



Semina: Ciências Agrárias

ISSN: 1676-546X

semina.agrarias@uel.br

Universidade Estadual de Londrina
Brasil

Martins Oliveira, Antonio; Hernan C. Gómez, Raul Jorge
Otimização da extração de proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*
Semina: Ciências Agrárias, vol. 26, núm. 4, outubro-diciembre, 2005, pp. 521-534
Universidade Estadual de Londrina
Londrina, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744078009>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

re²alyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Otimização da extração de proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Optimization of protein extraction from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Antonio Martins Oliveira¹; Raul Jorge Hernan C. Gómez^{2*}

Resumo

Este trabalho objetivou determinar os melhores níveis de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio para a extração de proteínas de células de levedura pelo processo de autólise. O extrato celular foi obtido a partir da levedura comercial prensada *Saccharomyces cerevisiae* e para análise estatística e definição dos níveis das variáveis temperatura (32,0 a 52,0°C), pH (1,32 a 7,00) e NaCl (2,0 a 75,0%) utilizou-se a metodologia da Análise de Superfície de Resposta. Os resultados obtidos por meio desta metodologia mostraram como melhores condições: temperaturas entre 49,0 e 51,0°C combinadas com valores de pH entre 3,8 e 5,0 e concentrações de cloreto de sódio entre 10,0 e 12,0% (p/v), entretanto, concentrações de NaCl superiores a 12,0% não se mostraram favoráveis.

Palavras-chave: Levedura, extração de proteínas, autólise

Abstract

This work aimed to determine the optimum temperature, pH and sodium chloride sodium concentration for protein extraction of yeast cells during autolysis process. The cellular extract was obtained using commercial compressed baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and for statistical analysis and definition of the variation levels of temperature (32,0 to 52,0°C), pH (1,32 to 7,00) and NaCl (2,0 to 75%) the Response Surface Analysis Methodology was used. The result obtained showed that the best extraction conditions were: temperature between 49,0 and 51,0°C combined with pH values between 3,8 and 5,0 and sodium chloride concentration between 10,0 and 12,0% (w/v), however, sodium chloride concentration higher than 12% was not recommended.

Key words: Yeast, extraction of proteins, autolysis

¹ Professor do Curso de Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – Fema/Imesa - Assis – SP. E-mail: quimica@femanet.com.br

² Professor Orientador do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Centro de Ciências Agrárias/CCA - Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86051-970 – Londrina. PR. E-mail: rcastrog@yahoo.com

* Autor para correspondência.

Introdução

A utilização de derivados de microrganismos unicelulares, para geração de produtos de interesse comercial, tem recebido considerável atenção por parte da indústria alimentícia. As proteínas de levedura, devido ao seu elevado valor nutricional e propriedades físico-químicas desejáveis, se apresentam como uma alternativa tecnológica favorável para aplicação em diversas formulações de alimentos (KINSELLA, 1987 apud SGARBIERI et al., 1999).

As indústrias cervejeiras e suco-alcooleiras com excedentes de produção de leveduras, tem interesse, e destacado a necessidade de diversificação de seus produtos. O aproveitamento de biomassa por meio de seu fracionamento para a produção de derivados com propriedades diferenciadas, poderá abrir um leque de aplicações e agregar valor aos produtos, tornando mais rentáveis esses setores agroindustriais e a criação de novas alternativas para indústria alimentícia (ASSIS, 1996; SGARBIERI et al., 1999).

Dentre os processos conhecidos para extração de proteínas de microrganismos, a autólise tem se mostrado como sendo uma alternativa de características simples e com amplas possibilidades que oferece além do uso de aceleradores baratos como cloreto de sódio, a utilização de concentração de levedura em torno de 15,0 a 30,0% por 24 a 36 horas em temperaturas variando entre 30,0 a 70,0°C. A adição de solventes orgânicos como toluol e clorofórmio, favorece a autólise e previne a deterioração por microrganismos, entretanto, tais substâncias não são aprovadas como aditivos para alimentos processados e poderá necessitar ainda de um tempo elevado de extração (SUGIMOTO; YOKOTSUKA; TAKEUCHI, 1973; REED; NAGODAWITHANA, 1991).

A literatura pouco informa sobre os melhores níveis de pH, temperatura e concentração de cloreto de sódio para um eficiente processo de autólise de leveduras, entretanto, Feuillat e Charpentier (1982), demonstraram que em uma solução tampão pH 5, a

liberação dos componentes intracelulares é mais rápida numa faixa de temperatura compreendida entre 44,0 e 55,0°C em relação a 36,0°C. Por outro lado, verificou-se também que, após aquecimento a 55,0°C durante 4 horas, a concentração de aminoácidos na suspensão celular não aumenta, entretanto, à temperatura de 36,0°C a autólise continua por 48 horas ou até mais e as concentrações de nitrogênio obtidas poderão ser tão altas quanto àquelas obtidas a 44,0°C. Sugimoto, Yokotsuka e Takeuchi (1973) e Jimenez, Badia e Diaz (1993), mencionam processos realizados em pH 4,0 e Révillion e Pibernat (1996), afirmam que uma alta atividade autolítica poderá ocorrer em pH em torno de 3,0 a 5,0.

Visando estudar tais condições, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito e as interações entre as variáveis temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio no processo de rompimento e liberação dos componentes intracelulares por autólise, especialmente as proteínas intracelulares.

Material e Métodos

Microorganismo

Levedura comercial prensada, *Saccharomyces cerevisiae* úmida, com viabilidade celular inicial em torno de 98%.

Viabilidade Celular

Método da coloração de células mortas com vermelho de eritrosina e leitura no microscópio óptico comum segundo Bonneu. (1991).

Proteína Bruta

Sistema automatizado, Leco FP-528, certificado pela Association of Official Agricultural Chemists, (1990) com conversão do teor de nitrogênio total em proteína pelo fator 5,8 segundo Sgarbieri et al. (1999), para compensação dos ácidos nucleicos presentes nas células.

Proteínas Solúveis no Extrato Líquido autolisado

Aplicou-se o método de Lowry et al. (1951) no extrato líquido obtido após a eliminação dos resíduos celulares por centrifugação a 18.000 G por 15 minutos a 10°C.

Porcentagem de Solubilização Protéica (γ)

Para a determinação da eficiência da extração ou porcentagem de solubilização protéica (γ), determinou-se inicialmente a concentração de proteínas, em mg/mL, na suspensão de células íntegras antes da autólise (β) cujo cálculo procedeu-se com o uso da seguinte expressão:

$$\beta = \frac{\% \text{ proteína bruta em base seca de biomassa } \times \text{ massa de levedura seca inicial (mg)}}{100 \times \text{volume da suspensão de leveduras (mL)}}$$

Em seguida, quantificou-se pelo método de Lowry, a concentração de proteínas solúveis (mg/mL) presente no extrato líquido obtido da centrifugação após a autólise (α) e calculou-se então a % de extração protéica em relação a quantidade máxima de proteína presente em cada mL de suspensão de células íntegras pela seguinte expressão:

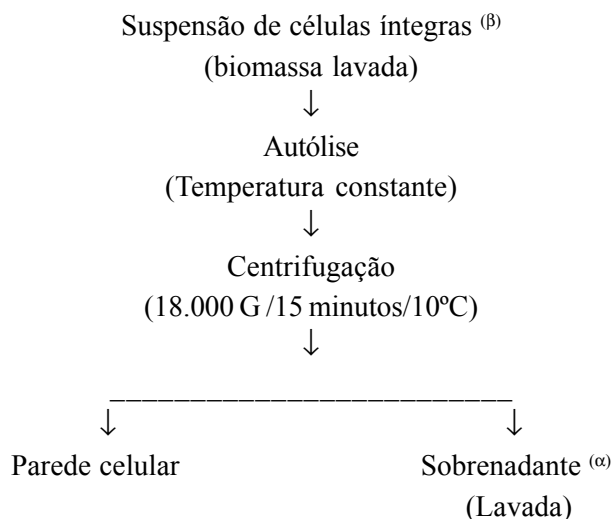
$$\gamma = \frac{\alpha}{\beta} \times 100$$

γ = Porcentagem de solubilização protéica (ou eficiência de extração),

α = Concentração de proteína solúvel (mg/mL) presente no extrato líquido (após autólise),

β = Concentração de proteína total (mg/mL) na suspensão de células íntegras (antes da autólise).

Fluxograma da Extração Protéica



Definição dos Ensaios e Níveis das Variáveis de Trabalho

O trabalho foi desenvolvido em três ensaios e os resultados avaliados pela metodologia de superfície de resposta basearam-se na concentração de proteína solúvel (mg/mL) presente no extrato líquido após autólise (α) e na porcentagem de solubilização protéica (γ).

Ensaio (I)

Definição dos Níveis das Variáveis Independentes

Utilizou-se o delineamento fatorial incompleto com pontos equidistantes para três (3) variáveis, em três (3) níveis de variação (3^3). O planejamento experimental, foi constituído por um grupo de ensaios com doze experimentos e outro com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios. Os parâmetros estudados e seus níveis de variação são demonstrados na Tabela 1.

Preparo das Suspensões e Autólise

As suspensões celulares, preparadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, corresponderam a um

volume de 200 mL a uma concentração de 15,0% (p/v) de levedura em base seca, sendo a temperatura, o pH e a concentração de NaCl definidas conforme delineamento da Tabela 1. O pH inicial foi corrigido, as temperaturas dos experimentos foram controladas em banho-maria com agitação esporádica por 24 horas e as amostras foram analisadas quanto ao teor de proteínas solúveis (α) a cada 8 horas.

Ensaio (II)

Definição dos níveis das variáveis independentes

Empregou-se o desenho fatorial fracionado $3^{(3-1)}$, com 3 variáveis independentes em 3 níveis

equidistantes. Os níveis das variáveis estudadas (X_1 : temperatura, X_2 : pH e X_3 : cloreto de sódio) e o planejamento experimental constituído por 9 experimentos são mostrados na Tabela 2.

Ensaio (III)

Definição dos níveis das variáveis independentes

Utilizou-se o método da Análise de Superfície de Resposta aplicado no ensaio (I) e a definição dos níveis das variáveis independentes e o desenho estatístico experimental com os valores codificados encontram-se esquematizados na Tabela 3 (BOX; BENKEN, 1960).

Tabela 1. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio I).

Variáveis independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X_1 : temperatura (°C)	32,00	42,00	52,00
X_2 : % cloreto de sódio	2,00	7,00	12,00
X_3 : pH	3,00	5,00	7,00

Tabela 2. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio II).

Variáveis independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X_1 : temperatura (°C)	50,00	52,00	54,00
X_2 : pH	4,50	5,50	6,50
X_3 : % NaCl	8,00	10,00	12,00

Tabela 3. Definição dos níveis das variáveis independentes (Ensaio III).

Variáveis independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
X_1 : temperatura (°C)	48,00	49,00	50,00
X_2 : % NaCl	45,00	60,00	75,00
X_3 : pH	4,50	4,80	5,10

Monitoramento Experimental

As suspensões de células íntegras, foram preparadas em frascos de Erlenmeyer de 500 ml a uma concentração de 30,0% (p/v) e cloreto de sódio variando de 45,0 a 75,0% sobre a matéria seca de levedura conforme níveis e desenho experimental descritos na Tabela 3. O pH foi corrigido e as suspensões mantidas em banho-maria em suas respectivas temperaturas por 48 horas.

Determinou-se inicialmente na suspensão não autolisada o potencial de solubilização e após a autólise o teor de proteínas solúveis, através do método de Lowry et al. (1951).

Resultados e Discussão**Ensaio (I)**

As respostas teor de proteína solúvel (α) e porcentagem de solubilização protéica (γ) nos extratos líquidos dos autolisados em 24 horas são mostrados na Tabela 4.

A análise de cada experimento da Tabela 4, indica que o experimento 10 foi o mais adequado em termos de eficiência de extração, entretanto, o objeto de estudo foi a avaliação dos efeitos interativos entre ambas as variáveis, conforme indicam os resultados das análises de variância representados na Tabela 5.

Tabela 4. Teores de proteínas solúveis (α) e porcentagem de solubilização protéica (γ) no sobrenadante (Ensaio I/ 24horas de autólise).

Experimento	T (°C)	% NaCl	pH	Proteína solúvel mg/mL (α)	% solubilização protéica (γ)
01	32,00	2,00	5,00	4,60	6,59
02	52,00	2,00	5,00	10,16	14,56
03	32,00	12,00	5,00	8,02	11,49
04	52,00	12,00	5,00	19,58	28,05
05	32,00	7,00	3,00	6,81	9,76
06	52,00	7,00	3,00	16,73	23,97
07	32,00	7,00	7,00	7,12	10,20
08	52,00	7,00	7,00	13,19	18,90
09	42,00	2,00	3,00	17,71	25,37
10	42,00	12,00	3,00	24,12	34,56
11	42,00	2,00	7,00	14,46	20,72
12	42,00	12,00	7,00	21,51	30,82
13	42,00	7,00	5,00	19,16	27,45
14	42,00	7,00	5,00	18,91	27,09
15	42,00	7,00	5,00	20,28	29,06

Tabela 5. Análise de variância para o teor de proteínas no extrato líquido do autolisado em 24 horas de autólise (Ensaio I/24horas de autólise).

Fator	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
X ₁ : temperatura (L)	1	137,0340	137,0340	257,4376	0,003862*
temperatura(Q)	1	277,7869	277,7869	521,8615	0,001911*
X ₂ : NaCl (L)	1	86,4612	86,4612	162,4296	0,006100*
NaCl (Q)	1	0,1281	0,1281	0,2406	0,672295
X ₃ : pH (L)	1	10,3285	10,3285	19,4036	0,047867*
pH (Q)	1	0,1281	0,1281	0,2406	0,672295
X ₁ x X ₂	1	9,0000	9,0000	21,0588	0,005899*
X ₁ x X ₃	1	3,7056	3,7056	8,6707	0,032085*
X ₂ x X ₃	1	0,1024	0,1024	0,2396	0,644521
Desvio da regressão	3	1,0723	0,3574	0,6715	0,644540

*significativo a nível de 5% ($p \leq 0,05$).

Os resultados foram significativos ao nível de 5% com efeito linear para temperatura, cloreto de sódio e pH e para o efeito quadrático apenas a temperatura. No caso das interações, foram significativos os efeitos $X_1 \times X_2$ e $X_1 \times X_3$, ou seja temperatura x cloreto de sódio e temperatura x pH. O modelo apresentou um bom ajuste, para um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99597 e com um desvio da regressão ("Lack of Fit") não significativo de 0,64454, indicando, portanto, que o modelo matemático elaborado a partir dos dados experimentais foi adequado.

A análise de variância para a porcentagem de solubilização protéica (γ), no extrato líquido após 24 horas de autólise se deu igualmente ao caso anterior e verificou-se que, afetaram significativamente esta resposta os efeitos lineares da temperatura, concentração de NaCl e pH, o mesmo acontecendo para os efeitos quadrático e interações.

As Figuras 1 (a,b,c) e 2 (a,b,c) mostram respectivamente, as variações nos teores de proteínas solúveis e porcentagem de solubilização protéica, no sobrenadante às 24 horas de extração, em função das interações entre as variáveis independentes estudadas.

Verificou-se que a temperatura entre 40,0 a 50,0°C encontraram-se as respostas máximas para concentrações de NaCl superiores a 10,0 g/100,0 g de levedura em base seca. Quanto ao pH, observou-se que a tendência ao máximo situou-se em pHs ácidos, sendo que esse efeito não foi tão marcante quando comparado às outras variáveis, o que é demonstrado nas pequenas variações apresentadas nas respostas obtidas.

Por outro lado verificou-se que o teor de proteínas e porcentagem de solubilização protéica frente às interações das variáveis estudadas é semelhante, isto se justifica porque são respostas dependentes.

Utilizou-se então os valores de pH inferiores a 5,0 combinados com temperaturas entre 40,0 e 50,0°C para definição do desenho experimental do ensaio II.

A Figura 1, mostra o efeito das variáveis temperatura e concentração de cloreto de sódio sobre a resposta teor de proteínas solúveis (α), no extrato líquido da suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, nas seguintes condições: a) pH=7,0, b) pH=5,0 e c) pH=3,0 em 24 horas de autólise.

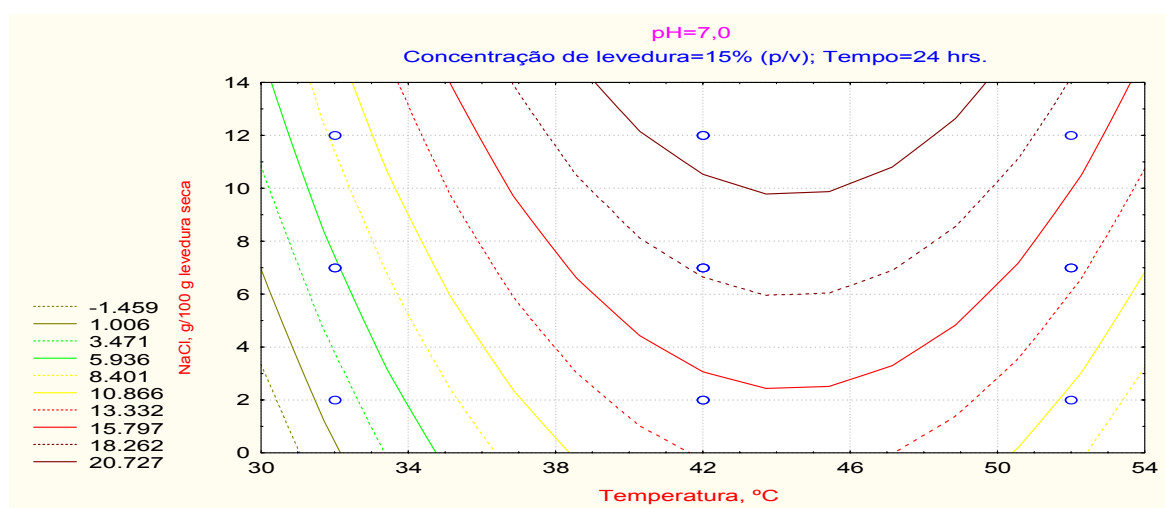


Figura 1(a). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta teor de proteínas solúveis no extrato líquido autolisado (α) em pH 7,0 em 24 horas de autólise

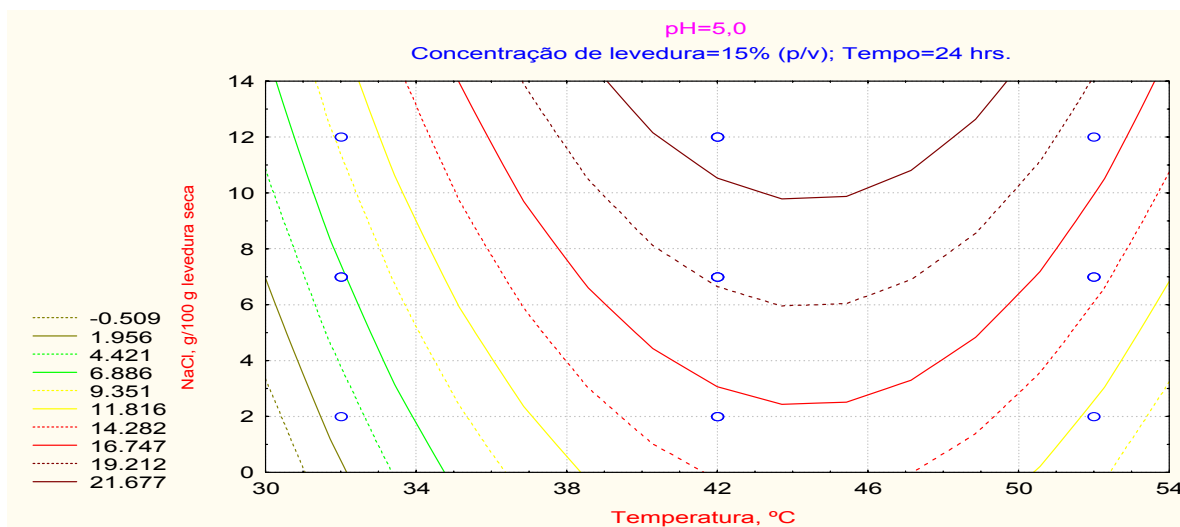


Figura 1(b). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre o teor de proteínas solúveis no extrato líquido (α) em pH 5,0 em 24 horas de autólise

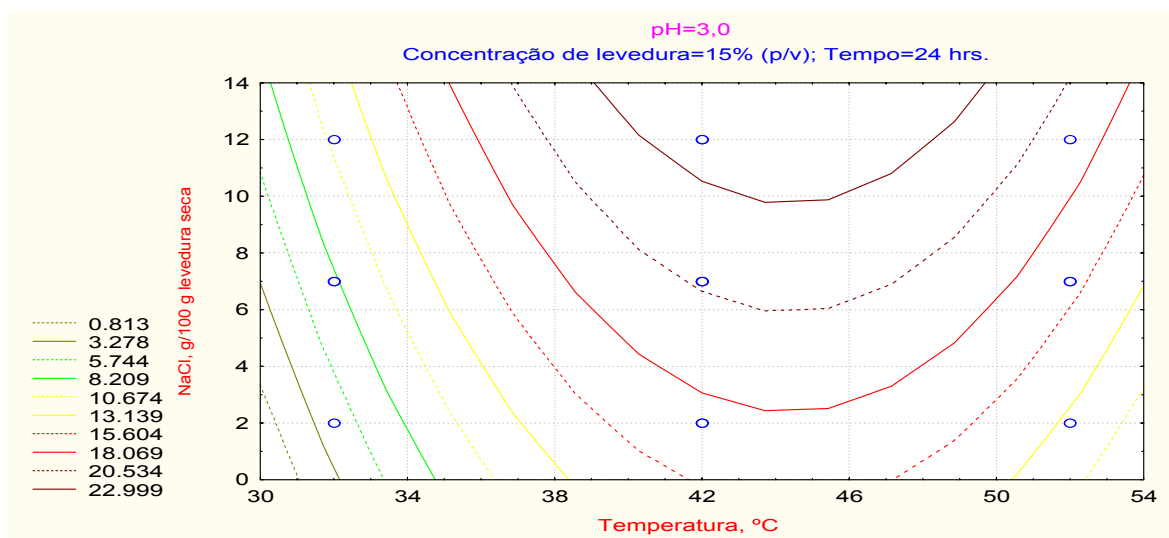


Figura 1(c). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta teor de proteínas solúveis no extrato líquido (α) em pH 3,0 em 24 horas de autólise.

Observação: As legendas numéricas representadas ao lado de cada figura indica as áreas (respostas) máximas e mínimas para cada condição representada no gráfico.

A figura 2, mostra o efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta porcentagem de solubilização protéica no

extrato líquido (γ) em: a) pH=7,0, b) pH=5,0 e c) pH=3,0 em 24 horas de autólise.

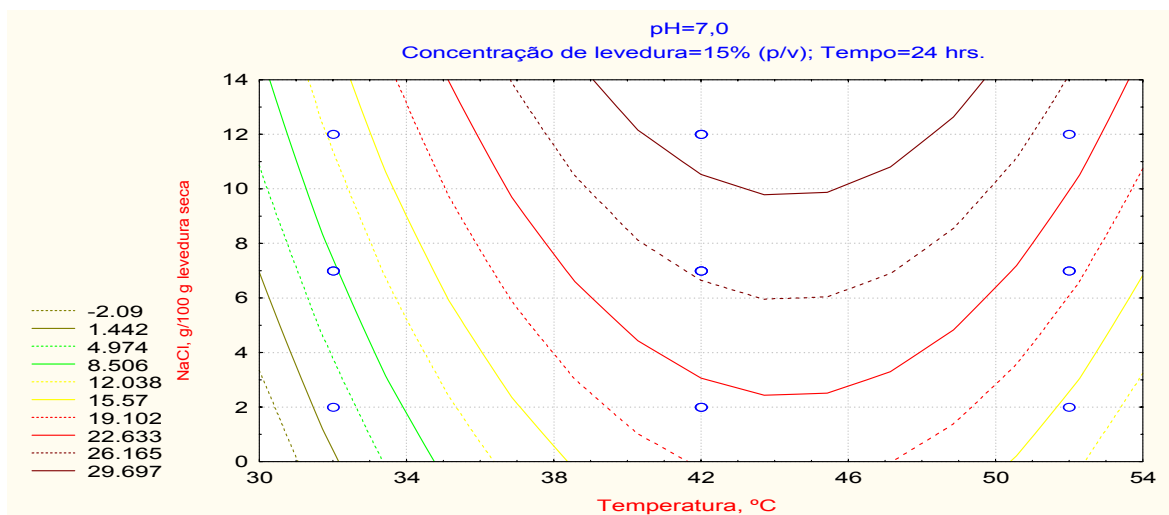


Figura 2(a). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta percentagem de solubilização protéica no extrato líquido autolisado (γ), em pH 7,0 em 24 horas de autólise.

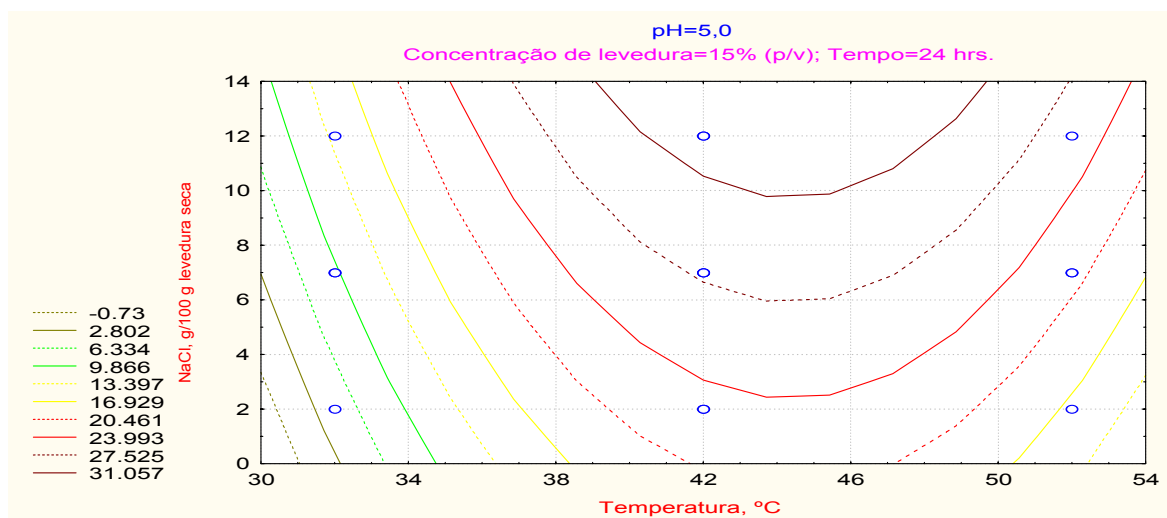


Figura 2(b). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta percentagem de solubilização protéica no extrato líquido autolisado (γ), em pH 5,0 em 24 horas de autólise

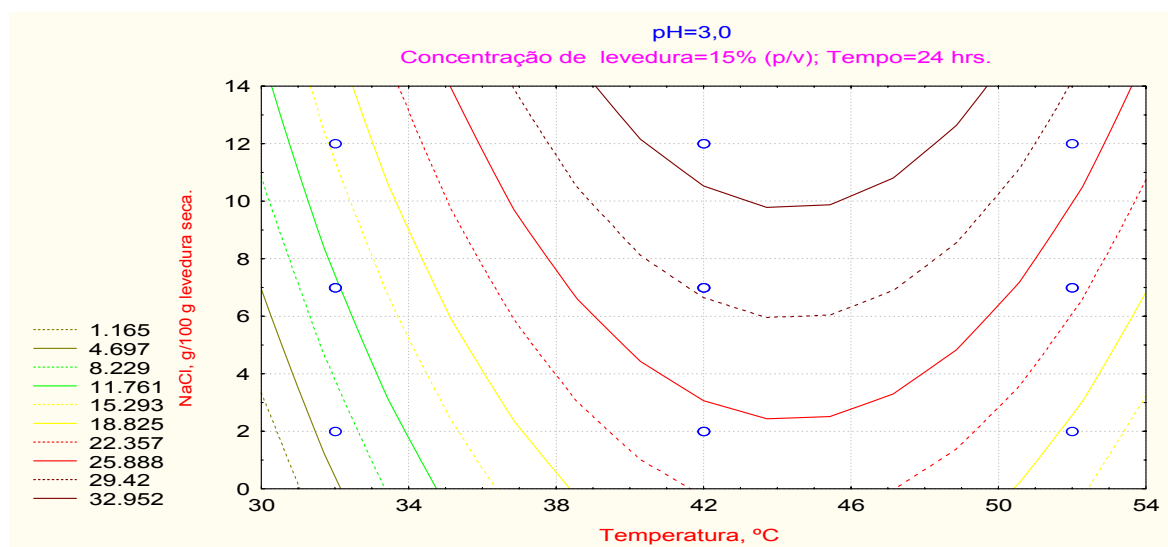


Figura 2(c). Efeito das variáveis temperatura e concentração de NaCl sobre a resposta porcentagem de solubilização protéica no extrato autolisado (γ), em pH 3,0 em 24 horas de autólise

Observação: As legendas numéricas representadas ao lado de cada figura indica as áreas (respostas) máximas e mínimas para cada condição representada no gráfico.

Ensaio (II)

As respostas do teor de proteína solúvel (α) e porcentagem de solubilização (γ) no sobrenadante obtidos por meio do delineamento fatorial fracionado 3⁽³⁻¹⁾ da Metodologia de Superfície de Resposta, com 3 variáveis independentes, em 3 níveis equidistantes, estão descritos na Tabela 6.

A análise de variância dos dados experimentais para ambas as respostas, apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 0,92825. Por outro lado, a única variável independente que afetou significativamente as respostas foi o efeito linear da temperatura ($p=0,0469$), sendo que as demais variáveis não apresentaram efeitos significativos nas condições experimentais estudadas.

Tabela 6. Teores de proteínas solúveis (α) e porcentagem de solubilização protéica (γ) no sobrenadante da suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (ensaio II/48 horas de extração).

Experimento	T (°C)	% NaCl	pH	mg/mL de proteína solúvel (α)	% solubilização (γ)
01	50,00	8,00	4,50	69,96	51,94
02	50,00	12,00	5,50	51,15	37,98
03	50,00	10,00	6,50	54,69	40,60
04	52,00	12,00	4,50	55,35	41,09
05	52,00	10,00	5,50	40,03	29,72
06	52,00	8,00	6,50	31,01	23,02
07	54,00	10,00	4,50	31,19	23,16
08	54,00	8,00	5,50	22,87	16,98
09	54,00	12,00	6,50	31,36	23,28

As Figuras 3 (a, b e c), ilustram o efeito das interações entre as variáveis independentes sobre o teor de proteínas solubilizadas em 48 horas. Para uma concentração salina definida em 8,0% observou-se que o teor de proteínas solubilizadas atingiu valores máximos quando a temperatura variou de 50,0 a 51,2°C e o pH de 4,0 a 4,4. No caso da utilização de 10,0% de NaCl, as variáveis pH e temperatura

tornaram-se mais restritas, o pH situou-se entre 4,0 e 4,2 e a temperatura entre 50,0 a 50,7°C. Para a concentração salina de 12,0%, os resultados indicaram as mesmas condições de pH e temperatura em relação à concentração de 8,0% de sal, entretanto, notou-se um sensível incremento na porcentagem de proteínas solubilizadas com o aumento de 10,0 para 12,0% de NaCl.

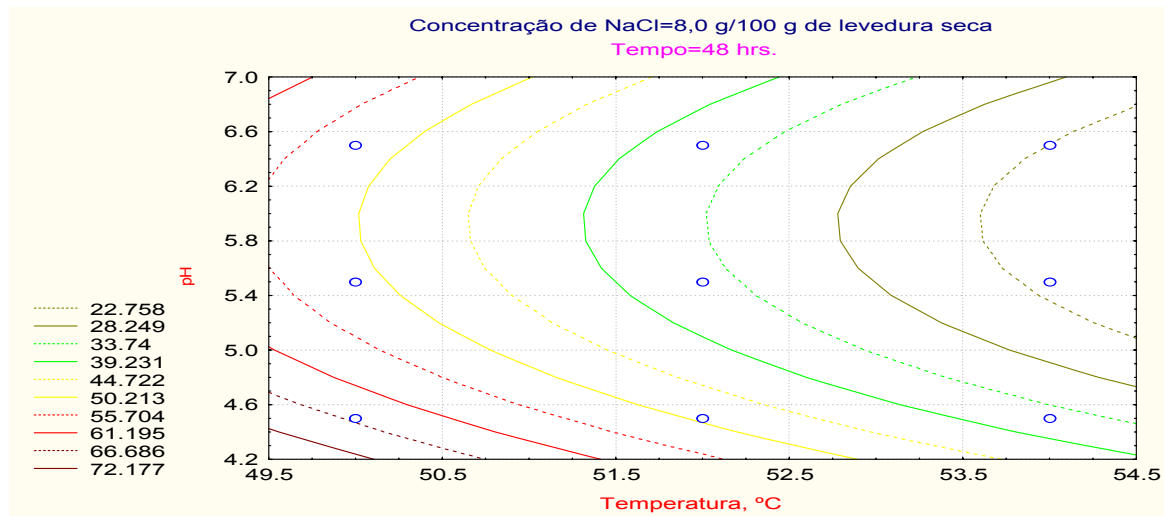


Figura 3(a). Efeito da temperatura e pH sobre o teor de proteínas solúveis (α), no extrato líquido com 8,0% de NaCl em 48 horas de autólise.

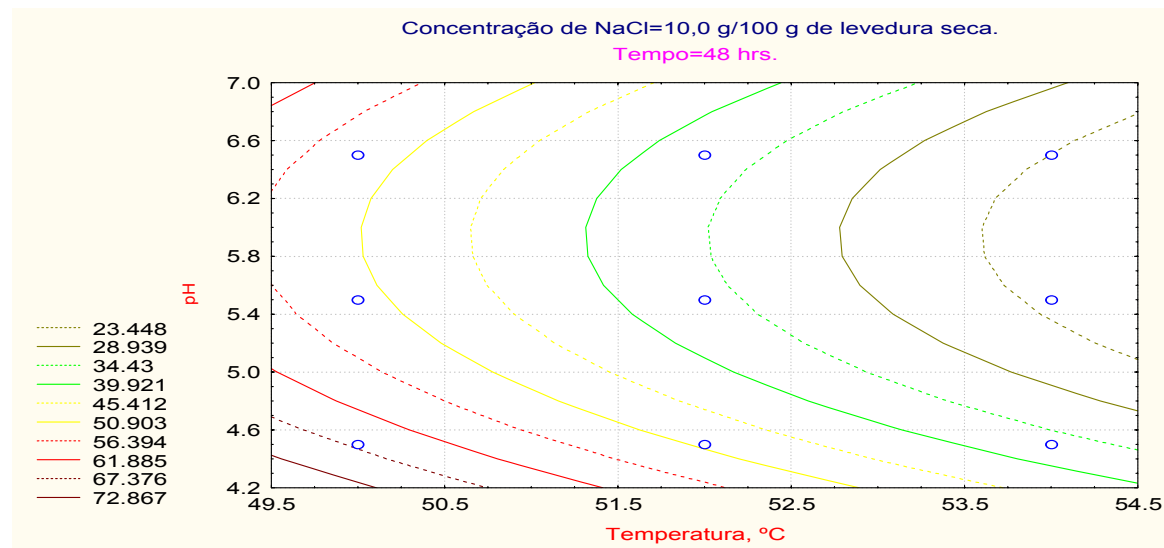


Figura 3(b). Efeito da temperatura e pH sobre o teor de proteínas solúveis (α), no extrato líquido com 10,0% de NaCl em 48 horas de autólise

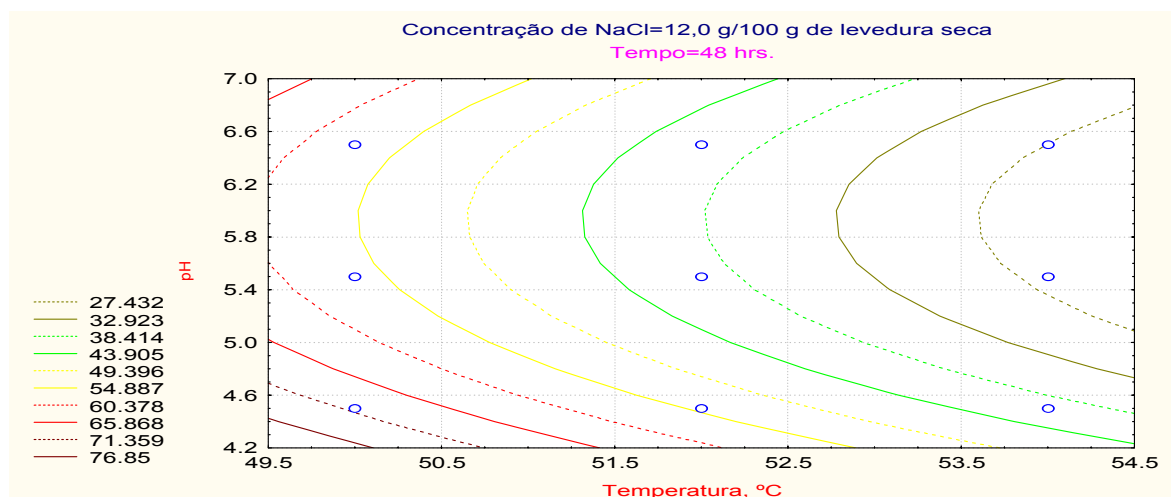


Figura 3(c). Efeito da temperatura e pH sobre o teor de proteínas solúveis (α), no extrato líquido com 12,0% de NaCl em 48 horas de autólise.

Observação: As legendas numéricas representadas ao lado de cada figura indica as áreas (respostas) máximas e mínimas para cada condição representada no gráfico.

Ensaio (III)

O teor de proteína solúvel (α) e porcentagem de solubilização protéica (γ) obtidos por meio do delineamento fatorial incompleto (3^3) da análise de superfície de resposta estão apresentados na Tabela 7.

A análise de variância dos dados experimentais para a resposta teor de proteínas solúveis, apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99538 e um

desvio da regressão (“Lack of Fit”) significativo de 0,04117, mas com um erro experimental de 0,9330. Por outro lado, a resposta porcentagem de solubilização protéica apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99107 e um desvio da regressão (“Lack of Fit”) não significativo de 0,910557, indicando que em ambos os casos o modelo matemático elaborado a partir dos dados experimentais foi adequado.

Tabela 7. Teores de proteínas solúveis (α) e porcentagem de solubilização protéica (γ) no sobrenadante da suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (ensaio III/48 horas de extração)

Experimento	% NaCl (peso/volume)	pH	T (°C)	mg/mL de proteína solúvel (α)	% solubilização (γ)
01	45,00	4,50	49,00	7,65	5,10
02	75,00	4,50	49,00	8,80	5,90
03	45,00	5,10	49,00	8,13	5,40
04	75,00	5,10	49,00	7,87	5,20
05	45,00	4,80	48,00	72,30	48,20
06	75,00	4,80	48,00	71,03	47,35
07	45,00	4,80	50,00	50,96	33,97
08	75,00	4,80	50,00	66,18	44,12
09	60,00	4,50	48,00	72,23	48,15
10	60,00	5,10	48,00	83,60	55,77
11	60,00	4,50	50,00	74,76	49,84
12	60,00	5,10	50,00	71,63	47,75
13	60,00	4,80	49,00	9,49	6,33
14	60,00	4,80	49,00	11,42	7,61
15	60,00	4,80	49,00	10,39	6,93

Tabela 8. Significância das variáveis independentes no processo de extração das proteínas intracelulares da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ensaio III/48 horas de extração)

Efeito	Variáveis	Respostas do sistema	
		Proteína solúvel	Potencial de solubilização
Linear	X ₁	0,005806*	0,105573
	X ₂	0,032249*	0,292893
	X ₃	0,102752	0,167950
Quadrático	X ₁ X ₁	0,000068*	0,678366
	X ₂ X ₂	0,006136*	0,004479*
	X ₃ X ₃	0,014938*	0,018720*
Interação	X ₁ X ₂	0,013443*	1,000000
	X ₁ X ₃	0,017146*	1,000000
	X ₂ X ₃	0,541307	1,000000

(*) Significativo ao nível de 5% ($p \leq 0,05$). Onde: X₁=T°C; X₂= NaCl; X₃= pH.

Verificou-se na Tabela que os efeitos lineares da temperatura e concentração de NaCl, afetaram significativamente o teor de proteínas solúveis, não ocorrendo o mesmo com o pH. O efeito quadrático destas variáveis foram todos significativos, bem como as interações da temperatura com o pH e NaCl. O mesmo não acontecendo entre estas duas últimas. Observou-se também que a resposta porcentagem de solubilização protéica foi afetada significativa e exclusivamente pelos efeitos quadráticos da concentração de NaCl e pH.

Na temperatura 49,0°C, a resposta máxima se define para 60,0% de NaCl em pH de aproximadamente 4,6 ou 5,0. Por outro lado, observa-se que a mudança de pH na concentração de NaCl mencionada, não provoca uma diminuição significativa no teor de proteínas no sobrenadante.

A Figura 4 mostra a superfície de resposta para a porcentagem de solubilização protéica quando a concentração de NaCl é 60,0 g/100,0 g de levedura seca, para pH situado entre 4,6 e 5,0 indicando que os valores são muito próximos quando confrontados com a condição determinada para a resposta teor de proteínas solúveis.

No ensaio III, cabe salientar que devido às altas concentrações de NaCl, a extração de proteínas pode

ter ocorrido principalmente pelo processo de plasmólise, circunstância esta que o diferencia dos ensaios anteriores onde seguramente ocorreu autólise ou associação entre ambos os processos, já que foram empregadas concentrações salinas 5 a 8 vezes menores.

Considerando os ensaios, fica claro que a temperatura mais adequada e que melhor se ajusta para a obtenção das respostas máximas quanto à porcentagem de solubilização das proteínas intracelulares de leveduras encontra-se aproximadamente entre 49,0 e 51,0°C. Os melhores níveis para pH também mostraram-se coerentes com as condições definidas nos ensaios anteriores. Da mesma forma para a concentração de NaCl, que situou-se entre 10,0 e 12,0 g /100,0 gramas de levedura em base seca, entretanto, os valores de proteínas não solubilizadas em 48 horas ainda são altos.

Para verificar a possibilidade de melhoria nas respostas, assim como a determinação do tempo mínimo para máxima extração protéica, tanto para o processo de autólise quanto para plasmólise, que aparentemente se apresentaram numa condição semelhante de pH e temperatura, seria interessante a realização de um ensaio cinético, em concentrações de NaCl tais que possibilitem avaliar simultaneamente ambos os casos.

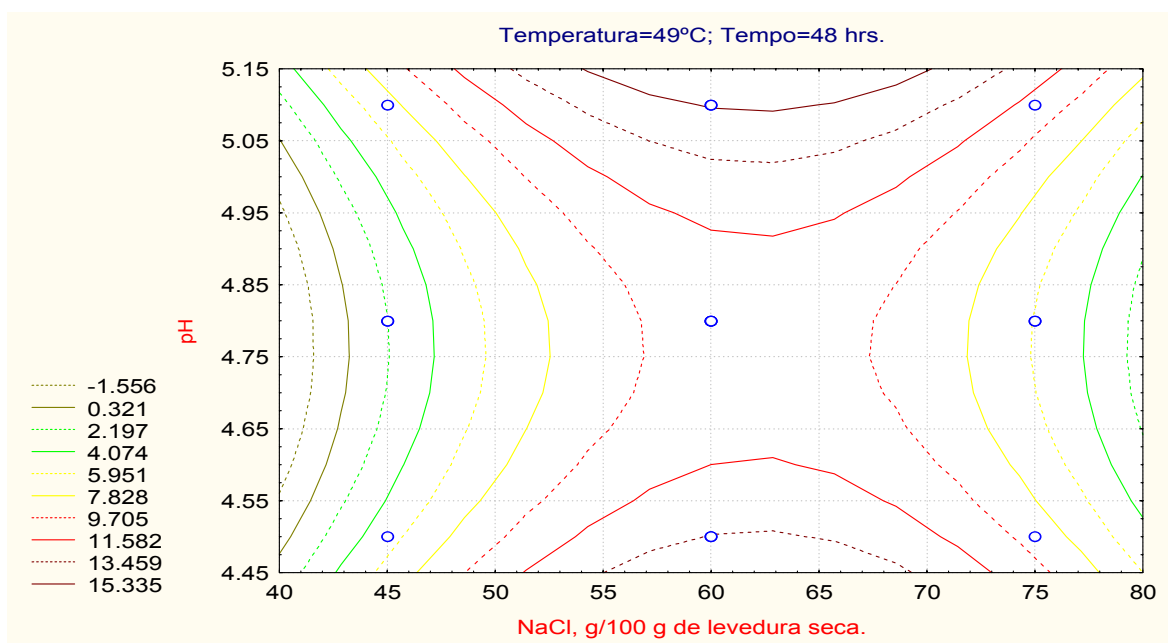


Figura 4(a). Efeito da concentração de NaCl e pH sobre o teor de proteínas solúveis (α), no extrato líquido à temperatura de 49,0°C por 48 horas

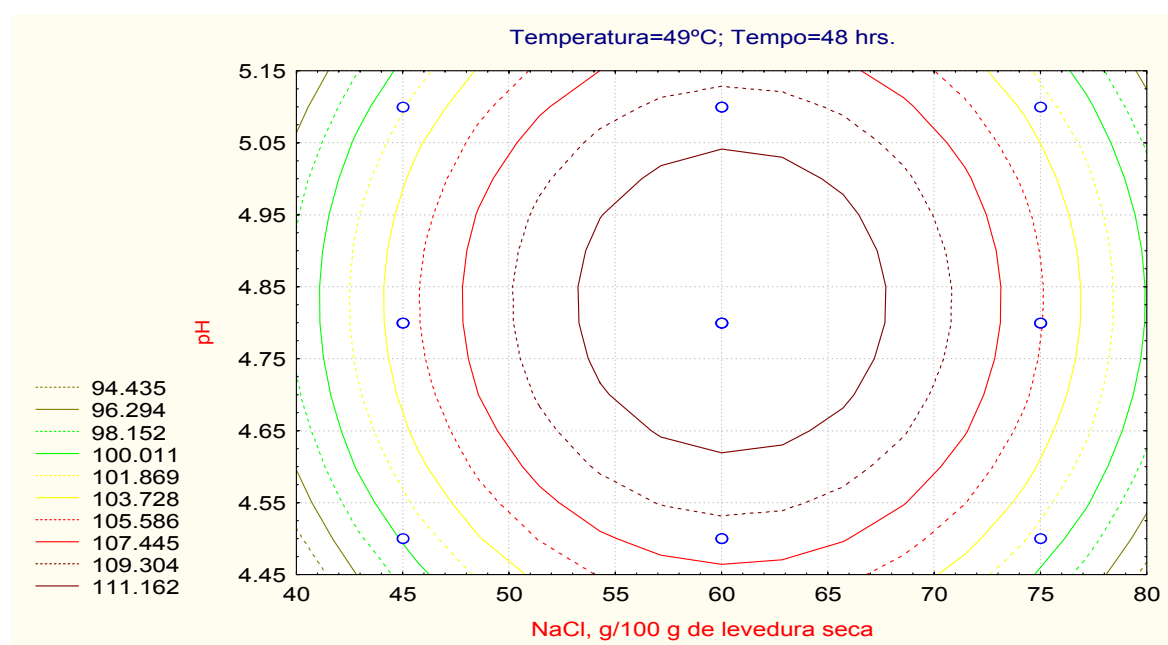


Figura 4(b). Efeito da concentração de NaCl e pH sobre a porcentagem de solubilização protéica (γ) no extrato líquido à temperatura de 49,0°C por 48 horas.

Observação: As legendas numéricas representadas ao lado de cada figura indica as áreas (respostas) máximas e mínimas para cada condição representada na Figura.

Conclusão

Pelas condições estudadas neste trabalho, as melhores condições determinadas para a extração de proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram concentrações de 10,0 a 12,0 gramas de NaCl/100,0 gramas de levedura em base seca, em temperatura entre 49,0 e 51,0°C e pH compreendido na faixa de 3,8 a 5,0. Por outro lado altas concentrações de NaCl não se mostraram eficientes para a solubilização protéica, portanto o processo de autólise foi o mais eficiente, mesmo quando comparado à plasmólise.

Agradecimentos

Ao professor orientador Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez.

À CAPES pela concessão da bolsa

Referências

- ASSIS, E. M. Componentes da parede celular de leveduras: proteínas e polissacarídeos de interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. *Resumos...* Campinas: Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, 1996. p.41-43,
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS(AOAC). *Official Methods of Analysis*. 15thed. Arlinton, 1990.
- BONNEU, M. Direct detection of yeast mutants with reduced viability on plates by erytrosine B staining. *Analytical Biochemistry*, New York, v.193, n.2, p.225-230, 1991.
- BOX, G.E.P.; BENKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics: A Journal of Washington*, Washington, v.2, n.4, p.455-475, 1960.
- FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. Autolysis of yeast in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, n.33, p.6-13, 1982.
- JIMENEZ, R.; BADIA, M.; DIAZ, C. Quick procedure for the production of yeast autolysate for a wide range of uses. *Alimentaria*, Madrid, v.30, n.245, p.87-89, 1993.
- KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In: KNORR, D. *Food biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1987. Cap. 14: p.363-391.
- LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, J. J; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. *Yeast technology*. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- RÉVILLION, J.P.; PIBERNAT, C. C. Utilização de extratos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinhos espumantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.16, n.3, p.196-205, 1996.
- SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, D.S.E.; BALDINI, S. L.V.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas, v.2, n.1, p.119-125, 1999.
- SUGIMOTO, H.; YOKOTSUKA, T.; TAKEUCHI, H. U.S. Patent. Process for autolysis of yeast. Int. Cl.² A23/L 1/28; C12C 11/34, 1973.