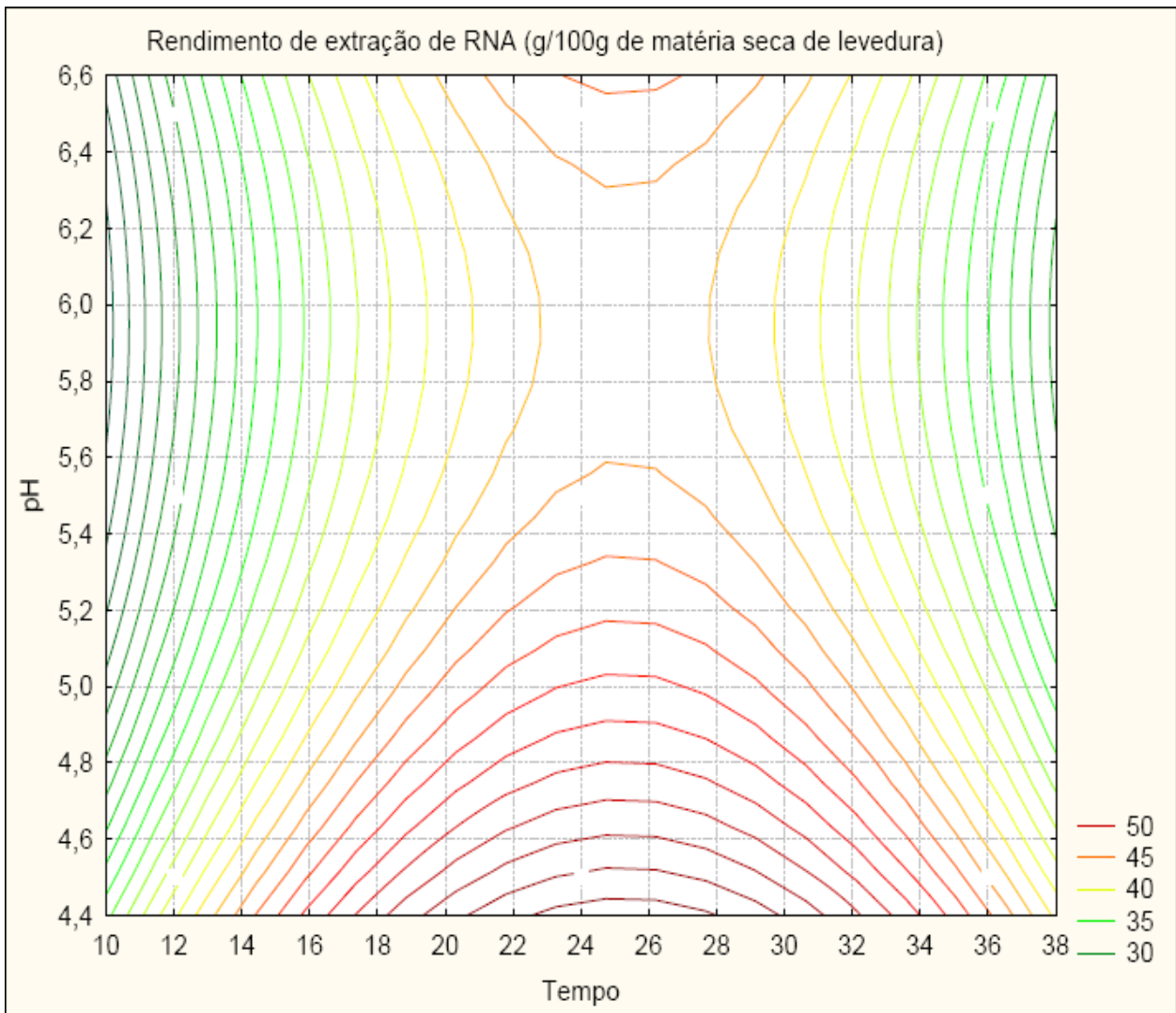
## 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3 são apresentados os resultados da extração do RNA em função do tempo, pH, para obtenção da % de RNA. Nesta tabela, pode-se verificar que a melhor extração ocorreu na amostra 4 onde foi obtida uma porcentagem de 50,41% de extrato de levedura para as condições de pH 4,5 no tempo de 24 horas. A pior eficiência de extração ocorreu em pH 6,5 e em 36 horas obtendo-se um rendimento de 27,88%.

Amostras	Tempo	pH	%RNA
1	12	4,5	36,95
2	12	5,5	30,31
3	12	6,5	35,82
4	24	4,5	50,41
5	24	5,5	41,33
6	24	6,5	49,27
7	36	4,5	48,3
8	36	5,5	40,03
9	36	6,5	27,88

**Tabela 3: Tabela de extração de RNA em porcentagem**

Com os dados da tabela 3 foi confeccionado o gráfico de superfície de linhas (figura 10) de pH em função do tempo. Nesta figura pode-se confirmar os resultados da tabela 4 pelo aumento das intensidades das linhas vermelhas. A intensidade da linha verde fornece a menor eficiência na extração sendo obtida em pH 6,5 no tempo de 36 horas.



**Figura 10: Gráfico de superfície em linhas.**

No gráfico de superfície de resposta apresentado na figura 11, onde tem-se as variáveis % RNA, pH e tempo. Nesta figura pode-se melhor visualizar os valores obtidos na extração do RNA. A melhor resposta é dada pela intensidade da cor vermelha assim no gráfico é dado 24 horas, pH 4,5 obtendo-se uma extração de RNA de 50,41%.

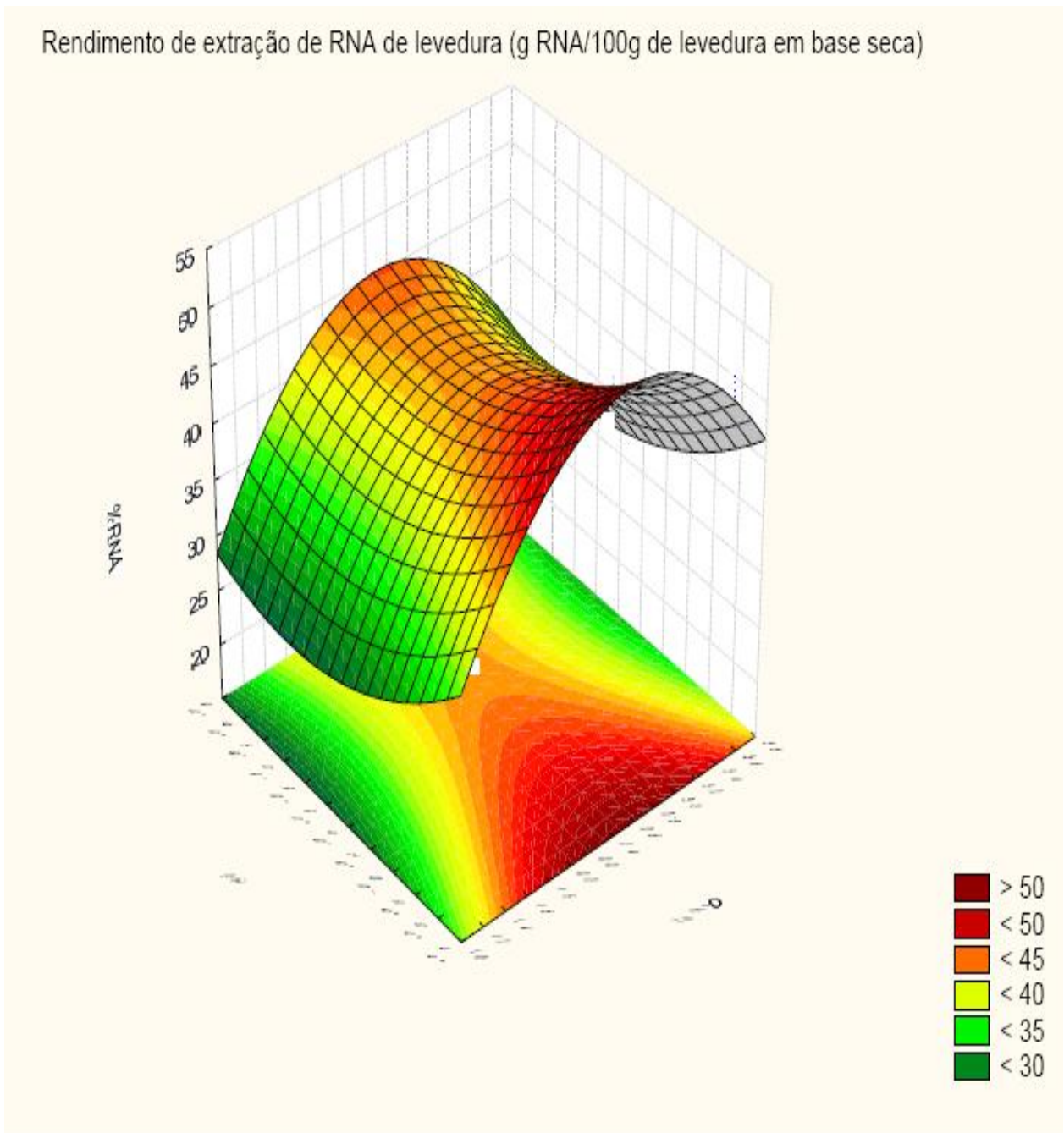


Figura 11: Gráfico de superfície de resposta

## 10. CONCLUSÃO

Através da tabela de extração de RNA em porcentagem e dos gráficos de superfície de linhas e respostas, concluiu-se que melhor extração de RNA ocorreu em pH 4,5 no tempo de 24 horas, obtendo-se 50,41%. A pior extração foi em pH 6,5 no tempo de 36 horas, obtendo-se 27,88%.

## REFERÊNCIAS

BARBALHO, R., L., C.: **Suplementação de levedura hidrolisada (Hilyses) nas dietas de frangos de corte**. 2009. Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

BLACK, J. G. Microbiologia – **Fundamentos e Perspectivas**, Ed. Guanabara Koogan 4<sup>a</sup> Ed. RJ. P. p.829, 2002.

Diagrama de uma célula vegetal, com a parede celular destacada. Disponível em (In: [www.sobiologia.com.br/figuras/Seresvivos/celulavegetal.gif](http://www.sobiologia.com.br/figuras/Seresvivos/celulavegetal.gif)) acesso em novembro de 2010.

EA YAMADA, ID ALVIM, MCC SANTUCCI, VC. Composição **centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados**, 2003. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732003000400006&script=sci\\_arttext&lng=in](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732003000400006&script=sci_arttext&lng=in)> Acesso em agosto de 2010.

Estrutura do fungo. Disponível em: (In: [www.infoescola.com](http://www.infoescola.com)) acesso em setembro de 2010.

Fermentação disponível em: <http://www.profcupido.hpg.ig.com.br/bioquimicafermentacao.htm> acesso em 18/072010

FERREIRA, E., C.; Montesoólca, R., A química da produção de Bebidas alc  
**Revista QUÍMICA NOVA NA ESCOLA** Produção de Bebidas Alcoólicas N° 10, NOVEMBRO 1999 disponível em: <http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc10/exper1.pdf>> acesso 25/07/2010.

H HISANO, WV Narváez-Solarte, MM Barros. **Desempenho produtivo de alevinos de tilapia-do-nilo alimentos com levedura e derivados**, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n7/17.pdf> Acesso em agosto de 2010.

J WANG, Chen C - **Avanços da Biotecnologia**, Ed. Elsevier 2006 p. 427-451.

Leveduras disponível em:

<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/leveduras/leveduras.php> acesso em 12/07/2010

Leveduras disponível em:  
[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad2004/microorganismos/leveduras.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/microorganismos/leveduras.htm) acesso em 22/07/2010

OLIVEIRA, Antonio M. **Otimização da autólise de *Saccharomyces cerevisiae* de cervejaria e extração de RNA.** 2008. 3p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

O que é autólise disponível em: <  
[http://www.klickeducacao.com.br/bcoresp/bcoresp\\_mostra/Biologia/0,6674,PIG-853-9024,00.html](http://www.klickeducacao.com.br/bcoresp/bcoresp_mostra/Biologia/0,6674,PIG-853-9024,00.html) > acesso 25/07/2010.

Rettori, D; Volpe P. L. O. **Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*.** Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas – SP, 1999. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200018&script=sci\\_arttext&tlng=in](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200018&script=sci_arttext&tlng=in)> Acesso em agosto de 2010.

SILVA, C., J., **As leveduras são nossas amigas!** Disponível em:  
<http://biovalsassina.blogspot.com/2007/06/as-leveduras-so-nossas-amigas.html> acesso em 18/07/2010.

Sistema de classificação dos cinco reinos. Disponível em: (In: [www.cientic.com](http://www.cientic.com)) acesso em setembro de 2010.

Tipos de fungos que causam doenças. Disponível em: (a)In:[www.olhares.aeiou.pt](http://www.olhares.aeiou.pt), (b)In:[www.biocurioso.blogspot.com](http://www.biocurioso.blogspot.com)) acesso em julho de 2010.

Tipos de fungos úteis ao ser humano. Disponível em: (a)In:[www.queijosap.blogspot.com](http://www.queijosap.blogspot.com), (b)In:[www.houveumaocasio.blogspot.com](http://www.houveumaocasio.blogspot.com) acesso em julho de 2010.

