



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ARIANE GASPAR COSTA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MANOPROTEÍNAS DA PAREDE CELULAR DE  
LEVEDURA DE CERVEJARIA E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES EMULSIFICANTES**

---

Londrina  
2008

ARIANE GASPAR COSTA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANOPROTEÍNAS  
DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA DE CERVEJARIA E  
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Goméz

Londrina  
2008

ARIANE GASPAR COSTA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANOPROTEÍNAS DA  
PAREDE CELULAR DE LEVEDURA DE CERVEJARIA E  
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Goméz  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Sueli Obara Doi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Fábio Yamashita  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 03 de julho de 2008.

*Aos meus pais, Duarte e Maria de Lourdes,  
por iluminarem meus caminhos  
e darem asas aos meus sonhos...*

*Às minhas irmãs Alessandra,  
Angélica e Adrielly, por  
estarem sempre presentes mesmo  
a distância, com carinho eu  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização deste trabalho envolveu a participação direta ou indireta de pessoas e instituições, que colaboraram de forma material, científica ou emocional. Dentre estes, gostaria de citar:

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A cervejaria Fabrica-1 de Londrina, Paraná, em especial os membros da direção, o mestre-cervejeiro Aguinaldo e os funcionários Aauto, Dalto e Felipe, pela doação do creme de levedura e por toda a atenção despendida.

O Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela estrutura e equipamentos disponibilizados.

Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Goméz, pela orientação, amizade e paciência durante estes dois anos de trabalho.

Dr. Fábio Yamashita e Dra. Sueli Obara Doi, membros da banca de qualificação e defesa, pela contribuição científica.

Os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, pela transmissão de conhecimentos.

Os funcionários Alessandra, Berenice, Célia, Maria Alice, Elza, Marília, Nelson e Rubens, do departamento de ciência e tecnologia de alimentos, Sílvia, do departamento de bioquímica, pelos ensinamentos e colaboração durante os experimentos. Em especial, Elizabete Regina Marangoni Marana, do departamento de virologia animal, pela realização das análises em eletroforese.

Os “irmãos científicos” Caroline, Cláudio, Elisângela, Fernanda, Leonardo, Luciane e Luís pela amizade e por tornarem a rotina de laboratório mais feliz. Especialmente Marciane, pela dedicação e por ter sido muito mais que uma amiga.

Os que se tornaram amigos durante o mestrado e os que são amigos há mais tempo, em especial Alexandre, Alline, Ana Augusta, Ariane, Camila, Cassiana, Daiana, Daniel, Daryne, Denis, Érica, Elvis, Fabrício, Fernanda, Isabella, João, Laís, Maurício, Nádia e Roberta, por estarem presentes em todos os momentos.

Meu Bruno, pela paciência, companheirismo e amor incondicional.

Minha família, base do meu ser, pelo apoio e carinho.

Deus, por permitir que tudo isso acontecesse.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

*“Na natureza nada se cria,  
nada se perde, tudo se  
transforma”.*  
**Antoine Laurent Lavoisier**

COSTA, Ariane Gaspar. **Extração e caracterização de manoproteínas da parede celular de levedura de cervejaria e avaliação das propriedades emulsificantes.** 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

Volumes consideráveis de células de levedura são descartados por indústrias de bebidas fermentadas e destilarias de álcool. A biomassa de levedura após a produção de cerveja é matéria prima para extração de componentes celulares, incluindo a manoproteína. O presente trabalho avaliou a viabilidade da utilização da levedura *Saccharomyces sp.*, descartada em cervejaria após processo de fermentação, para extração de manoproteínas. A extração foi conduzida conforme delineamento fatorial incompleto, Box-Behnken <sup>3</sup>, para as variáveis temperatura (75°C, 85°C e 95°C), tempo, em horas (5, 7 e 9) e concentração (10%, 15% e 20%) da suspensão de parede celular. Os resultados evidenciaram que o etanol residual do processo fermentativo não interfere na obtenção de manoproteínas. O maior índice de extração foi 4,08%, obtido nas extrações a 95°C para a concentração 10% durante 7 horas e 15% por 9 horas. A validação experimental para obtenção do maior índice predito resultou em 4,5% de manoproteína, confirmando a capacidade preditiva do modelo. A manoproteína obtida nas condições previstas de 95°C, 9 horas e 10% de parede celular, apresentou 51,39% de proteínas e 25,89% de carboidratos, distribuídos entre manose e glicose. Na fração protéica foram encontradas proteínas de peso molecular 58kDa e 64kDa. A determinação da atividade emulsificante de 62,5±0,88% e da estabilidade da emulsão de 96±1,4% permitiram caracterizar a manoproteína obtida como um bioemulsificante. Estes resultados demonstraram o valor potencial da levedura descartada como subproduto industrial, na obtenção de manoproteína com propriedades interessantes para a indústria cosmética e de alimentos.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces sp.* Manoproteína. Bioemulsificante. Levedura cervejeira.

**COSTA, Ariane Gaspar. Extraction and characterization of mannoproteins from brewer's yeast cell wall and evaluation of emulsifier properties.**

2008. 55 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

**ABSTRACT**

Considerably amounts of yeast cells are discarded by fermented beverages industries and alcohol distilleries. The biomass of yeast after beer production is a raw-material for cell components extraction, including mannoproteins. The present study evaluated the using viability of spent brewer's yeast *Saccharomyces* sp., after lower fermentation processes, for mannoproteins extraction. The extraction was conducted by Box-Behnken 3<sup>3</sup> incomplete design, for the variables temperature (75°C, 85°C and 95°C), time in hours (5h, 7h e 9h) and concentration (10%, 15% and 20%) of cell wall in suspension. The results show that the residual ethanol doesn't have interference in mannoproteins obtaining. The highest rate of mannoprotein was 4,08%, obtained at 95°C, for 10% cell wall by 7 hours and for 15% of cell wall in during 9 hours. The experimental validation for obtaining of the maximum predicted of mannoprotein resulted in 4,5%, confirming the model predictable capacity. The mannoprotein obtained by predicted conditions of 95°C, 9 hours and 10% of cell wall, had 51,39% of proteins and 25,89% of carbohydrates, distributed in mannose and glucose. The molecular weight determined for proteins was 58kDa and 64kDa. Emulsification activity of 62,5±0,88% and emulsion stability of 96±1,4% characterized the mannoprotein obtained as a bioemulsifier. These results show the potential of brewer's yeast spent as an industrial byproduct for mannoprotein production with interesting properties for cosmetic and food industries.

**Keywords:** *Saccharomyces* sp. Mannoprotein. Bioemulsifier. Brewer's yeast.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura de oligomanoses da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* formadas por ligações tipo N e tipo O .....18
- Figura 2** – Concentração de etanol no sobrenadante de cada lavagem por centrifugação .....30
- Figura 3** – Gráfico de contorno dos efeitos da temperatura e do tempo no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria .....35
- Figura 4** – Gráfico de contorno dos efeitos do tempo e da concentração de parede celular no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria .....35
- Figura 5** – Gráfico de contorno dos efeitos da concentração de parede celular e da temperatura no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria .....36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resultado dos processos de autólise e extração de manoproteínas para frações com e sem etanol .....	31
<b>Tabela 2</b> – Composição centesimal referente às suspensões de creme de levedura e parede celular com e sem etanol, expressas em base seca .....	31
<b>Tabela 3</b> – Variáveis codificadas e reais de cada tratamento para extração das manoproteínas e o índice correspondente .....	33
<b>Tabela 4</b> – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de primeira ordem determinado pelo delineamento Box-Behnken $3^3$ .....	34
<b>Tabela 5</b> – Composição centesimal da manoproteína em base seca .....	37

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1	APROVEITAMENTO DE LEVEDURAS UTILIZADAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS .....	14
3.2	PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS .....	16
3.3	MANOPROTEÍNAS DE LEVEDURAS .....	17
3.3.1	Propriedades Emulsificantes de Manoproteínas .....	19
3.3.2	Obtenção de Manoproteínas .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
	Artigo: “Extração e caracterização de manoproteínas da parede celular de levedura de cervejaria e avaliação de propriedades emulsificantes”. (A ser submetido ao periódico Brazilian Journal of Food Technology) .....	24
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
	<b>ANEXOS</b> .....	49
	ANEXO A .....	50
	ANEXO B .....	54
	ANEXO C .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras, principalmente *Saccharomyces sp.*, representam o grupo de microrganismos mais explorado comercialmente. Suas propriedades biológicas e metabólicas são empregadas desde a antiguidade para elaboração de produtos fermentados, como pães, cervejas e vinhos. Atualmente, o potencial de leveduras extrapola a produção de alimentos e seus produtos biotecnológicos são utilizados em indústrias químicas, farmacêuticas, agrícolas, de biocombustíveis e na área ambiental.

Em alguns processos industriais a levedura atua apenas como agente de transformação, sendo descartada após a produção. Em indústrias de cerveja, vinhos e destilarias de etanol são gerados grandes excedentes de levedura, que são liberados na rede de esgoto ou doados para a alimentação animal. A fim de reduzir os impactos ambientais gerados pelo descarte e aumentar o valor agregado deste subproduto, diversos estudos tem focado o fracionamento das células de leveduras. Polissacarídeos de origem microbiana têm sido estudados por apresentarem características biotecnológicas importantes como solubilidade, retenção de água e capacidade emulsificante, que são muito visadas na indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos. Além disso, propriedades imunoestimulantes também têm sido atribuídas aos componentes da parede celular de leveduras.

As células de levedura são envolvidas por uma parede celular rígida que corresponde a cerca de um quarto do peso seco da célula. Esta estrutura é composta principalmente pelos polissacarídeos quitina, glucana e manana, sendo este último ligado a proteínas formando manoproteínas.

As manoproteínas representam de 20 a 23% da parede celular e suas propriedades imunoestimulantes e bioemulsificantes vem sendo relatadas, tornando-as consideravelmente atrativas para aplicação industrial. Assim sendo, o desenvolvimento de metodologias para extração de manoproteínas a partir de leveduras descartadas em processos biotecnológicos é de suma importância.

## 2 OBJETIVOS

- Avaliar a viabilidade do creme de levedura, descartado após o processo de produção de cerveja, como matéria prima para extração de manoproteínas;
- Estabelecer uma metodologia de baixo custo para extração de manoproteínas e caracterizar a manoproteína obtida;
- Avaliar as propriedades emulsificantes da manoproteína obtida.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 APROVEITAMENTO DE LEVEDURAS UTILIZADAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

Leveduras são fungos unicelulares amplamente utilizados na indústria de panificação e de etanol (FREIMUND et al., 2003). Compreendem um grupo de microrganismos amplamente explorado comercialmente, devido as inúmeras possibilidades de emprego industrial de suas propriedades biológicas (BAPTISTA, 2001), dentre as quais a fermentação.

Sob o ponto de vista bioquímico entende-se por fermentação o processo de degradação do substrato na ausência de oxigênio realizado por microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, visando à produção de energia e gerando produtos intermediários como etanol, acetona ou ácido láctico. Industrialmente o termo fermentação caracteriza qualquer transformação intermediada por microrganismos através de uma seqüência de reações bioquímicas, incluindo respiração, biossíntese e fotossíntese (SILVEIRA; MOLINA, 2002).

O consumo de alimentos fermentados vem aumentando desde a década de 70, incluindo produtos lácteos como iogurtes, queijos, soro de leite, bem como embutidos, bebidas alcoólicas fermentadas, vegetais, frutas e molhos. Um dos motivos desse aumento é que estes alimentos são considerados saudáveis (GIRAFFA, 2004).

A importância das leveduras em indústrias de alimentos e bebidas foi concretizada somente em meados de 1860, quando seu papel na produção de alimentos tornou-se evidente (QUEROL et al., 2003). No entanto, leveduras são usadas desde a antiguidade na produção pães, vinhos e cervejas. Atualmente, produtos biotecnológicos provenientes de leveduras são empregados em muitos setores importantes, como as indústrias de alimentos, de bebidas, de biocombustíveis e produtos químicos, de enzimas, de produtos farmacêuticos e de produtos agrícolas (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

Dentre as leveduras destaca o gênero *Saccharomyces* devido a seu elevado valor industrial e comercial (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000), sendo

amplamente empregadas em processos fermentativos industriais e para panificação na sua forma ativa (YAMADA et al., 2003).

No Brasil, a produção da levedura *Saccharomyces* destina-se, principalmente, a três setores industriais importantes: panificação, sucro-alcooleiro e cervejeiro. Normalmente nestes processos a levedura atua como agente biológico de transformação e ao final do processo produtivo é descartada como subproduto (FIALHO, 2004). Nas destilarias de etanol e cervejarias são gerados grandes volumes de células de leveduras excedentes. Assim, faz-se necessária uma busca para aplicações destes microrganismos após a utilização no processo primário, a fim de diminuir os impactos ambientais decorrentes do descarte. Além disso, o valor agregado desse subproduto tornaria esses setores agroindustriais mais rentáveis.

Além de apresentar elevado teor em proteína (30% a 70%), os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B, em minerais, em macro e microelementos, particularmente selênio e fibra dietética, representada por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glucanas (YAMADA et al., 2003). As células de levedura excedentes podem ser utilizadas diretamente, quando íntegras, ou serem processadas para obtenção de inúmeros derivados. Na forma inativa, células de levedura são muito usadas na alimentação animal como fonte de proteína e outros nutrientes (YAMADA et al., 2003). Entretanto, sua utilização tem sido limitada pela presença de parede celular, que é espessa, rígida e muito resistente à ação de enzimas digestivas (GALVEZ; RAMÍREZ; GARCIA-GARIBAY, 1990). E, além disso, pelo alto conteúdo de ácidos nucleicos, que levam à formação de cálculos no tecido urinário e deposição de cálcio nos tecidos moles (LYUTSKANOV et al., 1990). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de processamento da biomassa, que permitam minimizar estes problemas é de suma importância (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000).

Atualmente, há uma forte tendência em explorar o isolamento de alguns dos principais constituintes de leveduras, como enzimas (invertase, lactase) nucleotídeos, proteínas (manoproteínas), polissacarídeos (glucana, manana), além de lipídios, como fosfolipídios e ergosterol (KOLLAR; STURDIK; SAJBIDOR, 1992; BELEM; LEE, 1997; BELEM; LEE, 1998). Estes componentes, quando isolados, apresentam propriedades tecnológicas interessantes.

O valor nutritivo de preparados de células íntegras e rompidas mecanicamente, bem como de concentrados protéicos de *Saccharomyces sp.*, vem

sendo estudado (RUMSEY et al., 1991; PACHECO, CABALLERO-CÓRDOBA, SGARBIERI, 1997). Sabe-se que isolados protéicos obtidos a partir de levedura demonstraram melhor qualidade nutricional do que as células íntegras. Possivelmente porque o conteúdo de ácidos nucléicos e de componentes ativos indesejáveis, bem como o efeito deletério da parede celular sobre a biodisponibilidade de nutrientes ficam atenuados (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000).

Neste contexto, a busca de métodos para o isolamento de componentes das células de levedura representa uma alternativa promissora para aproveitamento deste subproduto industrial.

### 3.2 PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

A parede celular de leveduras é responsável pela forma da célula e a integridade do organismo durante o crescimento e divisão celular. Esta estrutura deve ter resistência para manter o balanço osmótico e plasticidade para permitir remodelações decorrentes do ciclo celular (MAGNELLI; CIPOLLO; ABEIJON, 2002). É uma estrutura rígida que representa cerca de 20 a 25% do peso seco da célula (NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998), constituída principalmente por polissacarídeos compostos por três açúcares: glucose, manose e N-acetilglicosamina (CABIB et al., 2001), que formam as  $\beta$ -glucanas, mananas e quitina, respectivamente.

Os polissacarídeos de manose unem-se a proteínas para formar uma camada de manoproteínas, localizada na superfície externa da parede (CABIB et al., 2001). Adicionalmente, algumas proteínas se conectam as proteínas estruturais da parede por pontes dissulfeto (CASTRO et al., 1999; KLIS et al., 2002). A força mecânica da parede celular se deve, principalmente, a porção interna, que é constituída de  $\beta$ -glucana e quitina, e representa aproximadamente 50 a 60% do peso seco da parede (KLIS et al., 2002)

As  $\beta$ -glucanas têm importância estrutural, atuando na ligação e estabilização da parede celular. As cadeias  $\beta$ -1,6-glucana são fundamentais na arquitetura da parede porque ancoram a maioria das manoproteínas da parede

celular e também estão associadas covalentemente às  $\beta$ -1,3-glucanas e quitinas (KOLLAR et al., 1997).

Os polissacarídeos conferem propriedades estruturais à parede celular, enquanto as manoproteínas atuam como um preenchimento e são importantes para a permeabilidade da parede, pois além de reter as proteínas periplasmáticas, limitam o acesso de enzimas estranhas à célula (KOLLAR et al., 1997; KIM; YUN, 2006).

A camada externa, composta de manoproteínas, representa de 20 a 23% do peso seco da parede celular (KLIS, 1994). As manoproteínas que formam a camada externa são altamente glicosiladas, com uma fração de carboidratos que perfazem mais de 90% (ORLEAN, 1997). As cadeias de carboidratos das manoproteínas contêm múltiplas pontes fosfodiéster, resultando em numerosas cargas negativas na superfície celular em valores fisiológicos de pH (KLIS et al., 2002) Esta porção é responsável pelas propriedades hidrofílicas da parede e pode estar envolvida na retenção de água e proteção ao ressecamento (KIM; YUN, 2006).

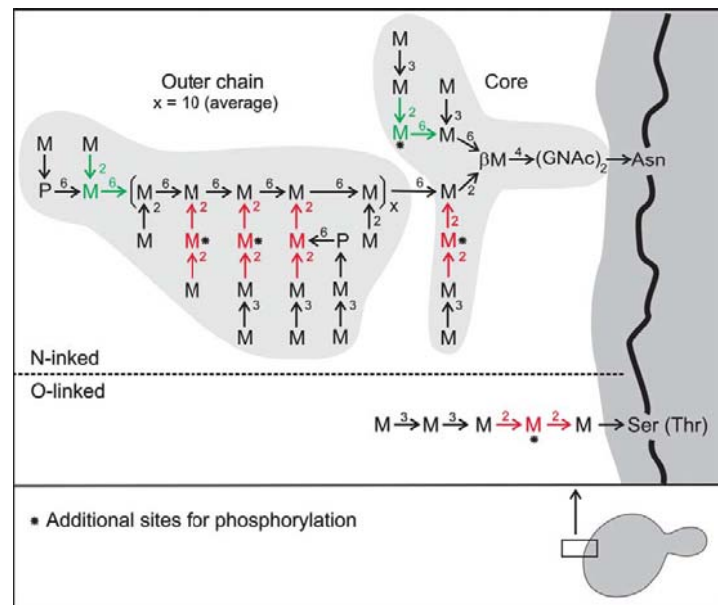
As mananas e glucanas presentes na parede celular da célula da levedura são alimentos não digeríveis que beneficiam o hospedeiro através de uma seleção, estimulando o crescimento e ativando o metabolismo. Adicionalmente podem promover o desenvolvimento de um número limitado de bactérias do trato intestinal, melhorando o balanço intestinal do hospedeiro (LI; GATLIN III, 2003).

Inúmeros trabalhos da literatura vêm descrevendo componentes da parede celular de leveduras como imunoestimulantes (GARNER; DOMER, 1994; VECCHIARELLI, 2000; HUANG et al., 2002 LEE et al., 2002).

### 3.3 MANOPROTEÍNAS DE LEVEDURAS

As manoproteínas constituem a maior parte das glicoproteínas do envelope celular de praticamente todas as leveduras (VINOGRADOV; PETERSEN; BLOCK, 1998) e pertencem a duas classes de compostos. A primeira é encontrada em grande quantidade e tem papel estrutural na parede celular. Sua composição apresenta aproximadamente 10% de proteínas e 90% de carboidratos, na maioria fosforilados, e são conectados a proteínas por ligações tipo N unidos a resíduos de

asparagina. As manoproteínas da outra classe estão localizadas no espaço periplasmático, entre a parede celular e a membrana plasmática, e representam as mananas com função enzimática. São compostas por cadeias curtas de manose, com até cinco unidades deste monossacarídeo, e apresentam ligações do tipo O unidas a resíduos de serina ou treonina, conectando manana à proteína (BARRIGA et al., 1999). Os resíduos de manose conectados por ligações O consistem de cadeias curtas de  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 manose. Já a porção contendo ligações N é composta por uma cadeia central de resíduos de manopiranoose com ligações  $\alpha$ -1,6 e ramificada por resíduos  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 manopiranoose (SHIBATA et al., 1991). A estrutura das manoproteínas com ligações tipo N e tipo O está representada na figura 1.



**Figura 1** – Estrutura de oligomanoses da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* formadas por ligações tipo N e tipo O.

**Fonte:** Corbacho; Olivero; Hernandez, 2005

As mananas são compostas principalmente por D-manose, mas podem conter uma quantidade menor de outros açúcares como glucose, galactose e xilose (KRIZKOVA et al, 2001). A maioria das leveduras apresenta mananas com uma arquitetura similar, que consiste em um oligossacarídeo central de  $\alpha$ -1,6-manose, modificado em sua extensão por ramificações laterais de  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3-

manose (JIGAMI; ODANI, 1999). As mananas têm alta atividade inibitória contra tumores, efeitos hemopoiéticos e radioprotetores e podem ser utilizados como imunoadjuvantes (KRIZKOVÁ et al., 2001).

As manoproteínas não têm apenas funções fisiológicas importantes, mas também determinam propriedades da superfície celular e participam do reconhecimento celular. Além disso, seus carboidratos conferem especificidade imunológica às linhagens de leveduras, sendo responsáveis pelas principais propriedades determinantes antigênicas destes organismos, de modo que possuem grande potencial a ser estudado (KRIZKOVÁ et al., 2001).

Dados disponíveis na literatura indicam papel fundamental de manoproteínas de *Candida albicans* na ativação linfocitária, aumentando a resposta contra hemácias de carneiros (LUZZATI et al., 1990) e proliferação de células T no baço (WANG et al., 1998). Recentemente, Pitzurra et al.(2000) e Pietrella et al.(2001) demonstraram que manoproteínas lideram uma produção massiva de Interleucinas-12 por macrófagos, atuando como mediadores de processos inflamatórios.

Em adição ao seu potencial imunológico manoproteínas de leveduras apresentam propriedades bioemulsificantes (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996; BARRIGA et al., 1999), que ampliam as possibilidades de utilização industrial.

### 3.3.1 Propriedades Emulsificantes de Manoproteínas

Bioemulsificantes são compostos de origem microbiana que incluem polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas anfipáticas ou misturas complexas destes biopolímeros capazes de estabilizar emulsões (TOREN et al., 2003). Estes emulsificantes vêm ganhando espaço frente aos emulsificantes sintéticos por apresentarem vantagens em relação ao custo de produção, riscos a saúde humana e crescente demanda por produtos naturais (TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996). A biodegradabilidade também é uma característica importante dos bioemulsificantes, porque evita problemas de toxicidade e acúmulo em ambientes, e aumenta seu potencial de aplicação

industrial, incluindo os setores alimentícios, farmacêuticos e ambientais (AMARAL et al., 2006).

Neste contexto, diversos estudos descrevem manoproteínas extraídas da parede celular de leveduras *Saccharomyces sp.* como efetivos bioemulsificantes (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996; BARRIGA et al., 1999). A presença de polímeros hidrofílicos de manose ligados covalentemente a porção protéica formam uma estrutura anfipática, responsável por propriedades emulsificantes (LUKONDEH; ASHBOLT; ROGERS, 2003).

Em estudo, Barriga e colaboradores (1999) fracionaram um emulsificante extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em duas porções, uma contendo principalmente proteína e resíduos de manose e a outra correspondendo à manana restante da manoproteína. A partir da avaliação das propriedades emulsificantes os pesquisadores concluíram que a atividade emulsificante da manoproteína é responsabilidade da fração protéica. A manana isolada não é capaz de formar emulsões, mas em concentrações adequadas aumenta as propriedades emulsificantes da fração protéica.

Também utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Torabizadeh, Shojaosadati e Tehrani (1996) extraíram um bioemulsificante da parede celular composto por manoproteína (70%) e glucana (30%). Comparando a atividade emulsificante da manoproteína com o caseinato de sódio, observou-se atividade de 79% para a manoproteína e 77% para o caseinato de sódio. As emulsões permaneceram estáveis quando armazenadas à 4°C durante 30 dias.

Além de apresentar potencial emulsificante, manoproteínas são componentes que podem ser facilmente extraídos utilizando tratamento térmico e água (FREIMUND et al., 2003). A facilidade de obtenção de manoproteínas e disponibilidade de matéria prima abundante e de baixo custo, como leveduras descartadas como subprodutos de cervejarias, vinícolas e usinas de álcool, fazem da manoproteína produto atrativo para aplicações industriais.

### 3.3.2 Obtenção de Manoproteínas

De acordo com sua ligação com a parede celular e o método de extração, as manoproteínas são agrupadas em duas classes. Uma classe é composta pelas proteínas extraídas com dodecil sulfato de sódio (SDS), conectadas por ligações não-covalentes à parede celular. A outra classe é formada por proteínas estruturais da parede celular ligadas covalentemente às glucanas. Estas proteínas podem ser solubilizadas pela incubação com  $\beta$ -1,3-glucanase, que digerem a rede insolúvel de glucana (KITAGI; SHIMOI; ITOH, 1997)

Parascandola e colaboradores (1997) solubilizaram manoproteínas de ambas as classes para estudar condições de estresse celular. As manoproteínas conectadas por ligações não covalentes foram obtidas por tratamento térmico em SDS seguido de  $\beta$ -mercaptoetanol. As manoproteínas ligadas covalentemente à parede celular foram extraídas utilizando a enzima zimolase, que tem atividade  $\beta$ -1,3-glucanase.

Para identificar e analisar proteínas específicas de cultura estática de *Saccharomyces sp.*, Kitagi, Shimo e Itoh (1997) solubilizaram as manoproteínas não covalentemente ligadas em uma combinação de SDS, EDTA e tampão Tris-HCl e aplicaram tratamento enzimático com laminarase na fração restante para obter manoproteínas covalentemente ligadas. Outra opção para o tratamento enzimático é a utilização de Lyticase, uma  $\beta$ -1,3-glucanase utilizada para extração de manoproteínas realizada por Alexandre, Blanchet e Charpentier (2000).

Em 2002, Magnelli e colaboradores descreveram um método de fracionamento da parede celular utilizando uma seqüência de enzimas comercialmente disponíveis: quantazyme e quitinase,  $\beta$ -1,6-glucanase e laminarase combinada à  $\beta$ -glucosidase, para liberar a manoproteína como produto final do processo. O procedimento empregado é eficaz na determinação dos componentes da parede celular, no entanto, é restrito a análises em micro escala. Sob este aspecto, Freimund et al.(2003) relataram que tratamentos enzimáticos têm como vantagem a preservação da estrutura nativa, evitando a degradação das cadeias, porém, podem não atuar quantitativamente e estão limitados pelos custos, sendo viáveis apenas em pequena escala.

Como opção financeiramente viável, Nguyen, Fleet e Rogers (1998) descreveram uma metodologia diferenciada para extração de manoproteínas pelo fracionamento da parede celular utilizando hidróxido de potássio em atmosfera de nitrogênio, seguido de tratamento com sulfato de amônia para saturação e separação das manoproteínas e glucanas solúveis. No entanto, a utilização de tratamentos básicos e ácidos pode afetar as propriedades e composição de proteínas e polissacarídeos. Assim, há um crescente interesse em desenvolver tratamentos menos agressivos, que evitem a alteração dos componentes da parede celular e possibilitem custo mais baixo para obtenção de produtos.

Uma alternativa a estes processos pode ser o uso de tratamentos térmicos. Ao extrair um bioemulsificante, Torabizadeth et al. (1996) submeteram uma solução de células de *Saccharomyces cerevisiae* em pH neutro a 121°C por diferentes períodos. O produto obtido, composto por 70% de manoproteína e 30 % de glucanas entre outras macromoléculas da parede celular, apresentou atividade emulsificante satisfatória para períodos de extração entre 30 e 120 minutos.

Em 2003, Freimund e colaboradores descreveram um método para extração de  $\beta$ -1,3-glucana e obtiveram manoproteína como subproduto. A manoproteína foi extraída na primeira etapa do processo, utilizando um tratamento térmico à 125°C seguido de precipitação com solução de etanol. Contudo, o objetivo principal destes pesquisadores foi a obtenção de glucanas. A adequação deste processo pode ser uma alternativa para a extração de manoproteínas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os itens “Materiais e Métodos” e “Resultados e Discussão” da presente dissertação estão contemplados no artigo: “Extração e caracterização de manoproteínas da parede celular de levedura de cervejaria e avaliação de propriedades emulsificantes”, formatado conforme as normas do periódico Brazilian Journal of Food Technology (anexo A).

# EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANOPROTEÍNAS DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA DE CERVEJARIA E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES EMULSIFICANTES

## RESUMO

A biomassa de levedura descartada após a produção de cerveja é matéria prima para extração de componentes celulares, dentre eles a manoproteína. O presente trabalho avaliou a viabilidade da utilização da levedura *Saccharomyces* sp. para extração de manoproteínas, após ser descartada em cervejaria. A extração foi conduzida conforme delineamento fatorial incompleto, Box-Behnken  $3^3$ , para as variáveis temperatura (75°C, 85°C e 95°C), tempo, em horas (5, 7 e 9) e concentração (10%, 15% e 20%) da suspensão de parede celular. Os resultados evidenciaram que o etanol residual do processo fermentativo não interfere no processo de obtenção de manoproteínas. O maior índice de extração observado foi 4,08% de manoproteínas, obtidas nas extrações a 95°C para a concentração 10% durante 7 horas e 15% por 9 horas. A validação experimental para obtenção do maior índice predito resultou em 4,5% de manoproteína, confirmando a capacidade preditiva do modelo. A manoproteína obtida nas condições previstas de 95°C, 9 horas e 10% de parede celular, apresentou 51,39% de proteínas e 25,89% de carboidratos distribuídos entre manose e glicose. Na porção protéica foram encontradas proteínas de peso molecular 58kDa e 64kDa. A determinação da atividade emulsificante de  $62,5 \pm 0,88\%$  e da estabilidade da emulsão de  $96 \pm 1,4\%$  permitiram caracterizar a manoproteína obtida como um bioemulsificante. Estes resultados demonstraram o valor potencial da levedura descartada como subproduto industrial na obtenção de manoproteína com propriedades interessantes para a indústria cosmética e de alimentos.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces* sp. Manoproteína. Bioemulsificante. Levedura cervejeira.

## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares utilizados como ferramenta biotecnológica em vários setores industriais. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são as que apresentam maior valor industrial e comercial (VILELA et al., 2000) para emprego como agentes biológicos de transformação em indústrias de bebidas fermentadas, de panificação e destilarias de etanol. O grande excedente de biomassa de levedura gerado, principalmente por indústrias de cerveja e etanol,

impõe a necessidade do desenvolvimento de metodologias para o reaproveitamento deste subproduto.

Considerando que a utilização das células íntegras é limitada pela baixa digestibilidade da parede celular (GALVEZ et al., 1990; VILELA et al., 2000) e pelo alto conteúdo de ácidos nucléicos (LYUTSKANOV et al., 1990), muitos estudos vêm explorando componentes isolados de leveduras como enzimas, proteínas, polissacarídeos e lipídios (KOLLAR et al., 1992; BELEM e LEE, 1997; BELEM e LEE, 1998). Dentre estes compostos, as manoproteínas destacam-se pelas propriedades imunoestimulantes (KRIZKOVÁ et al., 2001; WANG et al., 1998; PITZURRA et al., 2000 e PIETRELLA et al., 2001) e bioemulsificantes (CAMERON et al., 1988; TORABIZADEH et al., 1996; BARRIGA et al., 1999).

As manoproteínas representam de 20 a 23% do peso seco da parede celular (KLIS, 1994) e são compostas por cadeias curtas de manose ou cadeias longas com alta concentração de manoses fosforiladas, unidas a proteínas por ligações tipo O ou tipo N respectivamente (KITAGI et al., 1997). Metodologias descritas para extração de manoproteínas geralmente empregam altas temperaturas (FREIMUND et al., 2003; TORABIZADEH et al., 1996) combinadas a compostos que atuam como “detergentes” nas ligações covalentes (KITAGI et al., 1997; PARASCANDOLA et al., 1997) e/ou enzimas do tipo  $\beta$ -glucanase (ALEXANDRE et al., 2000; MAGNELLI et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia de baixo custo para extração de manoproteínas de leveduras descartadas em cervejaria, pelo emprego de tratamentos térmicos menos agressivos do que os descritos na literatura. Além disso, incluiu o estudo da viabilidade do reaproveitamento da biomassa de levedura e a determinação das propriedades emulsificantes da manoproteína obtida.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico**

Após processo de produção de cerveja por baixa fermentação, a levedura *Saccharomyces sp.* foi coletada em suspensão celular, denominada creme

de levedura, contendo concentrações de sólidos totais de  $20 \pm 0,7\%$  e teor alcoólico de em torno de 7% de etanol.

## 2.2 Preparo do creme de levedura para processamento

O creme de levedura adicionado de 20% (p/v) de água destilada foi tamisado seqüencialmente em malhas de 0,59; 0,50 e 0,18mm. Posteriormente, foi lavado por centrifugação (3.500xg a 10°C, 5 minutos) para redução do etanol residual do processo fermentativo até concentração de etanol inferior a 0,1% no sobrenadante. O teor de etanol foi monitorado no sobrenadante de cada centrifugação através da metodologia adaptada de Kaye e Haag (1954), que se baseia na redução do dicromato de potássio pelo etanol, mensurada em espectrofotômetro a 605nm.

As amostras de creme de levedura submetidas à lavagem por centrifugação foram designadas como “sem etanol” e as amostras somente diluídas e tamizadas como “com etanol”.

## 2.3 Autólise e obtenção da parede celular

Em concentração de 20% em base seca (p/p), a suspensão de creme de levedura foi ajustada para pH 5,0 utilizando soluções de NaOH ou HCl 1M e mantida a 50°C, sob agitação, durante 24 horas, conforme Chaud e Sgarbieri (2006). Decorrido este tempo, a suspensão foi centrifugada (3500xg, 5 minutos, 10°C) e o precipitado, correspondente à parede celular, ressuspenso em água destilada (p/p). A parede celular obtida foi lavada duas vezes com água destilada (p/p). A taxa de autólise foi determinada através da fórmula:

$$\% A = \frac{X_1}{X_2} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

A: Taxa de autólise percentual

X1: Massa de parede celular obtida (base seca)

X2: Massa de células utilizadas no processo (base seca)

## 2.4 Extração de manoproteínas e interferência do etanol no processo

A parede celular em suspensão de 15% em base seca foi tratada termicamente a 85°C durante 7 horas, sob agitação de 100 rpm. Feito isso, foi resfriada até 45°C e centrifugada (3500xg, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi recuperado, adicionado de três volumes de etanol absoluto e incubado a 4°C por 12 horas para precipitação das manoproteínas. O material foi lavado duas vezes com etanol absoluto por centrifugação a (3500xg, 5 minutos, 10°C). A manoproteína precipitada foi liofilizada e o índice de extração determinado pela equação:

$$\% E = \frac{Y_1}{Y_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

E: Índice percentual de extração de manoproteína

Y1: Massa de manoproteína obtida (base seca)

Y2: Massa de parede celular empregada na extração (base seca)

Interferências do etanol residual no processo de extração de manoproteínas foram avaliadas submetendo amostras de creme de levedura com etanol e sem etanol ao processo de autólise e obtenção de parede celular. O teor de etanol foi monitorado por análises pré e pós-autólise. As porções de parede celular com e sem etanol obtidas foram processadas para extração de manoproteínas nas condições acima descritas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias dos índices de extração de cada tratamento comparadas pelo teste t no programa Statistica 6.0.

## 2.5 Delineamento para condições de extração de manoproteínas

O delineamento foi realizado no programa “Statistica 6.0” utilizando fatorial Box-Behnken 33, desenho experimental construído pela combinação de delineamento fatorial de dois níveis com desenho de blocos incompletos, gerando um total de 15 experimentos com três repetições do ponto central. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura a 75°C; 85°C e 95°C, tempo de processo de 5, 7 e 9 horas, e concentração da suspensão de parede celular a 10%,

15% e 20% em base seca. A definição das variáveis e seus respectivos níveis de variação foram baseados na literatura e em resultados de experimentos preliminares.

## **2.6 Métodos analíticos**

As diferentes frações utilizadas para a avaliação da interferência do etanol no índice de extração de manoproteína (creme de levedura com e sem etanol, parede celular com e sem etanol) foram analisadas quanto à umidade em estufa a 105°C, resíduo mineral fixo (cinzas) em mufla a 550°C, teor de proteína bruta por Micro-Kjeldahl (%N x 6,25) e lipídios por Soxhlet, utilizando metodologias descritas pela American Organization of Analytical Chemists (A.O.A.C.) (HOROWITZ, 2000). O teor de carboidratos das diferentes frações foi calculado por diferença de peso entre os sólidos totais e os outros componentes determinados. Todas as análises foram realizadas em duplicata e submetidas ao teste t.

### **2.6.1 Caracterização das manoproteínas**

A manoproteína obtida foi igualmente caracterizada quanto à composição centesimal através das técnicas descritas pela A.O.A.C. (HOROWITZ, 2000), o teor de carboidratos totais foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956) e o teor de lipídios foi calculado por diferença de peso entre os sólidos totais e os outros componentes determinados. Análises de macro e micro nutrientes foram realizadas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) através de espectrofotometria de emissão de plasma e fotometria de chama.

Para a análise qualitativa dos carboidratos constituintes da manoproteína foi realizada cromatografia de camada delgada segundo Moreira, Souza e Vedruscolo (1998). Foi empregada uma solução eluente composta por clorofórmio:metanol:ácido acético:água [4:4:1:1 (v/v/v/v)] e revelador de anisaldeído, ácido sulfúrico e ácido acético [1:2:100 (v/v/v)]. A placa revelada foi mantida em estufa a 110°C durante 10 minutos e visualizada sob luz ultravioleta de onda curta (365 nm).

A fração protéica foi analisada pelo método de Biureto (GORNALL et al., 1949) de maneira qualitativa, utilizando suspensão de manoproteína em

concentração 50mg/mL. O peso molecular desta fração foi determinado em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970), revelado em solução de nitrato de prata. As concentrações de manoproteínas utilizadas foram de 10µg/mL 50µg/mL e o perfil eletroforético obtido foi comparado ao padrão de peso molecular 220-10kDa (Invitrogen®)

## 2.7 Propriedades emulsificantes da manoproteína

A atividade emulsificante da manoproteína foi analisada segundo Martinez-Checa et al. (2007). Uma mistura contendo 5mL de água, 5mL de óleo de soja (Soya®) e 0,5g de manoproteína foi agitada a 9500xg durante 1 minuto em agitador de haste (Heidolf). A emulsão obtida foi centrifugada a 2000xg, 5 minutos, a 25°C. A atividade emulsificante foi determinada pela equação:

$$\% \text{ A.E.} = \frac{V_e}{V_t} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

AE = Percentual de atividade emulsificante

Ve = Volume de emulsão (mL)

Vt = Volume total da solução (mL)

A emulsão obtida foi avaliada quanto à estabilidade pelo tratamento a 80°C durante 30 minutos, seguido de resfriamento em água corrente por 10 minutos. A emulsão foi novamente centrifugada a 2000 x g, 5 minutos e o volume de emulsão remanescente foi verificado. A estabilidade foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ E.E.} = \frac{V_{ef}}{V_{ei}} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

E.E = Estabilidade da emulsão percentual

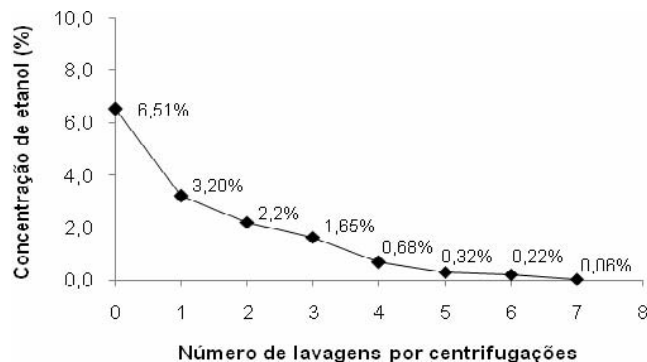
Vef = Volume de emulsão final (mL)

Vei = Volume de emulsão inicial (mL)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Interferência do etanol no índice de extração de manoproteína

Para analisar a influência do etanol residual na extração de manoproteínas, o procedimento de limpeza do creme de levedura foi padronizado. A concentração de etanol no sobrenadante de cada lavagem está apresentada na Figura 2.



**Figura 2** – Concentração de etanol no sobrenadante de cada lavagem por centrifugação.

A limpeza do creme de levedura mostrou-se eficiente para a redução do teor de etanol, que reduziu de 6,51% para 0,06% por mL de sobrenadante após sete lavagens. Após o processo de autólise o teor de etanol do creme de levedura “com etanol” passou de 6,51% para 1,03% por mL de sobrenadante. Em contrapartida, como já previsto, o teor de etanol da porção “sem etanol” não foi detectado.

O elevado teor de etanol detectado no creme de levedura concorda com dados da literatura. Conforme Vilela et al. (2000), a levedura resultante do processo de produção de cerveja contém elevada concentração de álcool e de outros componentes do mosto de fermentação, que podem ser eliminados por lavagens com água e separados por centrifugação.

Os resultados das etapas de autólise do creme de levedura e extração de manoproteína da parede celular estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Resultados dos processos de autólise e extração de manoproteínas para frações com e sem etanol.

Processos	Com etanol	Sem etanol
Autólise	52,99 ± 7,08% <sup>a</sup>	52,57 ± 5,20% <sup>a</sup>
Extração de manoproteínas	2,39 ± 0,11% <sup>a</sup>	1,31 ± 0,13% <sup>b</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença entre as taxas de autólise da fração com e sem etanol, embora o etanol seja descrito como agente autolisante (CHAUD e SGARBIERI, 2006).

Possivelmente nas concentrações presentes no creme de levedura, o etanol não promove alterações no referido processo, concordando com relatos de que o grau alcoólico em torno de 11% não é considerado um fator inibidor de autólise (RIÉVILLION e PIBERNAT, 1996).

Diferente do observado para a taxa da autólise, as análises estatísticas revelaram diferenças entre o índice de extração de manoproteínas utilizando parede celular com etanol e sem etanol, supostamente relacionadas às lavagens utilizadas para retirada do etanol.

Análises referentes à composição centesimal foram realizadas utilizando as mesmas suspensões nos processos de autólise e extração de manoproteína. Os resultados em base seca estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição centesimal referente às suspensões de creme de levedura e parede celular com e sem etanol, expressas em base seca.

Frações	Componentes	Com etanol	Sem etanol
Creme de levedura	Cinzas	6,98 ± 0,46 <sup>a</sup>	6,88 ± 0,11 <sup>a</sup>
	Proteínas	51,13 ± 0,05 <sup>b</sup>	54,48 ± 0,69 <sup>a</sup>
	Lipídios	6,74 ± 1,21 <sup>a</sup>	6,27 ± 2,23 <sup>a</sup>
	Carboidratos	35,11 ± 0,75 <sup>a</sup>	32,36 ± 2,82 <sup>a</sup>
Parede Celular	Cinzas	6,65 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,43 <sup>b</sup>
	Proteínas	16,95 ± 0,16 <sup>a</sup>	17,18 ± 2,86 <sup>a</sup>
	Lipídios	7,95 ± 0,24 <sup>a</sup>	7,94 ± 1,33 <sup>a</sup>
	Carboidratos	68,43 ± 0,28 <sup>a</sup>	73,25 ± 4,64 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Segundo Caballero-Córdoba et al. (1997), a composição centesimal da biomassa da levedura *Saccharomyces sp.*, empregada em cervejaria, apresenta 48,51% de proteínas (%N x 5,8), 8,33% de cinzas, 3,44% de lipídios e 32,86% de carboidratos totais.

Neste contexto, Sgarbieri e colaboradores (1997) relataram 48,74% de proteínas (%N x 5,8), 8,55% de cinzas, 3,33% de lipídios e 35% de carboidratos para as células íntegras.

Para a parede celular, os mesmos pesquisadores encontraram 32,70% de proteínas, 4,43 % de cinzas, 4,54% de lipídios e 56,50% de carboidratos.

Em estudo semelhante àquele aqui relatado, Thammakiti et al. (2003) definiram a composição de células da levedura cervejeira *Saccharomyces uvarum* em base seca como 59,61% de carboidratos, 43,47% de proteínas (%N x 6,25), 10,31% de cinzas e 1,20% de lipídios. A composição da parede celular foi determinada como 44,11% de carboidratos, 40,92% de proteínas, 4,74% de cinzas e 1,54% de lipídios.

Os dados da composição centesimal para o creme de levedura do presente estudo são semelhantes aos descritos na literatura. Contudo, em relação à composição da parede celular foram constatadas maiores variações. Segundo Parascandola et al. (1997), a presença do etanol promove alterações na organização e composição da parede celular, principalmente no que se refere às manoproteínas.

Quanto ao teor de proteínas, a composição centesimal do creme de levedura com e sem etanol apresentou diferença que não permanece para a parede celular oriunda destas frações. No entanto, há uma diferença quanto ao teor de resíduos minerais fixos, que é menor na parede celular sem etanol. Essa perda de minerais, provavelmente, deve-se ao aumento da solubilidade dos minerais durante as lavagens, intensificada no tratamento térmico da autólise.

A fração de parede celular com etanol resultou em índice maior de manoproteínas e foi utilizada nos ensaios de avaliação das condições de extração. A possibilidade de utilizar o creme de levedura sem um pré-tratamento representa maior viabilidade no seu aproveitamento. Assim, diretamente de um subproduto de indústrias cervejeiras, realizando apenas o fracionamento podem ser obtidos constituintes importantes da parede celular, como é o caso da manoproteína.

### 3.2 Delineamento das condições de extração de manoproteína

O delineamento fatorial com as variáveis codificadas e reais e respectivo índice de manoproteína obtida estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Variáveis codificadas e reais de cada tratamento para extração das manoproteínas e o índice correspondente.

Ensaio	Temperatura (°C)		Tempo (horas)		Parede celular (%)		Índice (%)
	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado	
		X <sub>1</sub>		X <sub>2</sub>		X <sub>3</sub>	
1	75	-1	5	-1	15	0	1,14
2	95	1	5	-1	15	0	2,13
3	75	-1	9	1	15	0	1,90
4	95	1	9	1	15	0	4,08
5	75	-1	7	0	10	-1	1,36
6	95	1	7	0	10	-1	4,08
7	75	-1	7	0	20	1	0,92
8	95	1	7	0	20	1	1,13
9	85	0	5	-1	10	-1	1,68
10	85	0	9	1	10	-1	2,18
11	85	0	5	-1	20	1	1,35
12	85	0	9	1	20	1	1,58
13	85	0	7	0	15	0	1,89
14	85	0	7	0	15	0	3,01
15	85	0	7	0	15	0	1,99

Como pode ser observado na tabela 3, os tratamentos das suspensões 10% de parede celular com 7 horas de extração e 15% com 9 horas, ambos a 95°C, permitiram a obtenção do maior índice de extração, correspondente a 4,08% de manoproteína. Em contrapartida o menor índice observado foi para o tratamento da suspensão de 20% de parede celular, a 75°C e 7 horas, que resultou em apenas 0,92% de manoproteína.

O maior índice de manoproteína observado no presente estudo é inferior ao de Freimund et al. (2003), que obtiveram 14% de manoproteína em relação à parede celular seca da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, em extração a 125°C durante 5 horas. Em contrapartida, Torabizadeh et al. (1996) relataram índice em torno de 4% de manoproteína para extração a 121° C

durante 15 minutos. Uma consideração importante é que a levedura de cervejaria, utilizada no processo de extração aqui descrito, foi coletada após desgaste promovido por vários processos de fermentação.

A Tabela 4 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o delineamento utilizado.

**Tabela 4 –** Análise de variância (ANOVA) para o modelo de primeira ordem determinado pelo delineamento Box-Behnken 3<sup>3</sup>.

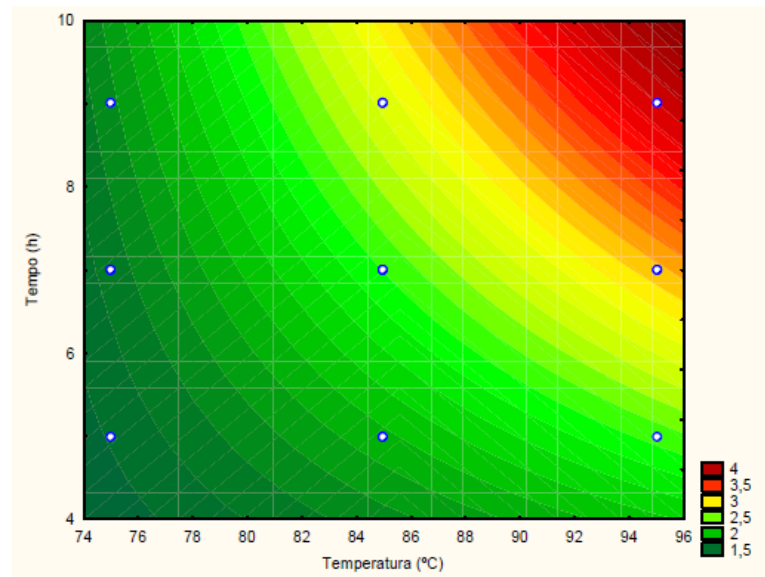
Fatores	Valores
R <sup>2</sup>	0,85
R <sup>2</sup> ajustado	0,73
Desvio de regressão	0,75

O índice de correlação (R<sup>2</sup>) encontrado indica que 85% dos dados são explicados pelo modelo. O desvio de regressão não significativo é um indicativo de que o modelo se aplica para ajuste dos dados experimentais estudados. O cálculo dos coeficientes permitiu definir a equação do modelo simplificada, para a resposta índice de extração de manoproteína:

$$Y = 1,96 + 0,76(x_1) + 0,43(x_2) - 0,54(x_3) + 0,26(x_3)^2 + 0,30(x_1)(x_2) - 0,63(x_1)(x_3) \quad (5)$$

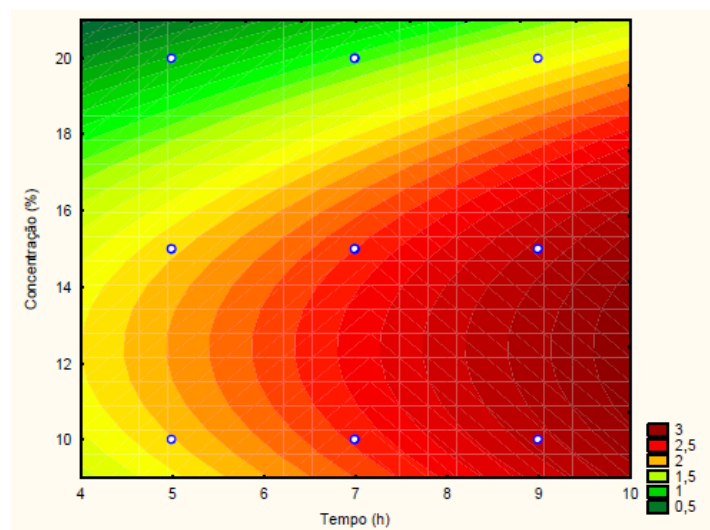
As análises dos efeitos demonstraram 95% de significância para as variáveis tempo (x<sub>2</sub>) e concentração (x<sub>3</sub>). A temperatura (x<sub>1</sub>) foi significativa ao nível de 99%. A interação temperatura-concentração (x<sub>1</sub>\*x<sub>3</sub>) apresentou efeito negativo com significância de 95%. Os demais efeitos, embora não significativos ao nível de 95%, influenciam no ajuste do modelo aos índices observados e portando seus coeficientes foram mantidos na equação.

Os gráficos de contorno observados para o índice de manoproteínas, definidos pelo delineamento experimental, apresentam os efeitos das variáveis e de suas interações.



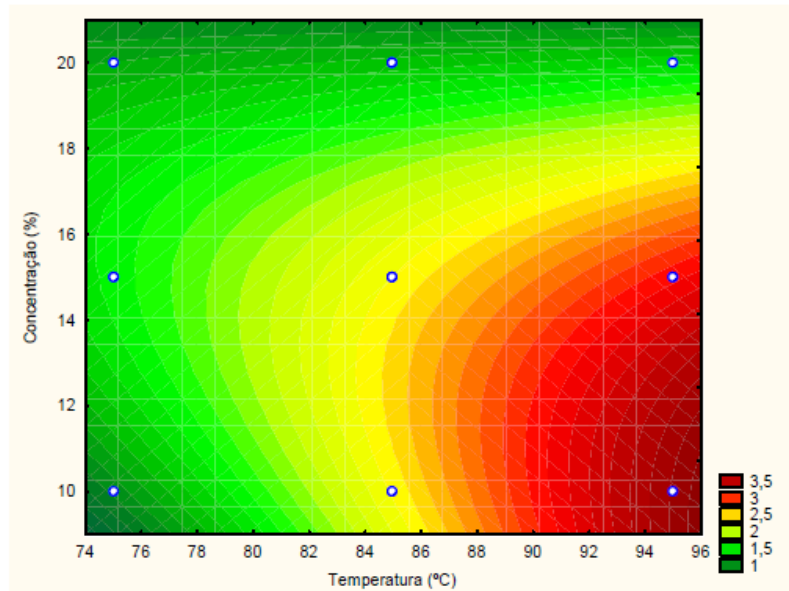
**Figura 3** – Gráfico de contorno dos efeitos da temperatura e do tempo no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria.

A figura 3 demonstra o efeito positivo das variáveis tempo e temperatura, que promovem o aumento da extração de manoproteína conforme se aproximam dos maiores níveis codificados (+1), ou seja, um processo de extração de 9 horas a 95°C. O efeito positivo do tempo também pode ser observado na figura 4, onde sua relação com o rendimento de extração de manoproteína é analisada em conjunto com a concentração da suspensão utilizada para extração.



**Figura 4** – Gráfico de contorno dos efeitos do tempo e da concentração de parede celular no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria.

O efeito negativo da concentração é visualizado na figura 4, que indica maior índice de extração para menores concentrações da suspensão de parede celular. Conforme o esperado maior concentração de solvente nas suspensões proporciona maior taxa de extração de manoproteína,



**Figura 5** – Gráfico de contorno dos efeitos da concentração de parede celular e da temperatura no índice de extração da manoproteína da parede celular de levedura de cervejaria.

Na figura 5 é possível observar o efeito negativo da concentração de parede celular e o efeito positivo da temperatura no processo de obtenção da manoproteína. A interação entre estas variáveis é explicada pela concentração da suspensão, decorrente da elevação da temperatura. A suspensão fica mais concentrada pela evaporação e dificulta a agitação e a distribuição do calor durante o processo de extração. O processo de obtenção por centrifugação também é dificultado conforme a suspensão se torna mais densa durante o processo de extração.

Considerando as limitações experimentais, a partir da equação definida para o modelo os valores das variáveis para obter o índice máximo de manoproteína foram preditos. O maior índice predito foi 4,44%, para extração a 95°C por 9 horas, com uma suspensão de 10% de parede celular. Esses dados foram validados experimentalmente em ensaios conduzidos em duplicata, e foi observado

índice de  $4,50 \pm 0,05\%$  de manoproteína, confirmando a previsão descrita pelo modelo.

### 3.3 Caracterização da manoproteína

A Tabela 5 apresenta a composição centesimal da manoproteína extraída a  $95^{\circ}\text{C}$ , durante 9 horas a partir de suspensão contendo 10% de parede celular. Pode ser observado que proteínas e carboidratos correspondem à maior fração.

**Tabela 5** – Composição centesimal da manoproteína em base seca

Componentes	Concentrações (%)
Proteína	$51,39 \pm 1,2$
Carboidratos	$25,89 \pm 0,1$
Lipídios	$12,21 \pm 0,5$
Cinzas	$10,51 \pm 0,4$

Conforme Kitagi e colaboradores (1997), manoproteínas são glicoproteínas formadas por proteínas unidas a oligomanoses por ligações tipo O ou N. O alto teor de proteína em relação ao teor de carboidratos indica a origem glicoprotéica do composto extraído. Segundo Barriga et al. (1999), manoproteínas contendo 30 a 50% de proteínas correspondem a classe de manoproteínas com funções enzimáticas, que apresentam mananas curtas, não fosforiladas, ligadas a proteína por ligações tipo O com resíduos de serina ou treonina.

A composição de macronutrientes determinada no presente estudo para a manoproteína foi de 2,22g% de fósforo, 1,2g% de potássio, 0,19g% de cálcio, 0,45g% de magnésio, 0,28g% de enxofre. A análise de micronutrientes revelou 0,69mg% de cobre, 3,17mg% de zinco, 0,79mg% de boro, 5,69mg% de ferro, 2,94mg% de manganês e 160mg% de sódio. A grande diversidade de nutrientes encontrada para a manoproteína obtida concorda com a afirmação de Yamada et al. (2003), que descrevem os derivados de levedura como produtos ricos em minerais,

macro e microelementos, além de vitaminas do complexo B e os altos teores de proteínas e fibras dietéticas, representadas pela porção de carboidratos.

Na análise qualitativa dos carboidratos em cromatografia de camada delgada foram observados monossacarídeos com fatores de retenção (Rf) de 0,45 e 0,43, referentes à manose e glicose, respectivamente. Os mesmos fatores foram encontrados por Moreira e colaboradores (1998) ao analisarem o biopolímero xantana, composto por glicose, manose e ácido glicurônico. Neste aspecto, Krizkova et al. (2001) relatam que as mananas de leveduras são constituídas principalmente por manoses, porém podem conter resíduos de glicose, galactose e xilose.

A caracterização das ligações peptídicas pela reação de Biureto apresentou resultado positivo, observado pela alteração da coloração azul para violeta, indicando a presença de ligações peptídicas (ZAIA et al., 1998). A presença das ligações peptídicas indica que os tratamentos térmicos aplicados no processo de autólise e extração não afetam a integridade da fração protéica das manoproteínas obtidas.

O perfil eletroforético de SDS-PAGE da manoproteína revelou proteínas com peso molecular de aproximadamente 58Kb e 64 Kb. Segundo Rosenberg e Ron (1999), proteínas de baixo peso molecular atuam na tensão superficial enquanto aquelas de alto peso molecular estabilizam emulsões. O peso intermediário observado para fração protéica sugere que a manoproteína obtida apresenta características de bioemulsificante, com capacidade de reduzir a tensão superficial formando emulsões com boa estabilidade.

### **3.4 Propriedades emulsificantes**

A manoproteína obtida no presente estudo, a partir da levedura *Saccharomyces sp.* descartada em cervejaria, apresentou boas propriedades emulsificantes, com índices de  $62,5 \pm 0,88\%$  de atividade emulsificante e  $96 \pm 1,4\%$  de estabilidade da emulsão.

Conforme Barriga e colaboradores (1999), que fracionaram um bioemulsificante extraído de *S. cerevisiae*, a porção protéica é responsável pelas propriedades emulsificantes, enquanto os carboidratos, em cadeias curtas, aumentam a solubilidade do composto e a estabilidade da emulsão. De acordo com esses dados, os teores de proteínas e carboidratos encontrados para a

manoproteína obtida no presente estudo justificam as propriedades emulsificantes observadas.

Bioemulsificantes têm como vantagens biodegradabilidade, baixa toxicidade, seletividade e biocompatibilidade quando comparados a compostos sintéticos. Estas propriedades conferem possibilidade de aplicações em diversas áreas das indústrias de alimentos e farmacêuticas (BANAT et al., 2000). Além disso, a produção de um bioemulsificante a partir de leveduras descartadas em processos industriais é economicamente favorável, porque converte um resíduo de baixo valor em um subproduto rentável (BARRIGA et al., 1999).

#### 4 CONCLUSÕES

A utilização da biomassa de levedura descartada pela indústria cervejeira para extração de manoproteína não requer tratamento para retirada do etanol residual do processo fermentativo, facilitando a utilização deste subproduto para obtenção de manoproteínas. As condições ótimas, previstas pelo modelo, para a extração da manoproteína na faixa experimental estudada foram 9 horas a 95°C para suspensão de 10% de parede celular. A manoproteína extraída nessas condições apresentou alto teor de proteínas e carboidratos, grande diversidade de nutrientes, além de boas propriedades emulsificantes, que a torna um produto com excelente potencial para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica.

#### REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, H.; BLANCHET, S.; CHARPENTIER, C. Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in the velum yeast which may be implicated in the velum formation. **FEMS Microbiology Letters**, Dijon, v. 185, p. 147-150, 2000

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p.495–508, 2000.

BARRIGA, J.A.T.; COOPER, D.G.; IDZIAK, E.S.; CAMERON, D.R. Components of the emulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 96-102, 1999.

BELEM, M.A.F., LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Food Science and Technology International**, v.3, n.6, p.437-444, 1997.

BELEM, M.A.F., LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., PACHECO, M.T.B., SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.102-106, 1997.

CAMERON, D.R.; COOPER D.G; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.

CHAUD, S.G.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.369-379, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.159-171, 2003.

GALVEZ, A., RAMÍREZ, M.J., GARCIA-GARIBAY, M. Chemical composition of mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey Proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.40, n.2, p.252-262, 1990.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

HOROWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17.ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. 1298 p.

KAYE, S.; HAAG, H.B.J. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal of Forensic Medicine**, v. 1, p. 373, 1954

KITAGI, H.; SHIMOI, H.; ITOH, K. Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tirlp/Srplp in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v.249, p.343-349, 1997.

KOLLAR, R., STURDIK, E., SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, v.6, n.3, p.225-237, 1992.

KLIS, F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.

KRIZKOVA, L.; DURACKOVA, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVA, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell mannans in vitro. **Mutation Research**, v.497. p.213-222, 2001.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LYUTSKANOV, N., KOLEVA, L., STATEVA, L., VENKOV, P., HADJIOLOV, A. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: reduction of nucleic acid content and applicability of the protein extracts. **Journal of Basic Microbiology**, v.30. n.7. p.523-528, 1990.

MAGNELLI, P.; CIPOLLO, J.F.; ABEIJON, C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure. **Analytical Biochemistry**, v.301. p.136-150, 2002.

MARTINEZ-CHECA, F.; TOLEDO, F.L.; MABROUKI, K.; QUESADA, E.; CALVO, C. Characteristics of bioemulsiWer V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties, **Bioresource Technology**, v.98, p.3130–3135, 2007

MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímeros por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4. n.3. p. 222-224, 1998.

PARASCANDOLA, P.; ALTERIS, E.; SENTADREU, R.; ZUECO, J. Immobilization and ethanol stress induce the same molecular response at the level of the cell wall in growing yeast. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 121-126, 1997.

PIETRELLA, D., CHERNIAK, R., STRAPPINI, C., PERITO, S., MOSCI, P., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.69. p.2808–2814, 2001.

PITZURRA, L., CHERNIAK, R., GIAMMARIOLI, M., PERITO, S., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. Early induction of interleukin-12 by human monocytes exposed to *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **Infection and Immunity**, v.68. p.558-563, 2000.

RIÉVILLON, J.P.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, p.196-205, 1996.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154–162. 1999

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensm.-Wiss.u.-Technology**, v.29. p.734-737, 1996.

TAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potencial applications in the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p.21–29, 2004

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIN, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.) **Revista de Nutrição**, v.13. n.3. p.185-192, 2000.

WANG, Y., LI, S.P., MOSER, S.A., BOST, K.L., DOMER, J.E. Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan. **Infection and Immunity**, v.66. p.1384-1391, 1998.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista Nutricional**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes, **Química Nova**, v.21, n.6, 1998.

## 5 CONCLUSÕES

- A lavagem do creme de levedura por centrifugação mostrou-se eficiente para a redução do teor de etanol remanescente do processo de produção de cerveja;
- O etanol residual presente no creme de levedura não interferiu no índice de extração de manoproteína;
- A temperatura e o tempo de extração influenciam positivamente na extração de manoproteína, enquanto a concentração de parede celular em suspensão afeta negativamente a obtenção de manoproteína;
- A interação temperatura x concentração influem negativamente na extração de manoproteínas;
- A manoproteína obtida é composta principalmente por proteínas e carboidratos, caracterizando-se como uma glicoproteína;
- Análises qualitativas da fração de carboidratos revelaram monômeros de manose e glicose;
- O perfil eletroforético da fração protéica da manoproteína evidenciou a presença de duas bandas de peso molecular intermediário;
- A composição mineral revelou uma grande variedade de macro e micro nutrientes;
- As manoproteínas obtidas apresentaram boas propriedades emulsificantes, viabilizando sua aplicação nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, H.; BLANCHET, S.; CHARPENTIER, C. Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in the velum yeast which may be implicated in the velum formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, p.147-150, 2000.

AMARAL, P.F.F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1894-1898, 2006.

BAPTISTA, A.S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas**. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BARRIGA, J.A.T. et al. Components of the emulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 96-102, 1999.

BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Food Science and Technology International**, v.3, n.6, p.437-444, 1997.

BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., PACHECO, M.T.B., SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.102-106, 1997.

CABIB, E. et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19679-19682, 2001.

CAMERON, D.R.; COOPER D.G; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.

CASTRO, O. et al. Uridine diphosphate glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: In vivo and in vitro evidence. **Molecular Biology of Cell**, v. 10, p.1019–1030, 1999.

CORBACHO, I.; OLIVERO, I.; HERNADEZ, L.M. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 773-790, 2005.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta do citrus**. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FREIMUND, S. et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.54. p.159-171, 2003.

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

GARNER, R.E.; DOMER, J.E. Lack of effect of *Candida albicans* mannan on development of protective immune responses in experimental murine candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p. 738-741, 1994.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

HUANG, C. et al. Purification and characterization of a second immunoeactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5485-5943, 2002.

JIGAMI, Y.; ODANI, T. Manosylphosphatase transfer to yeast mannan. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 335-345, 1999.

KIM, K.S.; YUN, H.S. Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 496-500, 2006.

KITAGI, H.; SHIMOI, H.; ITOH, K. Identification and analysis of a static culture specific cell wall protein, Tirlp1Srplp in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v.249. p.343-349, 1997.

KLIS, F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.

KLIS, F.M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p. 239-256, 2002.

KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, v.6, n.3, p.225-237, 1992.

KOLLAR, R. et al. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ -1,6-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ -1,3-glucan, and chitin. **Journal of Biological Chemistry**, v.272. p.17762-17775, 1997.

KRIZKOVA, L. et al. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell mannans in vitro. **Mutation Research**, v.497. p.213-222, 2001.

LEE, D.; JI, I.; CHANG, H.; KIM, C. High-level TNF- $\alpha$  secretion and macrophage activity with soluble  $\beta$ -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 233-238, 2002.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v.14. n.219. p.681-692, 2003.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, P.L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 30, n. 12, p.715-720, 2003.

LUZZATI, A.L. et al. A mannoprotein constituent of *Candida albicans* cooperates with antigen in the induction of a specific primary antibody response in cultures of human lymphocytes. **Journal. Biol. Reg. Homeos**, v.4. p.142-149, 1990.

LYUTSKANOV, N. et al. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: reduction of nucleic acid content and applicability of the protein extracts. **Journal of Basic Microbiology**, v.30. n.7. p.523-528, 1990.

MAGNELLI, P.; CIPOLLO, J.F.; ABEIJON, C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure. **Analytical Biochemistry**, v.301. p.136-150, 2002.

NGUYEN, T.H.; FLEET, G.H.; ROGERS, P.L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.206-212, 1998.

ORLEAN, P. Biogenesis of yeast wall and surface components. In: PRINGLE, J.R., BROACH, J.R.; JONES, E.W. (Ed.) **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p.229-362.

PACHECO, M.T.B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, v.43. n.6. p.601-612, 1997.

PARASCANDOLA, P. et al. Immobilization and ethanol stress induce the same molecular response at the level of the cell wall in growing yeast. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 121-126, 1997.

PIETRELLA, D. et al. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.69. p.2808–2814, 2001.

PITZURRA, L. et al. Early induction of interleukin-12 by human monocytes exposed to *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **Infection and Immunity**, v.68. p.558-563, 2000.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. Du; RENSBURG, P. Van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology and Biotechnology**, v.41. n.1. p.3-10, 2003.

QUEROL, A. et al. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **International Microbiology**, v.6. p.201-205, 2003.

RUMSEY, G.L. et al. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout. **Animal Feed Science and Technology**, v.33. n.3-4. p.185-193, 1991.

SHIBATA, N. et al. Structural study on a phosphorylated mannotetraose obtained from the phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 strain by acetolysis. **Archives of Biochemistry et Biophysics**, v. 290, p. 535, 1991.

SILVEIRA, M. M.; MOLINA, M. A. B. Fermentação: forma de valorização de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.V.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.45-69.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensm.- Wiss.u.- Technology**, v.29. p.734-737, 1996.

TOREN, A. et al. Solubilization of phenanthrene by recombinant protein bioemulsans. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p.169-174, 2003.

VECCHIARELLI, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 407-417, 2000.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIN, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*) **Revista de Nutrição**, v.13. n.3. p.185-192, 2000.

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B.; BLOCK, K. Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy at 750MHz. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 177-183, 1998.

WANG, Y. et al. Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan. **Infection and Immunity**, v.66. p.1384-1391, 1998.

YAMADA, E.A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista Nutricional**. Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY

#### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

##### 1. CLASSIFICAÇÃO E CONTEÚDO DA PUBLICAÇÃO

Os trabalhos publicados no BJFT se classificam em três categorias:

**1.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS:** São trabalhos que relatam a metodologia utilizada, os resultados finais e as conclusões obtidas de pesquisas originais, estruturados e documentados de modo que possam ser reproduzidos com margens de erro iguais ou inferiores aos limites indicados pelo autor.

**1.2 NOTAS CIENTÍFICAS:** São relatos parciais de pesquisas originais que, devido à sua relevância, justificam uma publicação antecipada. Devem seguir o mesmo padrão do Artigo Científico, podendo ser, posteriormente, publicadas de forma completa como Artigo Científico.

**1.3 ARTIGOS DE REVISÃO:** São descrições completas, integradas e críticas de um tema de pesquisa, baseadas em documentação bibliográfica, e que contêm conclusões sobre o conhecimento disponível. Normalmente, são solicitados pelo Editor Científico a pesquisadores experientes e envolvem assuntos escolhidos pelo Conselho Editorial. Entretanto, poderão ser aceitos artigos não solicitados, mas julgados de interesse.

Artigos e Notas Científicas podem ser apresentados em português, inglês ou espanhol, obedecendo às disposições normativas a seguir:

##### 2. FORMATAÇÃO:

- Editor de Textos Microsoft Word 98 ou mais recente.
- Fonte Arial 12, espaçamento duplo entre linhas.
- Página formato A4 (210 x 297mm), margens de 2cm.
- Todas as linhas e páginas do manuscrito deverão ser numeradas seqüencialmente.
- O número de páginas não deverá ser superior a **20** para Artigos Científicos e a **9** para Notas Científicas, incluindo Figuras, e Tabelas.

##### 3. ESTRUTURA DO ARTIGO

Todos os Artigos e Notas Científicas devem conter os seguintes itens:

**TÍTULO** - Quando em português/espanhol, acompanhado da versão em inglês **AUTORES/FILIAÇÃO RESUMO** - Quando em português/espanhol, acompanhado do Summary. Quando em inglês, acompanhado do Resumo.

**PALAVRAS-CHAVE** - Quando em português/espanhol, acompanhadas de Key Words

1. **INTRODUÇÃO**
2. **MATERIAL E MÉTODOS**
3. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**
4. **CONCLUSÕES AGRADECIMENTOS REFERÊNCIAS**

**3.1. TÍTULO:** Deve ser claro, conciso e representativo do assunto tratado. Deve ser escrito em caixa alta, não excedendo 150 caracteres (incluindo espaços).

**3.2. AUTORES/FILIAÇÃO:** Devem ser fornecidos os nomes completos e por extenso dos autores, sua filiação (Instituição/Departamento) e endereço eletrônico. O autor que responderá pelo artigo deverá ter seu nome indicado pelo símbolo das correspondências eletrônicas e apresentar endereço completo para postagem.

**3.3. RESUMO:** Deve incluir objetivo(s), material e métodos (somente informação essencial para a compreensão de como os resultados foram obtidos), resultados mais significativos e conclusões do trabalho, contendo no máximo 2000 caracteres (incluindo espaços). E, para artigos em inglês, incluir o Resumo em português.

**3.4. PALAVRAS-CHAVE:** Devem ser incluídas logo após o Resumo e o Summary, de 3 a 8 palavras indicativas do conteúdo do trabalho.

**3.5. INTRODUÇÃO:** Deve reunir informações para uma definição clara da problemática estudada, fazendo referências à bibliografia atual e transcendente que permita situar o leitor e justificar a publicação do trabalho. Não deve exceder 30% do total de páginas do trabalho, e deve incluir seus objetivos ou hipóteses.

**3.6. MATERIAL E MÉTODOS:** Deve possibilitar a reprodução do trabalho realizado. A metodologia empregada deve ser descrita em detalhes apenas quando se tratar de desenvolvimento ou modificação de método. Neste último caso, deve destacar a modificação efetuada. Todos os métodos devem ser bibliograficamente referenciados.

**3.7. RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados devem ser apresentados e interpretados dando ênfase aos pontos importantes que deverão ser discutidos com base nos conhecimentos atuais. Deve ser evitada duplicidade de apresentação de resultados em Tabelas e Figuras. Sempre que possível, os resultados devem ser analisados estatisticamente.

**3.8. EQUAÇÕES E UNIDADES:** A numeração das equações deve ser feita na ordem em que aparecem no texto. O número deve estar entre parênteses, próximo à margem direita. Deve ser utilizado o Sistema Internacional de Unidades (SI) e as suas respectivas abreviaturas. Não serão aceitas quantidades expressas em outros sistemas de unidades.

**3.9. TABELAS E FIGURAS:** Devem ser numeradas em algarismos arábicos na ordem em que são mencionadas no texto. Seus títulos devem estar imediatamente acima das Tabelas e imediatamente abaixo das Figuras, e não devem conter unidades. As unidades devem estar, entre parênteses, dentro das Tabelas e nas Figuras. As Tabelas e Figuras devem ser inseridas no corpo do documento logo após terem sido mencionadas. Fotografias devem ser designadas como Figuras.

As Tabelas devem ser editadas utilizando os recursos próprios do editor de textos para este fim, usando apenas bordas horizontais. Devem ser auto-explicativas e de fácil leitura e compreensão.

As Figuras devem ser apresentadas nas dimensões em que serão publicadas. Devem ser utilizadas, de preferência, para destacar os resultados mais expressivos. Não devem repetir informações contidas em tabelas. Devem ser apresentadas de forma a permitir uma clara visualização e interpretação do seu conteúdo. As legendas devem ser curtas, auto-explicativas e sem bordas. Figuras coloridas somente deverão ser empregadas quando a cor for indispensável para a sua interpretação.

**3.10. ABREVIATURAS:** As abreviaturas devem ser evitadas. Se usadas, devem ser definidas na primeira vez em que forem mencionadas. As abreviaturas não devem aparecer no Título, nem, se possível, no Resumo.

**3.11. CONCLUSÕES:** Neste item deve ser apresentada a essência da discussão dos resultados, com a qual se comprova, ou não, a hipótese do trabalho ou se ressalta a importância ou contribuição dos resultados para o avanço do conhecimento. Este item não deve ser confundido com o Resumo, nem ser um resumo da Discussão.

**3.12. AGRADECIMENTOS:** são opcionais.

### **3.13. REFERÊNCIAS:**

#### **3.13.1 Citações no Texto**

As citações bibliográficas no texto são usadas em caixa alta apenas quando estiverem entre parênteses e, para referências com mais de 2 autores, deve-se usar a expressão et al. Mais de uma referência de mesma autoria são diferenciadas com letras minúsculas sequenciais, colocadas logo após o ano de publicação. Para citação de citação deve-se utilizar a expressão “apud” após o ano de publicação da referência, seguida da indicação da fonte secundária efetivamente consultada.

#### **Exemplos:**

“Hardshell” caracteriza a impermeabilidade do tegumento (BOURNE, 1997). Guerrero e Alzamorra (1998) obtiveram bom ajuste do modelo. Esses resultados estão de acordo com os verificados para outros produtos (CAMARGO e RASERAS, 2006; LEE e STORN, 2001) Vindiola et al. (1996) descobriram que a redução de crescimento em função desse elemento é significativa. Em contrapartida, a expressão de genes aumenta (ANDREWS et al., 2004; GUGLIELMINETTI et al., 2005) Além disso, há oportunidades para a criação de novos mercados para matérias-primas renováveis derivadas de produtos agrícolas na produção de filmes

(TANADA-PALMU e GROSSO, 2002a,b) Sobre esse assunto, são esclarecedoras as palavras de Silva (1986 apud CARNEIRO, 1981)

### 3.13.2 Referências

A lista de referências deve seguir o estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Norma: NBR6023, de agosto de 2002, na seguinte forma:

#### - Livros, manuais e folhetos como um todo

Sobrenome e iniciais dos prenomes do autor (nomes de mais de 1 autor devem ser separados por ponto e vírgula). **Título:** subtítulo. Edição (n. ed.), Local de Publicação: Editora, data de publicação. Número de páginas.

#### Exemplos

impressos

ISLABÃO, N. **Vitaminas:** seu metabolismo no homem e nos animais domésticos. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1997. 400 p.

RANGANNA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetables products.** New Delhi: Tata McGraw - Hill Publishing Company Limited, 1977. 634 p.

HOROWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16.ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1997. 1298 p.

FIRESTONE, D. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society.** 5.ed. Champaign: AOCS. 1998. 1300 p.

eletrônicos

LAWRENCE, Paul R. **Changing of organizational behavior patterns.** Piscataway: Transaction Publishers, 2001. Disponível em: <<http://search.epnet.com/direct.asp?an=7511860&db=buh>>. Acesso em: 22 maio 2004.

- **Capítulos de livros** AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título do livro.** Edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Capítulo, página inicial-final da parte.

#### Exemplo

CAMARGO, C. E. de O.; FERREIRA-FILHO, A. W. P. São Paulo State Brazil Wheat Pool. In: BONJEAN, A. P.; ANGUS, W. J. (Ed). **The world wheat book:** a history of wheat breeding. Paris: Lavoisier, 2000. cap. 21, p. 549-577.

- **Teses, dissertações e trabalhos de conclusão de curso** AUTOR. **Título.** Ano. Número de folhas. Categoria (Grau e área) - Unidade da Instituição, Instituição, Cidade.

#### Exemplo

QUINTEROS, E. T. T. **Processamento e estabilidade de néctares de acerola-cenoura.** 1995. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- **Artigos de periódicos** AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do Periódico** (por extenso), Local de publicação (cidade), volume, número, páginas inicial-final, ano de publicação.

#### Exemplo

SRIMATHI, P.; MALARKODI, K.; GEETHA, R.; KRISHNASAMY, V. Nutrient pelleting to augument quality seed production in soybean. **Seed Research,** New Delhi, v. 30, n. 2, p. 186-189, 2002.

#### - Trabalho apresentado em evento

AUTOR. Título do trabalho apresentado, seguido da expressão In:, NOME DO EVENTO, numeração do evento (se houver), ano e local (cidade) de realização. **Título do documento** (anais, atas, tópico temático, etc.), local: editora, data de publicação. página inicial e final da parte referenciada.

#### Exemplos

impressos

BRAYNER, A. R. A.; MEDEIROS, C. B. Incorporação do tempo em SGBD orientado a objetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS, 9., 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 1994. p. 16-29.

eletrônicos

ANDION, C. As particularidades da gestão em organizações da economia solidária. In: ENCONTRO NACIONAL DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ADMINISTRAÇÃO, 25., 2001, Campinas. **Anais...** Rio de Janeiro: ANPAD, 2001. 1 CD-ROM.

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPe, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: UFPe, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

- **Normas técnicas** ÓRGÃO NORMALIZADOR. **Número da norma:** título da norma. Local (cidade), ano. nº de pág. (opcional)

**Exemplos:**

ASTM INTERNATIONAL. **D 3985-05:** standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. Philadelphia, 2005. 7 p. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação – Referências -Elaboração. Rio de Janeiro, 2002

#### 4. INFORMAÇÕES GERAIS

Os Artigos ou Notas Científicas devem ser enviados à Secretaria da Revista, em disquete de 3 ½” ou CD regravável, acompanhados de três vias impressas.

Além do trabalho, o autor deve enviar para a revista, em folha à parte, as seguintes informações:

- **Qual o objetivo principal do seu trabalho**
- **Qual (quais) é (são) o(s) fato(s) inédito(s) do seu trabalho**

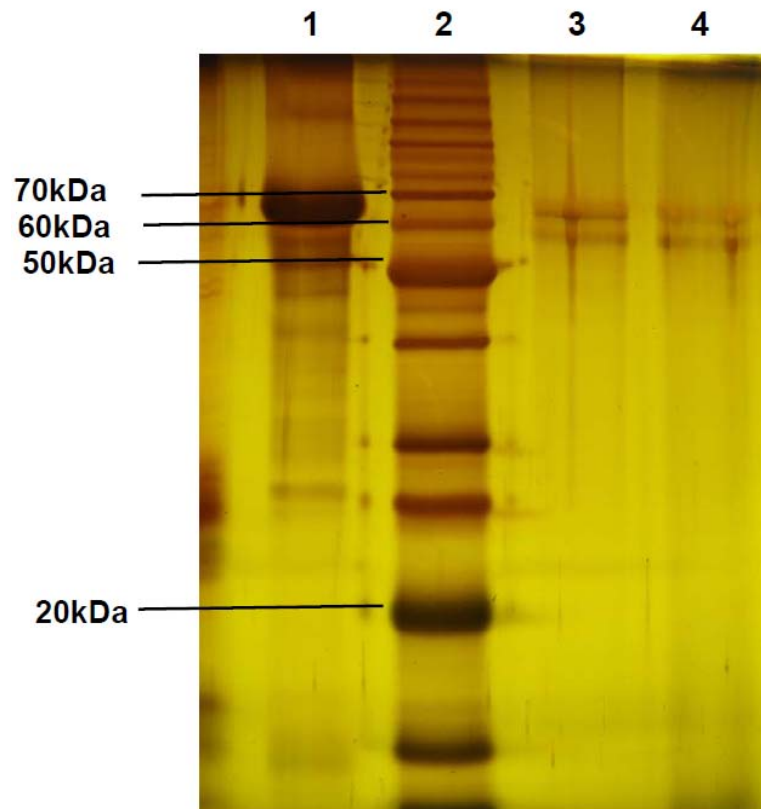
Os trabalhos devem estar explicitamente direcionados para a avaliação como “Artigo Científico” ou “Nota Científica”. Deve também ser enviado o **Termo de Responsabilidade** assinado pelos autores (acesso pelo site da Revista – <http://www.ital.sp.gov.br/bj/arquivos/declaracao.pdf>) Os artigos publicados serão cobrados por página diagramada, cujo valor está disponível no site da Revista. Os trabalhos devem ser enviados pelo correio para: Brazilian Journal of Food Technology A/C Dra. Eliete Vaz de Faria – Editor Científico Caixa Postal, 139 13.070-178 – Campinas – SP

e-mail: [secbjft@ital.sp.gov.br](mailto:secbjft@ital.sp.gov.br) – NÃO USAR PARA ENVIAR MANUSCRITOS

**ANEXO B**

Teste de Biureto qualitativo aplicado à manoproteína obtida

## ANEXO C



Perfil eletroforético da manoproteína em poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata

1. Albumina Sérica Bovina (BSA) – 66 kDa
2. Padrão de peso molecular (Invitrogen®) – 10-220kDa
3. Manoproteína (10 $\mu$ g/mL)
4. Manoproteína (50 $\mu$ g/mL)