



Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria

Ariane Gaspar Costa, Marciane Magnani* e Raul Jorge Hernan Castro-Gomez

Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380, Cx. Postal 6001, 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: magnani2@gmail.com.br

RESUMO. A biomassa de levedura resultante da produção de cerveja é matéria-prima para extração de componentes celulares, incluindo manoproteínas. O presente trabalho avaliou a possibilidade da utilização da levedura *Saccharomyces* sp. descartada em cervejaria, para obtenção de extrato com manoproteínas. A extração foi conduzida segundo delineamento fatorial incompleto, Box-Behnken 3³, para as variáveis temperaturas (75, 85 e 95°C), tempo de extração (5, 7 e 9h) e concentração da suspensão de parede celular (10, 15 e 20%). O etanol residual da fermentação não interfere na obtenção do extrato contendo manoproteínas. O maior índice de extração foi 4,08%, observado para temperatura de 95°C na concentração de 10% por 7h e 15% por 9h. A validação experimental do maior índice predito resultou em 4,50% de extrato, confirmando a capacidade preditiva do modelo. A manoproteína obtida, a partir de 10% de parede celular (95°C, 9h), apresentou 51,39% de proteínas, com 58 e 64 kDa, e 25,89% de carboidratos, distribuídos entre manose e glicose. A atividade emulsificante foi de 62,50 ± 0,88% e a estabilidade da emulsão foi de 96,00 ± 1,40%. Estes resultados evidenciam o potencial bioemulsificante do extrato e a viabilidade de utilização da levedura descartada em cervejarias para obtenção de compostos com propriedades industriais interessantes.

Palavras-chave: *Saccharomyces* sp., bioemulsificante, levedura cervejeira.

Obtainment and characterization of mannoproteins from brewer's yeast cell wall

ABSTRACT. 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. for obtainment of extract containing mannoprotein. The extraction was conducted by Box-Behnken 3³ incomplete design, for the variables temperature (75, 85 and 95°C), time of extraction (5, 7 and 9h) and concentration of cell wall in suspension (10, 15 and 20%). The residual ethanol of fermentation doesn't have interference in the obtaining of extract containing mannoproteins. The highest rate of extraction was 4.08%, obtained at 95°C, with 10% cell wall by 7h and with 15% of cell wall during 9h. The experimental validation for obtaining of the maximum predicted resulted in 4.50% of extract, confirming the model predictable capacity. The extract containing mannoprotein obtained from 10% of cell wall (95°C, 9h) had 51.39% of proteins, with 58 and 64 kDa, and 25.89% of carbohydrates, distributed in mannose and glucose. The emulsification activity was 62.50 ± 0.88% and the emulsion stability was 96.00 ± 1.4%. These results evidence the bioemulsifier potential of the extract and the viability of using spent yeast from brewery for obtainment of compounds with industrial interesting properties.

Keywords: *Saccharomyces* sp., bioemulsifier, brewery yeast.

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) como agentes biológicos de transformação em indústrias de bebidas fermentadas, de panificação e destilarias de etanol. O 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 (BELEM; LEE, 1997; KOLLAR et al., 1992). Dentre estes compostos, as manoproteínas destacam-se pelas propriedades imunoestimulantes (KRIZKOVÁ et al., 2001; PIETRELLA et al., 2001; PITZURRA et al., 2000; WANG et al., 1998) e bioemulsificantes (BARRIGA

et al., 1999; CAMERON et al., 1988; TORABIZADEH et al., 1996).

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 β -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, utilizando um subproduto descartado em cervejarias, com aplicação de tratamentos térmicos mais amenos do que os já descritos (FREIMUND et al., 2003; TORABIZADEH et al., 1996). Foi também avaliada a viabilidade do reaproveitamento da biomassa de levedura, descartada após o processo fermentativo, sem a retirada do etanol residual.

Material e métodos

Material biológico: após processo de produção de cerveja por baixa fermentação, a levedura *Saccharomyces* sp. foi coletada em suspensão denominada creme de levedura, contendo concentrações de sólidos totais de $20 \pm 0,7\%$ e teor alcoólico em torno de 7% de etanol.

Preparo do creme de levedura para processamento: o creme de levedura adicionado de 20% (p v⁻¹) de água destilada foi tamisado sequencialmente em malhas de 0,59; 0,50 e 0,18 mm. Posteriormente, foi lavado novamente em água destilada e centrifugado a 5.000 g, (10°C, 5 min.) 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 por meio da metodologia adaptada de Kaye e Haag (1954), que se baseia na redução do dicromato de potássio pelo etanol, sendo este mensurado em espectrofotômetro a 605 nm. As amostras de creme de levedura submetidas à lavagem foram designadas como “sem etanol” e aquelas somente diluídas e tamizadas receberam a denominação “com etanol”.

Autólise e obtenção da parede celular: em concentração de 20% em base seca (p p⁻¹), a suspensão de creme de levedura foi ajustada para pH 5,0 utilizando soluções de NaOH ou HCl 1 M e

mantida a 50°C, sob agitação, durante 24h, conforme Chaud e Sgarbieri (2006). Decorrido este tempo, a suspensão foi centrifugada nas condições descritas anteriormente e o precipitado, correspondente à parede celular, ressuspenso em água destilada (p p⁻¹). A parede celular obtida foi lavada duas vezes com água destilada (p p⁻¹). A taxa de autólise foi determinada por meio da fórmula:

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

em que:

A = Taxa de autólise percentual;

X₁ = Massa de parede celular obtida (base seca);

X₂ = Massa de células utilizada no processo (base seca).

Obtenção de extrato contendo manoproteínas e interferência do etanol no processo: a parede celular em suspensão de 15% em base seca foi tratada termicamente a 85°C durante 7h, sob agitação de 100 rpm. Feito isso, foi resfriada até 45°C e centrifugada a 5.000 g, 4°C, 10 min. O sobrenadante recuperado foi adicionado de três volumes de etanol absoluto e incubado a 4°C por 12h para precipitação do extrato contendo manoproteínas. O material foi lavado duas vezes com etanol absoluto por centrifugação a 5.000 g, 10°C, 5 min. O precipitado foi liofilizado e o índice de extração determinado pela equação:

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

em que:

E = índice percentual de extração;

Y₁ = Massa de extrato obtido (base seca);

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

Para avaliação de possíveis interferências do etanol residual no processo de extração proposto, amostras de creme de levedura com etanol e sem etanol foram submetidas 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 obtenção de manoproteínas pelas condições descritas anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias dos índices de extração de cada tratamento comparadas pelo teste *t* com auxílio do programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001).

Delineamento para condições de extração de manoproteínas: o delineamento foi realizado no

programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001) 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 à temperatura: 75; 85 e 95°C, tempo de processo: 5, 7 e 9h, e concentração da suspensão de parede celular em base seca: 10, 15 e 20%. A definição das variáveis e dos níveis de variação foi baseada na literatura e em experimentos preliminares.

Métodos analíticos: as frações utilizadas para a avaliação da interferência do etanol e obtenção do extrato contendo 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 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (HOROWITZ, 1997). 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*.

Composição do extrato contendo manoproteínas: o extrato obtido foi igualmente caracterizado quanto à composição centesimal por meio das técnicas descritas pela AOAC (HOROWITZ, 1997). O teor de carboidratos totais foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 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 micronutrientes foram realizadas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), utilizando espectrofotometria de emissão de plasma e fotometria de chama.

Para a análise qualitativa dos carboidratos constituintes foi realizada cromatografia de camada delgada, segundo Moreira et al. (1998), empregando-se solução eluente composta por clorofórmio:metanol:ácido acético:água [4:4:1:1 (v⁻¹ v⁻¹ v⁻¹ v⁻¹)] e revelador de anisaldeído, ácido sulfúrico e ácido acético [1:2:100 (v⁻¹ v⁻¹ v⁻¹)]. A placa revelada foi mantida em estufa a 110°C durante 10 min. e visualizada sob luz ultravioleta de onda curta (365 nm).

A fração proteica foi analisada pelo método de Biureto (GORNALL et al., 1949) de forma qualitativa, utilizando suspensão do extrato em concentração 50 mg mL⁻¹. O peso molecular desta fração foi determinado em gel desnaturante de

poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), revelado em solução de nitrato de prata. Foram utilizadas soluções de extrato em concentrações de 10 e 50 µg mL⁻¹ e o perfil eletroforético obtido foi comparado ao padrão de peso molecular 220-10 kDa (Invitrogen®).

Verificação das propriedades emulsificantes: a atividade emulsificante foi verificada conforme descrito por Martinez-Checa et al. (2007). Uma mistura contendo 5 mL de água, 5 mL de óleo de soja (Soya®) e 0,5 g do extrato foi agitada a 9.500 g durante 1 min. em agitador de haste (Heidolf). A emulsão obtida foi centrifugada a 2.500 g, 25°C, 5 min. O índice de atividade emulsificante foi determinado pela equação:

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

em que:

I.A.E. = Índice percentual de atividade emulsificante;

V_e = Volume de emulsão (mL);

V_t = Volume total da solução (mL).

A emulsão obtida foi avaliada quanto à estabilidade pelo tratamento a 80°C durante 30 min., seguido de resfriamento em água corrente por 10 min. A emulsão foi novamente centrifugada e o volume de emulsão remanescente foi verificado. O índice de estabilidade da emulsão foi calculado de acordo com a fórmula:

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

em que:

I.E.E. = Índice percentual estabilidade da emulsão;

V_{ef} = Volume de emulsão final (mL);

V_{ei} = Volume de emulsão inicial (mL).

Considerando que o extrato que contém manoproteína obtido não foi purificado, as propriedades emulsificantes de uma lecitina de soja não-purificada, disponível comercialmente em casa de produtos naturais, foram também analisadas para efeito de comparação.

Resultados e discussão

Interferência do etanol no índice de extração de extrato bruto contendo manoproteína: para analisar a influência do etanol residual na extração, o procedimento de limpeza do creme de levedura foi padronizado. A concentração de etanol no sobrenadante de cada lavagem está apresentada na Figura 1.

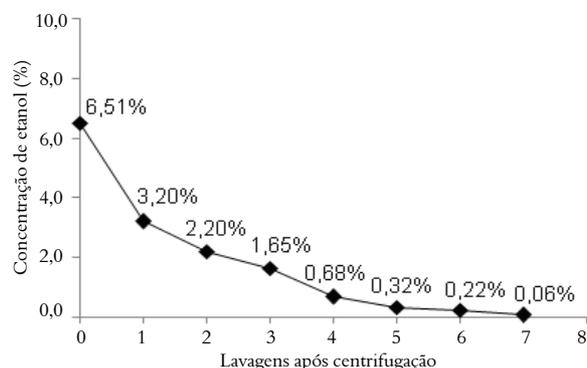


Figura 1. Concentração de etanol no sobrenadante de cada lavagem com água destilada após sucessivas centrifugações do creme de levedura de cervejaria.

A limpeza do creme de levedura mostrou-se eficiente para a redução do teor de etanol, que foi 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 previsto, não foi detectado etanol na porção “sem etanol”. O elevado teor de etanol detectado no creme de levedura concorda com a 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.

As taxas de autólise do creme de levedura com etanol e sem etanol não apresentaram diferenças significativas, sendo $52,99 \pm 7,08\%$ para o creme com etanol e $52,57 \pm 5,20\%$ creme sem etanol, embora o etanol seja descrito como agente autolisante (CHAUD; SGARBIERI, 2006). Nas concentrações presentes no creme de levedura, o etanol não promoveu alterações na autólise, concordando com relatos de que o grau alcoólico em torno de 11% não é considerado inibidor deste processo (REVILLION et al., 1996). Ao contrário do observado para a taxa da autólise, houve diferença entre os índices da extração de manoproteínas da parede celular com etanol e sem etanol ($p < 0,05$), sendo $2,39 \pm 0,11\%$ a taxa para a fração com etanol e $1,31 \pm 0,13\%$ para aquela sem etanol. Supostamente, esta diferença está relacionada à perda de proteínas hidrossolúveis, durante as sucessivas lavagens da parede celular para retirada do etanol.

Análises referentes à composição centesimal foram realizadas utilizando as mesmas suspensões nos processos de autólise e extração. Os resultados em base seca estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal referente às suspensões de creme de levedura de cervejaria e parede celular com e sem etanol, expressas em base seca.

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

*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 et al. (1999) relataram 48,74% de proteínas (%N x 5,8), 8,55% de cinzas, 3,33% de lipídios e 35,00% 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 a este relatado, Thammakiti et al. (2004) 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 uma situação de estresse celular, induzindo alterações quantitativas e organizacionais na composição da parede celular. As manoproteínas, componentes da camada externa da parede celular, são amplamente afetadas e podem organizar-se de modo distinto, alterando inclusive propriedades da parede celular como solubilidade e biodisponibilidade.

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. A perda de minerais pode estar relacionada ao aumento da solubilidade dos mesmos durante as lavagens, intensificada no tratamento térmico da autólise.

A fração de parede celular com etanol resultou em um índice maior de extração e foi utilizada nos

ensaios de avaliação das condições de extração. A possibilidade de utilizar o creme de levedura sem pré-tratamento aumenta a viabilidade de aproveitamento deste subproduto descartado em grandes quantidades pelas cervejarias.

Delineamento das condições de extração de manoproteína: o delineamento fatorial com as variáveis codificadas e reais e o respectivo índice de manoproteína obtida estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis reais e codificadas (cod.) correspondentes a cada tratamento para extração de manoproteínas de creme de levedura de cervejaria com o índice de extração correspondente.

Ensaio	Temperatura (°C)		Tempo (horas)		Concentração (%)		Índice (%)
	Real	Cod. x_1	Real	Cod. x_2	Real	Cod. x_3	
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 2, os tratamentos das suspensões 10% de parede celular com 7h de extração e 15% com 9h, ambos a 95°C, permitiram o maior índice de extração, correspondente a 4,08% de extrato contendo manoproteína. O menor índice observado, de 0,92%, foi para o tratamento da suspensão de 20% de parede celular, a 75°C e 7h. O maior índice de extração 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 5h. Em contrapartida, Torabizadeh et al. (1996) relataram índice em torno de 4% de manoproteína para extração a 121°C durante 15 min. É importante considerar que a levedura utilizada no processo de extração aqui descrito foi coletada após desgaste promovido por vários processos de fermentação.

O índice de correlação (R^2) ajustado, observado na Anova, foi de 0,73 e o desvio de regressão 0,75, indicando que o modelo se aplica para ajuste dos dados experimentais estudados. O cálculo dos coeficientes permitiu definir a equação simplificada do modelo, para o índice de extração do extrato contendo 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 significância para o efeito positivo do tempo de extração (x_2) e para o efeito negativo da concentração (x_3), sendo $p \leq 0,05$. O efeito negativo da concentração 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.

A temperatura (x_1) apresentou efeito positivo ($p \leq 0,01$) e a interação temperatura-concentração ($x_1 \times x_3$) apresentou efeito negativo ($p \leq 0,05$). 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.

Os demais efeitos, embora não-significativos em nível de 95%, influenciam no ajuste do modelo aos índices observados e, portanto, seus coeficientes foram mantidos na equação.

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 9h, com uma suspensão de 10% de parede celular. Esses dados foram validados experimentalmente em ensaios conduzidos em duplicata, e foi observado índice de extração de $4,50 \pm 0,05\%$, confirmando a previsão descrita pelo modelo.

Composição do extrato contendo manoproteína: a composição centesimal do extrato com manoproteína, extraída a 95°C por 9h, a partir de suspensão contendo 10% de parede celular, apresentou $51,39 \pm 1,2\%$ de proteínas, $25,89 \pm 0,1\%$ de carboidratos, $12,21 \pm 0,5\%$ de lipídios e $10,51 \pm 0,4\%$ de resíduo mineral fixo.

Conforme Kitagi et al. (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 glicoproteica da fração extraída. Segundo Barriga et al. (1999), manoproteínas contendo 30 a 50% de proteínas correspondem à classe de manoproteínas com funções enzimáticas, que apresentam mananas curtas, não-fosforiladas, ligadas à proteína por ligações tipo O com resíduos de serina ou treonina.

A composição de macronutrientes determinada no presente estudo para o extrato de manoproteína foi de 2,22 g% de fósforo, 1,2 g% de potássio, 0,19 g% de cálcio, 0,45 g% de magnésio e 0,28 g% de enxofre. A análise de micronutrientes revelou 0,69 mg% de cobre, 3,17 mg% de zinco, 0,79 mg% de boro, 5,69 mg% de ferro, 2,94 mg% de manganês e 160 mg% de sódio. A grande diversidade de nutrientes encontrada para o extrato de 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 pelos 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 et al. (1998) para a xantana, composta por glicose, manose e ácido glicurônico. Neste aspecto, Krizková 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 proteica das manoproteínas obtidas. O perfil eletroforético de SDS-PAGE da manoproteína revelou proteínas com peso molecular de aproximadamente 58 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 proteica sugere que o extrato obtido é capaz de reduzir a tensão superficial formando emulsões com boa estabilidade.

Propriedades emulsificantes: o extrato contendo manoproteína, obtido 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. Em comparação à lecitina de soja não-purificada, I.A.E. $73,00 \pm 0,78\%$ e I.E.E. $99,6 \pm 0,53\%$, o extrato apresentou atividade emulsificante inferior, porém valores próximos para estabilidade da emulsão.

Conforme Barriga et al. (1999), que fracionaram um bioemulsificante extraído de *S. cerevisiae*, a porção proteica 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 o extrato obtido 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 indústrias de alimentos e farmacêuticas (BANAT et al., 2000). Além disso, a obtenção de um bioemulsificante, a partir de leveduras descartadas em processos industriais, é economicamente favorável, porque converte um resíduo de baixo valor em um produto rentável (BARRIGA et al., 1999).

Conclusão

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

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado para A. G. C.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado de M. M.

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, n. 2, 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, n. 5, p. 495-508, 2000.
- BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R. Components of the emulsifier from

- Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 2, 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.
- 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 form 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- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, 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 of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- HOROWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997.
- KAYE, S.; HAAG, H. B. J. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal of Forensic Medicine**, v. 1, n. 6, p. 373-381, 1954.
- KITAGI, H.; SHIMOI, H.; ITOH, K. Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, TirlplSrplp in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 249, n. 1, p. 343-349, 1997.
- KLIS, F. M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 7, p. 851-869, 1994.
- KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.
- KRIZKOVÁ, L.; DURACKOVA, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVA, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, n. 2, 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.; HADJILOV, 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 β -1,6-glucan fine structure. **Analytical Biochemistry**, v. 301, n. 1, p. 136-150, 2002.
- MARTINEZ-CHECA, F.; TOLEDO, F. L.; MABROUKI, K.; QUESADA, E.; CALVO, C. Characteristics of bioemulsier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3130-3135, 2007.
- MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. 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, n. 1, 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, n. 5, 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, n. 2, p. 558-563, 2000.
- REVILLION, J. P. P.; PIBERNAT, C. C.; GIULIANI FILHO, J.; AYUB, M. A. Z. 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, n. 2, p. 154-162, 1999.
- SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S. D.; BALDINI, V. L. S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1/2, p. 119-125, 1999.
- STATSOFT. **Statistica** (data analysis software system) version 6. Tulsa, 2001.
- THAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent

brewer's yeast β -glucans for potencial applications in the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 21-29, 2004.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. A. Preparation and Characterization of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 29, n. 8, p. 734-737, 1996.

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, n. 4, 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, p. 787-793, 1998.

Received on May 21, 2009.

Accepted on February 11, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.