

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

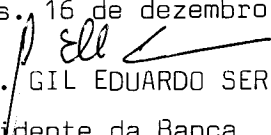
**Polissacarídeos da parede celular de levedura de
cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento
mecânico da célula e de processo industrial de autólise**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ELAINE MEIRE DE ASSIS e aprovada pela Comissão Julgadora em 16.12.96.

Elaine Meire de Assis

Campinas, 16 de dezembro de 1996

Prof. Dr.  GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

Dor: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.**

Campinas, 1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

As77p

Assis, Elaine Meire de

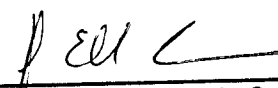
Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria
(*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da
célula e de processo industrial de autólise / Elaine Meire de Assis.
– Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Gil Eduardo Serra

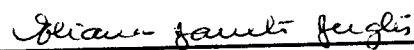
Tese (doutorado) -. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leveduras. 2. Parede celular 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Polissacarídeos. 5. Glucana. 6. Manana. 7. Glicoproteína.
I. Serra, Gil Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

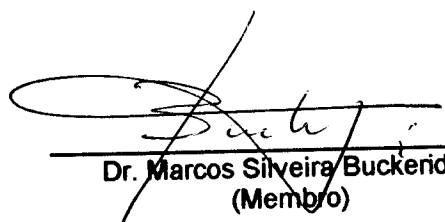
BANCA EXAMINADORA



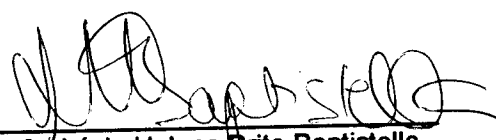
Prof. Dr Gil Eduardo Serra
(Orientador)



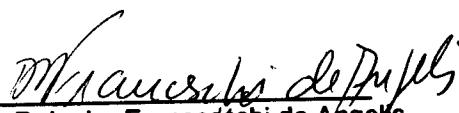
Profa. Dra. Eliana Barreto-Bergter
(Membro)



Dr. Marcos Silveira Buckeridge
(Membro)



Profa. Lúcia Helena Brito Baptistella
(Membro)



Profa. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis
(Membro)

Prof Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri
(Membro)

Prof Dr. Francisco César Ciacco
(Membro)

Dedico

*Aos meus pais, Durval e Tereza com muito carinho
pelo exemplo de força e coragem.*

*Às minhas filhas, Marcela, Fernanda e Jéssica
por tornarem minha vida mais valiosa.*

*À meu grande amor, Eduardo
com muito carinho, por fazer parte deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, pela orientação competente e dedicada, apoio e pela amizade em todos esses anos de convivência. A minha gratidão.

À PRODESA, na pessoa do Dr. Juan Carlos Cruz Sanchez, pela cessão da levedura e parede celular residual, além do apoio financeiro.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) pelo empréstimo dos laboratórios e equipamentos e à todos seus funcionários e colegas, especialmente ao Aparecido Moreira, pela atenção e amizade.

Ao Instituto de Microbiologia da UFRJ, na pessoa da Prof^a Dr^a Eliana Barreto Bergter, pelo treinamento nas técnicas de extração de polissacarídeos e pelo empréstimo das instalações e equipamentos. À funcionária Maria de Fátima Soares e aos colegas Cleide, Márcia Brito, Márcia Pinto, Maria Helena, Rosa, Marcelo, Eduardo, Rosana e André, pelo carinho e amizade.

À Prof. Dr^a Lúcia Helena Brito Baptistella, do Instituto de Química da UNICAMP, pelas análises de RMN ^{13}C , pelo empenho e atenção frente a todas solicitações.

Ao Prof. Dr. Phillip J. Gorin, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelas análises de CG-EM e pelas valiosas sugestões.

Ao Laboratório de Química de Proteínas de Ribeirão Preto da USP, pelas análises de aminoácidos.

Ao laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, na pessoa do então coordenador Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri, pelo empréstimo das instalações e equipamentos, e às funcionárias Liana Dwood, Soeli Reis e Esmeralda pelo apoio técnico.

Aos professores, especialmente à Prof^a Hilary, funcionários da FEA, às amigas Maria Tereza Bertholdo Pacheco, Glenys Mabel C. Córdoba, Eliana Pinheiro de Carvalho e colegas de curso que direta ou indiretamente prestaram colaboração.

Aos pesquisadores do CPQBA, Ms. Edilberto Princi Portugal, ao químico Adilson Sartoratto, Dr^a Mary Ann Foglio, Dr^a Vera Rehdler e Ms. Alexandre Ponezzi, pela valiosa colaboração neste trabalho.

À pesquisadora do CPQBA Dr^a Carmen Lúcia Queiroga, pelo grande apoio técnico e especialmente pela amizade.

Ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Enfermagem e Nutrição da UFG, nas pessoas das Professoras Márcia Armentano Clark Reis e Maria Margareth Veloso Naves, pelo apoio e incentivo.

Às colegas do Departamento de Nutrição da UFG, Professoras Mara Reis Silva, Dulce T. Oliveira Cunha, Fátima Gil, Maria Altina, Adriane Teles, Gersisley Salado, Maria Sebastiana Silva, Márcia Sacchi, Maria José C. Bueno, Neila Martins e Vanessa Sateles, e a todos que incentivaram este trabalho.

À Cleide Florentino da Silva, pela valiosa colaboração, apoio e incentivo e acima de tudo pela amizade sincera.

Aos grandes amigos e compadres, Francisco Hermes da Silva e Maria de Fátima Vilhena da Silva e aos seus filhos Elaine, Marlon, Aline e Márcio pelo grande apoio nos momentos mais difíceis, pela amizade sincera e pelo imenso carinho que me brindaram em seu lar, o que tornou mais agradável esses momentos. A minha gratidão.

Aos meus pais, Durval e Tereza, aos meus irmãos, Ismar e Idaildes, à Patrícia, às minhas filhas Marcela, Fernanda e Jéssica, aos meus sogros Anita e Ernesto, e pelo apoio e amor que me dedicam.

Ao meu marido Eduardo, pelo grande amor, carinho, compreensão e cumplicidade.

Aos Professores Membros desta banca examinadora, pelas valiosas sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro recebido.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR.....	4
2.1.1. Métodos Físicos.....	5
2.1.2. Métodos Químicos.....	9
2.1.3. Métodos Enzimáticos.....	11
2.2. COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE <i>S. cerevisiae</i>	12
2.2.1. Glucanas.....	18
2.2.1.1. Glucana álcali insolúvel.....	19
2.2.1.2. Glucana ácido solúvel.....	21
2.2.1.3. Glucana álcali solúvel.....	22
2.2.2. Mananas.....	23
2.3. APLICAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE DA LEVEDURA.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. MATÉRIA-PRIMA.....	28
3.2. TRATAMENTO DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DA PAREDE CELULAR BRUTA.....	29
3.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ROMPIMENTO MECÂNICO DA PAREDE CELULAR DA LEVEDURA.....	29
3.4. EXTRAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA DA PAREDE CELULAR BRUTA.....	31
3.4.1. Purificação da glicoproteína bruta com cetavlon.....	33
3.5. EXTRAÇÃO DA MANANA, GLUCANA ÁLCALI SOLÚVEL, GLUCANA INSOLÚVEL E GLUCANA ÁCIDO SOLÚVEL.....	37
3.5.1. Extração dos polissacarídeos álcali solúveis.....	37
3.5.2. Extração dos polissacarídeos álcali insolúveis.....	38
3.6. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS FRAÇÕES.....	38

3.7. MÉTODOS ANALÍTICOS DE CARACTERIZAÇÃO GERAL.....	41
3.7.3. Lipídios totais.....	41
3.7.4. Ácidos nucleicos.....	41
3.7.5. Carboidratos totais.....	41
3.7.6. Nitrogênio total e proteína.....	42
3.7.7. Fosfatos.....	42
3.7.8. Hexosaminas.....	42
3.8. CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES DA PAREDE CELULAR.....	43
3.8.1. Cromatografia em papel e líquido-gás dos monossacarídeos.....	43
3.8.2. Espectrometria de infravermelho.....	44
3.8.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono.....	44
3.8.4. Aminoácidos.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA LEVEDURA DE CERVEJARIA (<i>S. cerevisiae</i>).....	47
4.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ROMPIMENTO MECÂNICO DA PAREDE CELULAR DA LEVEDURA.....	47
4.3. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.....	51
4.4. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR.....	53
4.5. CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR.....	63
4.5.1. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas.....	63
4.5.2. Espectrometria de infravermelho.....	73
4.5.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹³ C.....	76
4.6. VERIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE <i>S. cerevisiae</i>	78
4.6.1. Parede Bruta (PRB e PBI).....	78
4.6.2. Glicoproteína (GPR e GPI).....	80
4.6.3. Glicoproteína - Fração A (GPR-A e GPI-A).....	85
4.6.4. Glicoproteína - Fração B - (GPR-B e GPI-B).....	87
4.6.5. Mananas (MNR e MNI).....	89
4.6.6. Glucana álcali solúvel (GALR e GALI)	91
4.6.7. Glucana insolúvel (GIR e GII)	94
4.6.8. Glucana ácido solúvel (GACR e GACI).....	98
5. CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema da obtenção de parede celular através do rompimento mecânico da parede celular da levedura de cerveja em moinho <i>Dyno-Mill</i>	31
Figura 2. Esquema do isolamento e fracionamento de glicoproteína, glucana insolúvel bruta e manana bruta da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> (Barreto-Bergter <i>et al.</i> , 1981).....	32
Figura 3a. Esquema de fracionamento da glicoproteína com Cetavlon (Lloyd, 1970).....	35
Figura 3b. Esquema de fracionamento da glicoproteína com Cetavlon (Loyd, 1970).....	36
Figura 4. Esquema de purificação de polissacarídeos álcali solúveis (Barreto-Bergter <i>et al.</i> , 1981).....	39
Figura 5. Esquema da purificação dos polissacarídeos álcali insolúveis (Manners <i>et al.</i> , 1973a).....	40
Figura 6(a) - Cromatograma da mistura de padrões alditóis acetatos dos monossacarídeos: eritrose, fucose, ribose, xilose, manose, galactose e glucose.....	63
Figura 6(b) - Espectros de massas dos padrões eritritol, fucitol, ribitol e xilitol.....	64
Figura 6(c) - Espectros de massas dos padrões manitol, galactitol e glucitol.....	65
Figura 7(a) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos: ribose, manose e glicose, das frações PBR, PBI, GPR e GPI, da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	67
Figura 7(b) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos ribose, manose e glicose, das subfrações GPR-A, GPI-A, GPR-B e GPI-B da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	68
Figura 7(c) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos ribose, manose e glicose, das subfrações GPR-C, GPI-C, GPR-D e GPI-D da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	69
Figura 7(d) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos ribose, manose e glicose, das frações, MNR, MNI, GALR e GALI da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	70
Figura 7(e) - Cromatogramas das frações GIR, GII, GACR e GACI da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	71
Figura 8. Espectro de Infravermelho da fração A da glicoproteína (GPR-A) isolada da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	74
Figura 9. Espectro de Infravermelho da manana (MNR) isolada da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	75
Figura 10. Espectro de RMN ¹³ C da parede celular celular bruta (PBI) de <i>S. cerevisiae</i> , DMSO-d ₆ 70°C.....	79

	Pág
Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C e estrutura proposta da glicoproteína (GPR) da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C , sinal em 96 ppm relativo ao solvente CCl_4) e (b) DEPT CH_2 (sinal negativo); CH e CH_3 (sinal positivo).....	82
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C e estrutura da manana da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C (GORIN, 1981).....	83
Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C da manana da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C (amostra padrão fornecida pelo Prof. Dr. P.A.J. Gorin).....	84
Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C da fração A da glicoproteína (GPR-A) isoladas de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C	86
Figura 15. Estrutura da guanosina e citidina (KALINOWSKY <i>et al.</i> , 1984).....	86
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C e estrutura proposta da fração B da glicoproteína (GPR-B) isoladas de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C	88
Figura 17. (a) Espectro de RMN ^{13}C e estrutura proposta da manana (MNR) da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C e (b) DEPT CH_2 (sinal negativo); CH e CH_3 (sinal positivo).....	90
Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C da glucana álcali solúvel (GALI) isolada da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C	93
Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C e estrutura proposta da glucana insolúvel (GII), (sinal largo em 39,7 ppm corresponde ao solvente da amostra, DMSO-d_6 , 70°C).....	96
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C da glucana de <i>S. cerevisiae</i> (Kogan, 1988), DMSO-d_6 , 28°C	97
Figura 21. (a) Espectro de RMN ^{13}C da glucana ácido solúvel (GACR) isolada da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> , D_2O , 70°C (b) DEPT CH_2 (sinal negativo); CH e CH_3 (sinal positivo).....	99

ABREVIATURAS

CG-EM	-	Cromatografia líquido-gás acoplada a espectrometria de massas
DEPT	-	Distortionless Enhancement by Polimerization Transfer.
ERIT	-	Eritrose
FUC	-	Fucose
GACI	-	Glucana ácido solúvel da parede do processo industrial de autólise
GACR	-	Glucana ácido solúvel da parede obtida por rompimento mecânico
GALAC	-	Galactose
GALI	-	Glucana álcali solúvel da parede do processo industrial de autólise
GALR	-	Glucana álcali solúvel da parede obtida por rompimento mecânico
GII	-	Glucana insolúvel da parede do processo industrial de autólise
GIR	-	Glucana insolúvel da parede obtida por rompimento mecânico
GLC	-	Glucose
Glc _p	-	Glucopirranose
GPI	-	Glicoproteína bruta da parede do processo industrial de autólise
GPI-A	-	Glicoproteína da parede do processo industrial de autólise-Fração A
GPI-B	-	Glicoproteína da parede do processo industrial de autólise-Fração B
GPI-C	-	Glicoproteína da parede do processo industrial de autólise-Fração C
GPI-D	-	Glicoproteína da parede do processo industrial de autólise-Fração D
GPR	-	Glicoproteína bruta da parede obtida por rompimento mecânico
GPR-A	-	Glicoproteína da parede obtida por rompimento mecânico-Fração A
GPR-B	-	Glicoproteína da parede obtida por rompimento mecânico-Fração B
GPR-C	-	Glicoproteína da parede obtida por rompimento mecânico-Fração C
GPR-D	-	Glicoproteína da parede obtida por rompimento mecânico-Fração D
MAN	-	Manose
Man _p	-	Manopirranose
PBI	-	Parede celular bruta do processo industrial de autólise
PBR	-	Parede celular bruta da obtida por rompimento mecânico
RIB	-	Ribose
RMN ¹³ C	-	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
XIL	-	Xilose

RESUMO

A parede celular de levedura de fermentação industrial de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) é composta basicamente de polissacarídeos, representando um material que pode ter utilização industrial e importante valor econômico. Embora exista um considerável conhecimento da estrutura dos polissacarídeos componentes da parede celular de *S. cerevisiae*, neste trabalho foram estudadas duas fontes comerciais representadas por: a) células residuais de levedura de fermentação industrial de cerveja; b) parede celular residual de produção de extrato de levedura, com autólise das células referidas no item a. O processo de rompimento das células intactas de leveduras foi realizado em um moinho de esferas de vidro em escala piloto (*Dyno-Mill*) e otimizado, permitindo atingir aproximadamente 95% de rompimento. O fracionamento delineado permite uma separação sequencial de frações a partir das paredes brutas, e, praticamente, isolar frações purificadas e homogêneas e assim determinar o polissacarídeo componente de cada uma e indiretamente sua ocorrência nas frações de origem. Cada fração foi quantificada, caracterizada quimicamente e o polissacarídeo teve sua estrutura identificada. Para a verificação da estrutura as amostras foram submetidas às análises por CG-EM, RMN¹³C e espectrometria de infravermelho (IR). A parede celular obtida por rompimento mecânico apresentou um rendimento de 30% do peso total da célula em base seca. As frações de polissacarídeos isoladas da parede celular obtida por rompimento e parede celular industrial residual apresentaram, respectivamente, um rendimento em peso seco em relação à parede celular de: 16,7 e 11,2% de glicoproteína; 7,1 e 7,8% de manana; 0,8 e 1,0% de glucana álcali solúvel; 59,2 e 63,8% de glucana insolúvel, e 1,8 e 2,2% de glucana ácido solúvel, respectivamente. Quanto à glicoproteína, quatro subfrações foram isoladas, com 1,3 e 2,7% (fração A), 56,3 e 44,2% (fração B), 10,5 e 12,0% (fração C) e, 10,6 e 12,7% (fração D). As três principais frações de polissacarídeos da parede celular, quantitativamente, foram a glicoproteína, a manana e a glucana insolúvel. As duas primeiras tiveram seu

polissacarídeo confirmado como α -D-(1 $\rightarrow$ 6) manopirana 2-O-substituída, com ramificações α -D-(1 $\rightarrow$ 2) manopiranosídicas e uma unidade terminal não redutora α -D-(1 $\rightarrow$ 3) manopiranosídica; a glucana insolúvel foi confirmada como β -D-(1 $\rightarrow$ 3) glucopirana. Das subfrações isoladas a partir da glicoproteína através de fracionamento com Cetavlon, a fração mais abundante (Fração B) teve seu polissacarídeo identificado com estrutura idêntica à da fração de manana. O RNA presente na parede celular foi encontrado integralmente na fração A da glicoproteína, o que elimina tal composto das demais frações e subfrações. A parede celular constituída pelo subproduto industrial de autólise, mostrou características gerais similares à da parede separada por rompimento mecânico, ou seja, mesmo exposta a enzimas nativas e outras, durante a autólise, esta parede foi basicamente preservada, embora seja possível observar seu comportamento diferenciado quanto à solubilização e dispersão durante as etapas de fracionamento. o trabalho consolida num texto único, novas informações em adição a outras, já descritas de forma segmentada e em condições diversas.

SUMMARY

The cell wall of yeast (*S. cerevisiae*) from industrial beer fermentation is composed of polysaccharides which can be utilized in the food and others industries. Considerable information about the chemical structure of cell wall polysaccharides of *S. cerevisiae* is related in the literature and was obtained from laboratory cell cultures grown in synthetic media. The aim of this work was to establish a parallel between the fractionation routine, the yield of each fraction and their compositions, using two commercial sources of raw material: a) residual yeast cells from industrial beer fermentation; b) residual cell wall material from the production of yeast extract, with autolysis of the cells referred to in item a. The rupture of the yeast cells was carried out in a pilot glass ball mill (Dyno Mill); this operation was optimized and reached near 95% of cell disruption. The fractionation design for the sequential separation of the fractions obtained from the cell wall, allowed for the isolation of virtually homogeneous purified fractions and the polysaccharide component's of each one could then be determined and indirectly their occurrence in the original fractions. Each fraction was quantified, characterized chemically and identified structurally. The samples were subjected to GC-MS, ^{13}C NMR and IR spectroscopy in order to determine the structure. The cell wall obtained mechanical rupture showed a yield of 30% of the dry cell weight. The purified polysaccharide fractions of cell walls obtained from the mechanical rupture of cells and from the cell walls of industrial residues showed, respectively, the following yields in dry weight related to the cell wall: 16.7 and 11.2% of glycoprotein; 7.1 and 7.8% of mannan; 0.8 and 1.0% of alkali soluble glucan; 59.2 and 63.8% of insoluble glucan and 1.8 and 2.2% of acid soluble glucan. From the glycoprotein four subfractions were isolated with yields of: 1.3 and 2.7 %, fraction A; 56.3 and 44.2%, fraction B; 10.5 and 12.0 %, fraction C and 10.6 and 12.7 %, fraction D. The three quantitatively main fractions of cell wall polysaccharides were glycoprotein, mannan and insoluble glucan. The polysaccharide of the former two fractions was confirmed as 2-O-substituted α -D-

(1→6) mannopyranan with α -D-(1→2) mannopyranosidic branches and a non-reducing terminal unit of α -D-(1→3) mannopyranoside; the insoluble glucan being β -D-(1→3) glucopyranan. From the subfractionation of the glycoprotein using Cetavlon, the polysaccharide of the most abundant subfraction (B) showed a structure identical to that of the mannan fraction. The RNA present in the cell wall was almost totally found in subfraction A, practically eliminated this compound from the other fractions and subfractions. The cell wall byproduct from industrial autolysis, showed almost the same general characteristics when compared to that from mechanical rupture, i.e., even when exposed to native and others enzymes during autolysis, it was basically preserved, although a different behaviour with respect to solubilization and dispersion during the fractionation procedures was observed. This work consolidates in one publication some new information together with information already described but in a fragmented form and obtained under a variety of conditions.

1. INTRODUÇÃO

O processo de produção de cerveja com fermentação do mosto de cevada por *Saccharomyces cerevisiae*, gera grande volume residual de suspensão de levedura. Este subproduto tem sido comercializado a baixos preços, com fins de utilização como ração animal ou matéria prima para fabricação de autolisado protéico.

A produção de cerveja no Brasil é da ordem de 65 a 70 milhões de hectolitros anuais, e a produção de biomassa de levedura é estimada em 35.000 t de levedura seca por ano.

Em muitos países, há muitas décadas, as leveduras são reconhecidamente consideradas um produto de alto valor agregado, matéria prima para extração de proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácido ribonucleico (RNA) e diversas enzimas. No Brasil, recentemente, surgiram no mercado algumas poucas indústrias que utilizam a levedura de cervejaria para obtenção de extratos de levedura, por meio de autólise. Esse processo origina um resíduo, correspondente à parede celular da levedura, que tem mercado informal também restrito ao seu uso como ração animal.

A célula desenvolvida de levedura tem entre 8-14 μm de diâmetro e massa seca de $40 \times 10^{-12}\text{g}$, ou seja, 10^{12} células secas apresentam uma massa de 40 g. Vivas e prensadas essa quantidade de células pesa cerca de 200 g (HOUGH, 1990).

A parede celular de levedura de cervejaria representa cerca de 25-30% do peso seco total da célula, e consiste principalmente de polissacarídeos denominados genericamente *glucana de levedura*.

Na área de alimentos, muitos polissacarídeos de origem microbiana têm sido utilizados largamente como espessantes, devido às suas propriedades

de apresentar alta viscosidade em sistemas aquosos. Outra aplicação de grande interesse é a utilização como substituto de gorduras em certos tipos de alimentos dietéticos, tais como coberturas de saladas, sorvetes, etc., devido ao gosto semelhante à gordura, flavor agradável e aparência suave. O uso da glucana como emulsificante se destaca por ser de origem biológica, tendência crescente na preferência de consumo de produtos naturais. Outros bioemulsificantes geralmente apresentam altos custos de produção, pois exigem meios de cultura específicos, enquanto que a glucana de levedura pode ser obtida de um subproduto residual de fermentação de cerveja.

Na área farmacêutica tem sido ressaltada a ação positiva de algumas frações da parede celular sobre o sistema imunológico e apresentando atividade antitumoral.

Apesar das valiosas aplicações mencionadas anteriormente, a glucana de levedura não tem sido aproveitada no Brasil. Assim, surgiu o interesse no aproveitamento da suspensão residual de células de levedura de fermentação industrial de cerveja e da parede residual do processo de autólise industrial da levedura.

Na literatura, os trabalhos de fracionamento e caracterização estrutural dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae* referem-se a material obtido por rompimento mecânico ou enzimático, de células cultivadas em meios de cultura otimizados, em laboratório.

Na indústria de processamento de levedura para obtenção de extrato de levedura, o rompimento das células é feito por autólise, geralmente com uso de cloreto de sódio e, em alguns casos, também com a adição de enzimas.

Dentro deste contexto, representado de um lado pela oferta da matéria-prima e por outro por suas aplicações, este trabalho procurou reunir em um texto único as informações sobre polissacarídeos componentes da parede

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar de muitos produtos industriais de origem microbiana serem de produção extracelular, vários componentes celulares também são potencialmente muito interessantes. Uma vez que as leveduras são geralmente disponíveis em grandes quantidades, podem se tornar uma importante fonte para produtos de maior valor agregado (KNORR *et al.*, 1979). Vários produtos têm nas leveduras sua principal fonte de obtenção: biocatalisadores, metabólitos intermediários e componentes bioquímicos em geral para pesquisa analítica, bioquímica e aplicações clínicas. Dentre eles pode-se citar: desidrogenase alcoólica, hexoquinase, desidrogenase láctica, desidrogenase de glucose-6-fosfato, desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, desidrogenase de pirofosfatase inorgânica, ácidos fosfóricos da adenosina (AMP, ADP e ATP), citocromos, adenina, citidina, guanosina, uridina, aminoácidos, glutatona, vitaminas e enzimas do ciclo do ácido cítrico. Estes produtos são isolados e purificados em pequenas quantidades e sua preparação foi revisada por HARRISON (1970).

2.1. Rompimento da Parede Celular

Para se obter componentes celulares intactos têm sido estudados métodos específicos para o rompimento da parede celular. Muitos são os métodos de rompimento existentes para pequena escala. Têm sido utilizados métodos enzimáticos, químicos e mecânicos. Métodos químicos, como o tratamento alcalino, são restritos; os métodos enzimáticos não são universalmente aplicáveis e podem ser onerosos. Os métodos físicos, que são relativamente baratos e comumente usados, têm sido considerados desejáveis para extração de proteínas intracelulares em larga escala (GAVER & HUYGHEBAERT, 1990). Um método que parece bastante promissor é a

desintegração mecânica em um moinho especial que emprega esferas de vidro, que pode ser aplicado em larga escala (HENDENSKOG & MORGAN, 1973).

Os diversos métodos de rompimento das células são descritos por HUGHES *et al.* (1971). Métodos químicos e bioquímicos, como autólise, tratamento com solventes, detergentes ou enzimas líticas, têm a desvantagem de geralmente serem realizados em operação por batelada. As técnicas mecânicas são as mais recomendáveis. Bastante versátil é o homogeneizador APV-Manton-Gaulin; este equipamento combina elevadas forças de cisalhamento com decompressão súbita, provocando o rompimento da parede celular. Sabe-se que *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um certo grau de dificuldade no rompimento celular (HETHERINGTON *et al.*, 1971), o que torna essa etapa especialmente importante.

Na avaliação dos diferentes métodos de ruptura da célula é importante monitorar e avaliar a eficiência de rompimento das células de levedura. Para esta finalidade muitos pesquisadores utilizam a medida das proteínas no sobrenadante, que corresponde às proteínas extraídas do citoplasma das células após o rompimento celular (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

2.1.1. Métodos Físicos

Entre os métodos físicos utilizados para o rompimento celular são citados a agitação com partículas abrasivas, a homogeneização a alta pressão, os tratamentos térmicos e o emprego de ultra-som.

Segundo FRIEDMAN (1977) o tratamento das células de levedura com álcali enfraquece a parede celular e facilita a ruptura por métodos mecânicos. HENDENSKOG & MOGREN (1973) recomendaram o pH de 11,5, mas ARRIOLA *et al.* (1989) afirmaram que ao pH 9,5 as condições de ruptura são mais favoráveis. Condições alcalinas menos drásticas aumentam a

permeabilidade da membrana, a solubilidade das proteínas e reduzem os ácidos nucléicos (FARNUM & CLELAND, 1975; GÓMEZ & VINIEGRA, 1977).

O emprego do congelamento-descongelamento é demasiado caro para aplicação comercial. A sonicação não é efetiva para bactérias gram-positivas e muitas leveduras, por causa da rigidez da parede celular. O uso de homogeneizadores pressupõe pressões bastante elevadas, da ordem de 550 atm, com grande aquecimento da amostra. Desta forma, por eliminação, a moagem em moinho de bolas com homogeneização a alta pressão tornou-se o método de escolha com as mais altas possibilidades de aplicação industrial, apesar do alto investimento e custo operacional envolvido (HENDESKOG *et al.*, 1970).

Segundo CHEN & PEPPLER (1990) uma boa eficiência em aparelhos de alta pressão somente pode ser obtida em escalas laboratoriais e piloto. A homogeneização sob alta pressão pode ser realizada com a suspensão de células na forma líquida (FOLLOWS *et al.*, 1971; HETHERINGTON *et al.*, 1971; LEE *et al.*, 1979) ou sólida (EDEBO & MAGNUSSON, 1973). No primeiro caso foram obtidos bons resultados com o uso do homogeneizador *Manton - Gaulin* 15M-8BA (APV), que possibilitou a ruptura da parede celular pela passagem através de um orifício (válvula de carbureto de tungstênio), de uma suspensão de células mantida sob pressurização (550 atm). Nessas condições foi obtida a extração das proteínas (HETHERINGTON *et al.*, 1971) e enzimas (FOLLOWS *et al.*, 1971) sem perda aparente da atividade. LEE *et al.* (1979) estudaram a estrutura da parede celular de *C. lipolytica* e verificaram que a homogeneização a alta pressão rompeu a parede celular sem fragmentá-la, mantendo o formato original (*egg shape*) das células. Quando se trata de uma suspensão de células na forma sólida, a homogeneização se baseia na mudança de fase causada pelo aumento de pressão. O material no estado sólido (congelado) é forçado a passar de uma câmara do aparelho à outra, através de um orifício diminuto, pela ação de um pistão. A extensão da desintegração e a dimensão final das partículas dependem do número de movimentos de vai e vem do pistão e da pressão empregada.

Se os tratamentos físicos para o rompimento da parede celular forem muito severos, podem causar não apenas a ruptura da parede, como sua quebra em pequenos fragmentos (EDEBO & MAGNUSSON, 1973). O tratamento ultrassônico parece ser particularmente efetivo em "solubilizar" a parede celular, o que acaba dificultando a sua separação. De um modo geral, é desejável o rompimento da parede celular com um mínimo de degradação, evitando a formação de fragmentos muito pequenos, que dificultam a posterior separação e aumentam a viscosidade da suspensão, devido à liberação de polissacarídeos da parede e que formam uma solução coloidal. Segundo MOSQUEIRA *et al.* (1981) as medidas da viscosidade, densidade e características de sedimentação das partículas em suspensão são muito importantes para estabelecer as melhores condições de separação da parede celular em centrífugas industriais.

A desintegração através de agitação da suspensão de células com partículas abrasivas foi reportada em alguns trabalhos, usando homogeneizador horizontal (HEDENSKOG & MOGREN, 1973; MOGREN *et al.*, 1974; GUZMÁN-JUÁREZ & HUDSON, 1978) ou vertical (CURRIE *et al.*, 1972). Estes processos envolvem a agitação de uma suspensão de células por uma rosca sem fim ou outro tipo de agitador, como o de discos, sendo constantemente atritada contra esferas de vidro colocadas no homogeneizador. Segundo EDEBO & MAGNUSSON (1973) a presença de partículas de vidro pode causar adsorção de alguns componentes e a contaminação da suspensão com silicatos. Em certos modelos do equipamento tem sido usadas esferas de plástico, com grande eficiência. Tanto em homogeneizador horizontal (*Dyno-Mill* KD5) como vertical (*Netzsch-Molinox* KES) observou-se que a desintegração é um processo de primeira ordem, cuja eficiência depende do número e tamanho das partículas abrasivas, da concentração da suspensão de células, da vazão, do formato e da velocidade do agitador.

HEDENSKOG & MOGREN (1973) procederam ao rompimento de *S. cerevisiae* em moinho *Dyno-Mill* KD5, com esferas de 0,50 - 0,75 mm de diâmetro que atingiam 50% do volume da câmara (volume sem considerar o ar

intersticial entre as esferas), e com suspensão com 10% em peso de células secas.

LINDBLON & MOGREN (1974) promoveram o rompimento de células de *S. cerevisiae* em moinho *Dyno-Mill* tipo KD5, com esferas de 0.50 - 0.75 mm que ocupavam 50% do volume da câmara (sem considerar o ar intersticial entre as esferas), fluxo de 180 L/h, tempo de retenção de 45 segundos. Na saída do moinho a suspensão apresentava temperatura de 30°C e era imediatamente resfriada a 10°C. Após duas passagens pelo moinho o grau de rompimento era de 95-98%, determinado por contagem de células em microscópio.

GAVER & HUYGEBAERT (1990) utilizaram um moinho similar ao *Dyno-Mill*, porém com câmara de rompimento e rotor cônicos, que denominaram de *CoBall-Mill*. As vantagens desse moinho são: eficiência similar à de outros com volume de câmara de apenas 25%, e refrigeração mais eficiente. Com esse moinho estudaram o rompimento de células de *S. cerevisiae* verificando que o grau de rompimento dependia em grande parte do tempo de retenção, com tempos maiores que 70 segundos. Um volume de esferas (0,75 - 1,00 mm de óxido de zircônio) de até 70% (v/v) mostrou um efeito positivo no rompimento; volume maior causou efeito negativo no rompimento e desnaturação de proteínas. A velocidade de rotação e a concentração de células na suspensão não mostraram efeito na eficiência de rompimento. Também verificaram, através de análise de distribuição de partículas, que as células foram rompidas sem haver uma significativa desintegração da parede celular. Longos períodos de rompimentos (superior a 7 repasses) causaram desnaturação de certas proteínas.

Para o rompimento mecânico em moinho GAVER & HUYGEBAERT (1990) prepararam uma suspensão de levedura em NaCl 0,15 M e K₂ HPO₄ 4 mM, com 30% (m/m) de células e mantida a 20°C. A temperatura de rompimento foi mantida a 30°C para evitar desnaturação de compostos bioativos. Os pesquisadores relatam que avaliaram a eficiência de rompimento através da

quantidade liberada de proteína solúvel, mas não fornecem esse resultado em seu artigo.

ARRIOLA *et al.* (1989) realizaram testes para ruptura da parede celular de *S. cerevisiae* por fricção mecânica, utilizando um desintegrador com esferas de vidro (0,3 - 0,5 mm diâmetro), operado a 4°C e com suspensão de células a 10% a pH 9,5. Obtiveram 97% de ruptura após um tempo de 25 minutos.

HAZEN & CUTLER (1982) determinaram condições para a ruptura de várias leveduras de importância médica usando esferas de vidro, tubos de centrífuga (30 mL) e um *Vortex mixer*. A maioria das espécies foram desintegradas em 75 - 95 %.

2.1.2. Métodos Químicos

A parede celular da levedura é formada por componentes protéicos ligados a carboidratos por uma combinação de forças eletrostáticas e pontes dissulfeto, constituindo uma estrutura rígida e difícil de ser rompida.

Os extratos de levedura são geralmente classificados como hidrolisados, plasmolisados e autolisados. Hidrolisados são preparados enzimaticamente ou pelo cozimento controlado da levedura em meio ácido. Plasmolisados são preparados por extração dos materiais celulares com altas concentrações de sal (NaCl), sacarose ou solventes orgânicos como etanol, acetato de etila, clorofórmio ou outros. Autolisados são preparados por indução da auto-digestão do material citoplasmático.

TREVELYAN (1976b) observou que células de *S. cerevisiae* em suspensão, incubadas por 4 horas e 50°C, tornaram-se permeáveis e possibilitaram a difusão para o meio dos componentes celulares de baixo peso

molecular. Para suprimir o tempo de incubação, esse autor sugeriu a plasmólise com acetato de etila ou com etanol (SUGIMOTO, 1974; TREVELYAN, 1976a). Esses compostos parecem desorganizar algumas estruturas da membrana celular e do vacúolo, iniciando a autólise das células.

Outra possibilidade testada para a destruição da parede celular foi o uso de tióis (mercaptoetanol, ditioneitol, monotioglicerol) que parecem atuar sobre as ligações dissulfeto da parede celular tornando-a permeável, e também ativam as enzimas intracelulares (KIDBY & DAVIES, 1970; SHETTY & KINSELLA, 1978).

O uso de altas concentrações de álcalis ou ácidos resulta na degradação química da parede celular. O tratamento das células de levedura com álcali a pH 11 enfraquece a parede celular e facilita a ruptura por métodos mecânicos. Segundo HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) este é um procedimento comum usado para a recuperação de proteínas de levedura. Os principais problemas com tratamentos químicos são a recuperação dos compostos químicos usados, potencial toxicidade e elevado custo.

No entanto, o tratamento alcalino pode causar hidrólise da proteína, despolimerização, racemização de aminoácidos, reações de beta-eliminação e desnaturação, desfavoráveis se a finalidade for a produção de proteína para a indústria de alimentos (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Para acelerar a autólise são empregados vários agentes plasmolisantes como sal (NaCl) e solventes orgânicos: acetato de etila, acetato de amila, clorofórmio, etanol, etc. (NAUMENKO & GORDIENKO, 1985; EUA Pat. 4, 285,976, 1981).

De acordo com KNORR *et al.* (1979), a maior desvantagem da autólise é o longo tempo de reação requerido, o baixo rendimento de proteínas e alto custo.

2.1.3. Métodos Enzimáticos

Para promover o rompimento da parede celular de levedura pode ser feita a adição de enzimas exógenas durante a incubação de uma suspensão de células. Esse tratamento resulta em liberação das proteínas e RNA do interior das células, do mesmo modo que o rompimento mecânico. KNORR *et al.* (1979) observaram que a adição de zimolase e lisozima ativaram também as proteases e ribonucleases endógenas das leveduras, que passaram a agir durante a incubação. Apesar do eficiente rompimento da parede celular e da liberação de material intracelular em curto espaço de tempo, o uso de enzimas exógenas depende da facilidade em sua obtenção, do grau de pureza exigido e, principalmente do custo.

Cerca de 50% da parede celular da levedura é formada por glucanas, predominantemente glucana álcali insolúvel (β 1 $\rightarrow$ 3 glucana), responsável pela rigidez da parede (MANNERS *et al.*, 1973a). PHAFF (1977) concluiu que a remoção efetiva ou o enfraquecimento da parede celular necessita envolver hidrólise das ligações β (1 $\rightarrow$ 3) glucosídicas. A levedura *S. cerevisiae* contém ambas endo e exo β (1 $\rightarrow$ 3) glucanases (ABD-EL-AL & PHAFF, 1969; BACON, 1970; CORTAT *et al.*, 1972), as quais contribuem para o processo de autólise.

REED & PEPPLER (1973) reportaram o uso de enzimas para romper as células de levedura e ajudar na degradação proteolítica durante a autólise. Segundo KNORR *et al.* (1979) a lise enzimática da parede celular, usando enzimas exógenas, é bastante efetiva pois elas ativam as proteases endógenas. Ao associarem as enzimas zimolase / lisozima seguido de extração a pH 9 obtiveram um rendimento superior a 80% do nitrogênio total da célula de levedura. Fontes bacterianas de β (1-3) glucanases estudadas incluem *Arthrobacter luteus* (KITAMURA *et al.*, 1971) e *Bacillus circulans* (TANAKA & PHAFF, 1965). Enzimas que exibem atividade lítica junto às leveduras também

podem ser obtidas de um molusco (*Helix pomatia*), que contém uma mistura de cerca de 30 enzimas (ANDERSON & MILLBANK, 1966; PHAFF, 1977).

FEDOROVA & NEKLYUDOV (1985) estudaram a influência de enzimas proteolíticas exógenas (papaína, pepsina, pronase E e protosubtilisina) no processo de autólise da levedura de panificação, obtendo bons resultados.

2.2. Componentes da parede celular de *S. cerevisiae*

A parede celular das leveduras é bastante espessa, cerca de 70 nm, o que corresponde a cerca de 10 vezes a espessura da membrana plasmática. HOUGH (1990) atribui à parede celular uma espessura de 100 - 200 nm. Esta parede não apenas serve de proteção e estrutura, como também é metabolicamente importante.

A parede representa cerca de 14 - 15% da massa celular total segundo HENDENSKOG & MOGREN (1973), 15 - 25% segundo ROSE (1993), cerca de 25% de acordo com AL-BASSAM *et al.* (1986), ou até mesmo 30% (HOUGH, 1990). É constituída por aproximadamente 40% de β -glucanas, 40% de α -mananas, 8% de proteínas, 7% de lipídios, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (HOUGH, 1990).

Quando a parede é tratada com álcali fraco ou certas enzimas digestivas, são obtidas frações macromoleculares e fragmentos da parede celular. No caso de hidrólise com ácidos fortes, são obtidos glucose, manose, glucosamina, aminoácidos, fosfatos e lipídios (HALÁSZ & LÁSTITY *et al.*, 1991).

A glucana obtida de levedura é um componente insolúvel da parede celular; quando submetida a secagem em *spray-drier* é um pó claro, contendo cerca de 87% de carboidrato, 11% de proteína, menos de 0,5% de ácido nucléico, 1% de cinza e 6% de umidade. Os polissacarídeos da parede celular da

levedura são constituídos de unidades de glucose e manose; na parede a proporção glucose: manose, aproximada, é 2:1 (DZIEZAK, 1987a).

Segundo Northcote & Horne (1952), e Bartnicki-Garcia & Lippman (1982) citados por VUKOVIC *et al.* (1994), a parede celular de *S. cerevisiae* apresentam cerca de 10 - 20% de proteína e 80-90% de carboidratos, dos quais glucana e manana representam 50% cada uma.

Entre 60 a 90% da parede de *S. cerevisiae* é composta por polissacarídeos, sendo os outros compostos proteínas e lipídios; a maior parte dos polissacarídeos são glucanas e fosfomananas (ROSE, 1993).

Segundo PHAFF (1971) vários trabalhos relatam que lipídios estão presentes em preparações de parede celular, sendo que alguns são extraídos por solventes orgânicos sem hidrólise prévia (lipídios livres), enquanto que outros necessitam dessa hidrólise (lipídios ligados) para serem extraídos. Um considerável grau de incerteza envolve a extração de lipídios de paredes isoladas de *S. cerevisiae*. Apesar de não estar esclarecida a função dos lipídios (BARTNICKI-GARCIA, 1968), alguns autores acreditam que sejam componentes verdadeiros da parede e atribuem aos mesmos uma participação na função estrutural (NICKERSON, 1963). Outros, como ROSE (1993), afirmam que quaisquer lipídios da parede são provenientes de fragmentos da membrana celular que estavam ligados à parte interna da parede e foram recuperados durante o isolamento da parede.

A parede celular de *S. cerevisiae* contém cerca de 8% de proteína . (HENDESKOG & MOGREN, 1973), e seu teor varia entre 5 a 15% (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Todavia, a maioria destes dados é baseada na determinação do N total e uso do fator 6,25 para obter o teor de proteína; esses dados estão sujeitos a erros devido a teores variáveis de nitrogênio não protéico, como N-acetil-glucosamina (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

VUKOVIC *et al.* (1994) relatam que 2 - 3% da parede consiste de quitina que ocorre relacionada com a formação de cicatrizes resultantes da

gemulação no processo reprodutivo da levedura. A quitina é um polímero de ligações β (1-4) de N-acetilglucosamina (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

O teor de quitina é geralmente determinado pela quantificação do teor de nitrogênio de hexosaminas. O teor de N-hexosamina variou de 0,06 a 0,24% da matéria seca total ou de 0,6 a 2,8% do nitrogênio total, em dados obtidos em estudo de *Candida*, por Smith & Palmer (1976) citado por HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

A proteína estrutural da parede celular é firmemente ligada a polissacarídeos para formar uma estrutura complexa na qual a glucosamina é sugerida como o agente de ligação entre a proteína e o polissacarídeo. Assim, embora a glucose e a manose sejam os principais componentes da parte de carboidratos do complexo, a glucosamina é encontrada em pequenas quantidades em algumas frações (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

As proteínas presentes nas preparações de paredes celulares apresentam funções estruturais e enzimáticas (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Essas proteínas são principalmente enzimas glucoprotéicas como invertase, melibiase, fosfatase ácida, glucanases, aril β -glucosidase, fosfolipases e proteases; essas enzimas funcionam tanto anabólicas como catabolicamente. Uma parte significativa da atividade enzimática extracelular da levedura é localizada na parede e espaços periplásmicos, isto é, espaços entre a parede e a membrana plasmática (HELBERT, 1982).

Dois tipos de proteína da parede celular são mencionados, de acordo com o polissacarídeo componente do complexo proteína-carboidrato: glucoproteína e manoproteína (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Tanto o RNA como o DNA ocorrem na célula de levedura, mas o teor de RNA é bastante superior, cerca de 50-100 vezes maior que o DNA. A quantidade de RNA pode atingir um terço da proteína total (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Entre os estudos realizados sobre a morfogênese, tem sido dada grande atenção à biossíntese e estrutura dos componentes da parede celular. Com relação às paredes celulares de leveduras e fungos, foi verificado que elas apresentam estruturas complexas e dinâmicas, constituídas de múltiplas camadas compostas principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídios (GANDER, 1974). A parede consiste de uma camada interna de glucana (provavelmente com funções estruturais) e uma camada externa de manana, havendo proteínas engastadas entre as duas (DZIEZAK, 1987a). Os resultados obtidos por VUKOVIC *et al.*, (1994) sugerem que *S. cerevisiae* apresenta parede celular com estrutura em camadas, sendo as cadeias de manana externas e as glucanas internas.

De acordo com Suomalainen *et al.*, (1973) citado por HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) a parede celular consiste de uma camada externa principalmente de manoproteínas com uma certa quantidade de quitina, a camada intermediária consiste de glucana, e a camada interna parece conter mais proteína, incluindo proteína enzimática.

Uma descrição um pouco diferenciada é realizada por MILLER (1982) que relata uma camada externa consistindo principalmente de manana fosforilada, uma camada intermediária de β -glucana solúvel em álcali e uma camada interna de β -glucana insolúvel em álcali.

As proteínas da parede celular podem ser extraídas por álcali e precipitadas com sulfato de amônio, resultando em aumento das frações de glicoproteínas (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

A glucana está unida à proteína e representa o componente estrutural mais abundante, localizado na parte interna da parede (HOUGH, 1990). A manana encontra-se também ligada à proteína, às vezes através de hexosamina, e tende a localizar-se na parte externa da parede (HOUGH, 1990). VUKOVIC *et al.* (1994) relataram que a parede celular é composta de uma glucana na qual diferentes manoproteínas estão dispersas.

Estudos realizados com diversos fungos e leveduras demonstraram que normalmente polissacarídeos superficiais tais como mananas, galactomananas e ramnomananas estão ligados firmemente a peptídeos (LLOYD, 1970; GANDER, 1974; BALLOU, 1974). Em leveduras foi verificado que a ligação da manana com o polipeptídeo era feita através de uma ponte de 1 a 7 resíduos de N-acetilglucosamina. Além da ligação com os polissacarídeos o peptídeo apresentava ainda diversos oligossacarídeos de manose a ele ligados diretamente através de ligações envolvendo ácidos aminados hidroxilados como a serina (BALLOU, 1974).

VUKOVIC & MRSA (1995) indicam que a existência de interações proteína-glucana podem ser responsáveis pela localização de proteínas extracelulares da levedura, na parede celular.

VUKOVIC *et al.* (1994) verificaram que se o rompimento mecânico é conduzido em pH ácido, as proteínas intracelulares liberadas ligam-se à camada interior da parede de forma bastante eficiente. Esses pesquisadores concluem que com exceção das cadeias de mananas das glicoproteínas da parede celular (*S. cerevisiae*) que não interagem com outros componentes celulares, todos os outros constituintes da parede podem reagir uns com os outros.

A composição dos polissacarídeos pode variar grandemente dependendo da classe e família a que pertence o fungo ou a levedura. Com base na predominância de determinados polissacarídeos na parede celular, BARTNICKI-GARCIA (1968) dividiu grupos taxonômicos de fungos e leveduras em categorias, onde enquadrou os membros das famílias *Saccharomycetaceae* e *Cryptococcaceae* no grupo dos que apresentam na parede celular maior concentração de glucana e manana.

A composição de polissacarídeos da parede celular das leveduras é afetada por muitos fatores, já comprovados, tais como a linhagem (DELPECH *et al.*, 1977), condições de cultivo e idade da cultura (REISINGER *et al.*, 1980). De acordo com NICKERSON (1974) existe uma estreita correlação entre composição da parede celular e grupamento taxonômico baseado na morfologia. A presença

de manana como um componente da parede celular das leveduras as diferencia de outros fungos.

De modo geral, determinados polissacarídeos presentes nas paredes celulares de fungos e leveduras têm um papel importante em determinar a rigidez da parede e manter a morfologia celular (quitina e glucana), enquanto outros estão mais diretamente envolvidos com a resposta imune (mananas, fosfomananas, galactomananas e ramnomananas). Outros componentes, como proteínas ou complexos de proteínas e polissacarídeos foram também relacionados à manutenção da rigidez da parede celular em *Saccharomyces cerevisiae* (POWER & CHALLINOR, 1969).

No que diz respeito à orientação da biossíntese da parede celular durante os processos de dimorfismo, BARTNICKI-GARCIA & LIPPMAN (1969) verificaram que nas leveduras a biossíntese ocorre de maneira dispersa na periferia de toda a parede celular, enquanto que nos fungos a biossíntese se dá na região apical.

Além de exercer funções estruturais, a parede celular de leveduras está envolvida no transporte de nutrientes para o citoplasma destinados ao metabolismo e crescimento. Esse transporte, em alguns casos, é auxiliado por enzimas localizadas na parede (MACWILLIAN, 1970).

Estudos realizados com parede celular de *S. cerevisiae* demonstraram a presença de manana, glucana solúvel em água, glucana álcali solúvel e glucana álcali insolúvel e glucana ácido solúvel (MANNERS *et al.*, 1973a; BALLOU, 1974; PHAFF, 1977).

O método mais usual de extração de mananas consiste no uso de KOH 2%, a 100°C por 2 horas, seguido de neutralização e precipitação do polissacarídeo com metanol. Este procedimento também extrai a glucana solúvel, e a manana pode ser posteriormente purificada por precipitação com solução de Fehling como um complexo de cobre, que é removido com tratamento ácido ou com resina de troca iônica, e a manana purificada é precipitada com metanol.

Este método produz uma manana levemente degradada contendo alguns pequenos resíduos de peptídios com traços de glucosamina e algumas vezes ligações de fosfodiéster (SPENCER & GORIN, 1973). MANNERS *et al.* (1973a) utilizaram este mesmo método de fracionamento, porém empregando o etanol para precipitar os polissacarídeos.

A metodologia adotada até a década de 70, para precipitação de polissacarídeos, era através da solução de Fehling, gerando um complexo carboidrato-cobre. Todavia, sabe-se que este procedimento pode causar certo grau de degradação, especialmente de ligações fosfodiéster (ROSE, 1993). Assim, este procedimento foi substituído pelo uso de Cetavlon para precipitar o polímero como um complexo cetilmetilamônio borato (CAWLEY *et al.*, 1972).

HENDENSKOG & MOGREN (1973) quantificaram os aminoácidos presentes na levedura (*S. cerevisiae*) e nas frações de parede celular bruta e parede celular purificada.

2.2.1. Glucanas

A principal glucana presente na parede de *S. cerevisiae* é alcáli e ácido insolúvel com ligação β (1 $\rightarrow$ 3); há uma pequena proporção de glucana β (1 $\rightarrow$ 6). A pequena quantidade de quitina é associada com a glucana álcali insolúvel (ROSE, 1993).

Embora uma grande quantidade de dados a respeito da estrutura de polissacarídeos da parede celular tenha sido publicada na literatura até 1970, sumarizadas por PHAFF (1971), atualmente aceita-se que o principal polissacarídeo de espécies de *S. cerevisiae* é a glucana. Essa glucana isolada de *Saccharomyces* é um polissacarídeo altamente insolúvel; é uma β (1 $\rightarrow$ 3) glucana sendo ramificada com ligações β (1 $\rightarrow$ 6). A distribuição exata de ligações β (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 6) na molécula de glucana ainda não é totalmente esclarecida;

provavelmente diferentes tipos de glucana, quanto à ramificação e comprimento das regiões não ramificadas, existam em paredes celulares de linhagens diferentes (HALÁZ & LÁSZTITY, 1991).

A patente americana (E.U.A. Pat. 4.122.196, 1978) resume a obtenção da glucana de levedura (parede celular), através da autólise da levedura, iniciando pela separação por centrifugação (9.000 g) da parede celular do autolisado. A parede foi resuspensa a 5% de sólidos em água a pH 5,0 e 10°C a cada passagem. A parede triturada foi ajustada para pH 9,5 pela adição de NaOH, agitada lentamente por 60 minutos a 26°C. As partículas de parede foram separadas novamente por centrifugação a 9.000 g, resuspendida em água e centrifugada novamente para obter a glucana. Foi obtida uma suspensão de glucana com rendimento de 9,5 kg de glucana por 45 kg de levedura inicial. A composição dessa glucana é: 73,7% carboidratos; 20,4% proteínas, 2,4% ácido nucléico e 1,0% cinzas.

2.2.1.1. Glucana alcali insolúvel

Durante o período de 1950 - 1960 as opiniões eram divergentes em relação à estrutura das glucanas álcali insolúveis de *Saccharomyces sp.* Com base na análise de metilação, BELL & NORTHCOTE (1950) sugeriram que esta possuía uma estrutura ramificada com cadeias relativamente curtas de resíduos de glucose (1→3), interligados por cerca de 11% de ligações (1→2) glucosídicas. O comprimento médio da cadeia, confirmado por oxidação por periodato, era de nove resíduos de glucose.

Ao contrário, PEAT *et al.* (1958a) usando hidrólise ácida parcial, concluíram que a glucana era linear e continha certa sequência de resíduos β -glucose (1→3) e (1→6). A presença de cerca de 10 - 20% de ligações (1→6) foi confirmada posteriormente por PEAT *et al.* (1958b).

Na tentativa de resolver essas diferenças, Manners & Patterson (1966), citados por MANNERS *et al.* (1973a), realizaram análises de metilação, oxidação com periodato e estudos de degradação enzimática. Concluíram que a glucana de levedura tinha uma estrutura ramificada, contendo cadeias principais de resíduos de β (1 $\rightarrow$ 6) glucose, as quais eram ligadas às cadeias laterais lineares de resíduos de β (1 $\rightarrow$ 3) glucose. Uma estrutura alternativa foi proposta por MISAKI *et al.* (1968), a qual foi similar em alguns aspectos à estrutura proposta pelos pesquisadores mencionados acima.

Em todos esses experimentos (1950-1968) os polissacarídeos foram sucessivamente extraídos com álcali quente e com ácido acético, e/ou autoclavagem em água, para remover manana e glicogênio respectivamente; o material residual foi considerado como sendo "glucana de levedura". Uma observação fundamental de BACON & FARMER (1969) conduziu à elucidação da estrutura das glucanas. Esses pesquisadores mostraram que a glucana de levedura preparada conforme descrição anterior era heterogênea, e continha um polissacarídeo solúvel em ácido acético o qual foi demonstrado por hidrólise parcial e por espectrometria de infravermelho ser β (1 $\rightarrow$ 6) glucana. A demonstração de que "glucana de levedura" era, na realidade, uma mistura de β (1 $\rightarrow$ 3) glucana, e em menor proporção de β (1 $\rightarrow$ 6) glucana, proporcionou uma explicação para os diversos resultados experimentais anteriores.

Esta significativa descoberta de BACON & FARMER (1969) permitiu orientar um fracionamento detalhado desses polissacarídeos e a caracterização dos componentes resultantes por MANNERS *et al.* (1973 a,b). O maior componente (cerca de 85%) era a β (1 $\rightarrow$ 3) glucana pouco ramificada, insolúvel em álcali, de alto peso molecular (cerca de 240.000), contendo cerca de 3% de ligações β (1 $\rightarrow$ 6) glucosídicas intercadeias (MANNERS *et al.*, 1973a). O menor componente (cerca de 15%), era uma β (1 $\rightarrow$ 6) glucana ramificada, solúvel em ácido.

A β (1 $\rightarrow$ 3) glucana, componente em maior proporção, é considerada responsável pela formação de um "envelope" que proporciona rigidez à parede

celular. O peso molecular de cerca de 240.000 representa um valor mínimo e se baseia na hipótese que cada molécula contém um resíduo livre de glucose redutora. A validade dessa consideração ainda não é reconhecida, porém não foi avaliado outro método para determinação do peso molecular dessas macromoléculas insolúveis (ASPINAL, 1973).

A presença de pequena, mas significativa quantidade de β (1→6) glucana em células de *S. cerevisiae*, direciona à discussão sobre sua função biológica e o controle da relativa proporção de síntese dos dois tipos de β -glucanas. Visto que a proporção dos dois tipos de ligação na β (1→6) glucana é diferente daquelas de β (1→3) glucana, é improvável que a primeira seja uma intermediária na biossíntese da última (MANNERS *et al.*, 1974).

Alternativamente, a β (1→6) glucana poderia funcionar como plasticizadora ou material de reserva no envelope relativamente rígido constituído pelo maior componente a β (1→3) glucana, onde sua função poderia ser a de prevenir a excessiva agregação de segmentos lineares da cadeia, apesar de ser mantida uma certa flexibilidade na parede, o que se faz necessário para a expansão da parede durante o crescimento (MANNERS *et al.*, 1974).

2.2.1.2. Glucana ácido solúvel

A β (1→6) glucana ramificada possui um peso molecular de cerca de 22.000 e uma alta proporção de ligações (1→6) (65%), junto a um pequeno número de ligações (1→3) que se apresentaram tanto como ligações interresíduos (5%), como intercadeias (MANNERS *et al.*, 1973b). A molécula era altamente ramificada, possuindo 16% de grupos terminais não redutores. Os autores enfatizam que preparações de glucanas de diferentes linhagens de leveduras diferem relativamente em proporção dos dois componentes e que os

componentes individuais podem variar consideravelmente no grau de ligação e outros parâmetros estruturais.

A β (1 $\rightarrow$ 6) glucana é solúvel em condições não alcalinas, tem um peso molecular relativamente baixo, e pode ser associada como um carboidrato de reserva e não um material estrutural, apesar desta função ser indubitavelmente do glicogênio, com o qual está estreitamente associada (EVANS & MANNERS, 1971).

2.2.1.3. Glucana álcali solúvel

Pesquisas iniciais relatam a presença de glucana alcali-solúvel em preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, porém sua estrutura molecular ainda não era conhecida.

FLEET & NICKERSON (1959), citado por FLEET & MANNERS (1976), conduziram um estudo detalhado a esse respeito. Os polissacarídeos foram extraídos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1107, com hidróxido de sódio diluído a frio (4°C) por seis dias. A glucana quantificada em cerca de 20% do peso seco da parede celular, precipitou como um gel com a neutralização do extrato alcalino. A glucana obtida foi insolúvel em água, mas solúvel em hidróxido de sódio 1M e dimetil sulfóxido. Estudos físico-químicos demonstraram que esta fração era heterogênea. A hidrólise ácida parcial mostrou a presença tanto de ligações glucosídicas β (1 $\rightarrow$ 3) como β (1 $\rightarrow$ 6) e as análises de metilação indicaram que a última estava presente tanto nas ligações interresíduos como intercadeias (FLEET & MANNERS, 1976).

Para determinação da estrutura fina da glucana álcali-solúvel, FLEET & MANNERS (1977) procederam a uma degradação enzimática. A estrutura global foi uma macromolécula com uma parte central sendo β (1 $\rightarrow$ 3) glucana com baixo grau de ramificação (cerca de 2,0%) e resíduos ocasionais de

ligações (1→6). A esta parte central eram ligadas várias cadeias laterais contendo principalmente resíduos com ligações (1→3) ou (1→6), ou ainda, uma mistura de ambos.

Esta glucana frequentemente continha um fragmento de manana que era obtido pela ação de uma endo β (1→6)-glucanase. Isso implicaria que parte da manana da parede celular é presa por alguns resíduos de glucose (1→6), apesar da natureza dessa associação (se é covalente ou outro tipo) não ter sido ainda estabelecida (FLEET & MANNERS, 1977).

2.2.2. Mananas

A manana de levedura é o segundo polissacarídeo em importância da parede celular da levedura. Pode ser extraída da célula total por fervura com hidróxido de sódio a 6%, e separada de outros polissacarídeos solúveis por precipitação como complexo insolúvel de cobre. O precipitado é lavado com água, dissolvido com ácido hidrocloreídrico e finalmente precipitado com etanol. Este polissacarídeo isolado contém apenas manose, livre de glicogênio e glucanas solúveis (BARRETO-BERGTER, 1989). As informações sobre sua exata estrutura foi a princípio contraditória, mas atualmente existe concordância que a cadeia principal é formada por unidades de manose ligadas α (1→6); as cadeias laterais são também de unidades de manose ligadas à cadeia central com ligação α (1→2); diversos autores também encontraram ligações α (1→3) na cadeia lateral (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

A manana é uma molécula bastante ramificada com um grupo final e um ponto de ramificação a cada 3 unidades de manose; assim, esses polissacarídeos contêm ligações (1→2), (1→3) e (1→6) (HAWORTH *et al.*, 1941, citado por STEWART & BALLOU, 1968).

HAWORTH *et al.* (1941), citado por STEWART & BALLOU, (1968), propuseram várias estruturas para a manana, cada uma tendo uma cadeia principal de unidades de D-manose (1→2) com cadeias laterais ligadas através da posição 6 de resíduos da cadeia principal.

BALLOU (1976) verificou que, em uma linhagem de *S. cerevisiae*, cerca de 90% da parede celular é composta por manose, 10% de proteína e pequena proporção de fósforo na forma de ligações de fosfodiéster.

Há evidências de que as mananas, juntamente com peptídeos complexos constituem a camada mais externa da parede celular das leveduras (CABIB, 1975; BALLOU, 1976). Esses polissacarídeos apresentam-se bastante ramificados, contendo uma cadeia principal constituída de ligações α (1→6), substituídas nas posições 2 por cadeias laterais contendo unidades de α -D-manopirranose ou oligossacarídeos com unidades de manose ligadas por ligações (1→2) e (1→3) (STEWART & BALLOU, 1968).

Um estudo de mananas de diversas fontes, através da técnica de acetólise, mostrou que a estrutura da manana varia entre linhagens (STEWART & BALLOU, 1968). O teor de manana de 4 linhagens de levedura de cervejaria também apresentou ampla variação, de 7 a 36% da quantidade total de carboidratos (trealose, glicogênio, manana e β glucana), de acordo com MANNERS *et al.* (1971).

As mananas nas leveduras comportam-se como antígenos, sendo que as cadeias laterais representam os seus grupos imunodominantes (HASENCLEVER & MITCHELL, 1964; SPENCER & GORIN, 1973; BALLOU, 1974).

O conteúdo de fósforo de mananas é variável na parede celular das leveduras. No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, o fosfato é ligado à posição 6 das unidades de manose na cadeia lateral (NICKERSON, 1974).

Nas manoproteínas de *S. cerevisiae* o teor de fosfatos é menor que 0,1%. A presença destes grupos fosfato altamente carregados nas regiões externas da parede celular pode afetar a forma como estas células são atraídas e unidas a outras superfícies (REISS *et al.*, 1992).

Linhagens de *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis* e *Candida lipolytica* contêm galactomananas, com cadeia principal de α (1→6) manopirana, contendo nas cadeias laterais unidades galactopiranosídicas de forma variada. (BARRETO-BERGTER & GORIN, 1983).

2.3. Aplicações dos polissacarídeos da parede celular de levedura

De preferência a biomassa celular de levedura deveria ser consumida diretamente como alimento ou aditivo de alimentos; todavia, vários problemas restringem o seu uso. A indigestibilidade da parede celular reduz a biodisponibilidade das proteínas; em células rompidas a presença de substâncias fisiologicamente ativas e alergênicas é problemática; a alta concentração de ácido nucleico (RNA) é indesejável devido ser indutor de elevação de ácido úrico no sangue; finalmente, são bastante limitados a aparência, atributos de qualidade (odor, sabor, cor e textura) e propriedades funcionais da célula seca e não rompida (KNORR, 1979).

A parede celular prejudica a digestão e a biodisponibilidade de nutrientes, pode causar flatulência, respostas alérgicas e diarreia. Os lipídios contribuem para odor indesejável pela sua oxidação e prejudicam as propriedades funcionais da proteína.

Na área de alimentos, muitos polissacarídeos de origem microbiana têm sido utilizados largamente, devido a propriedades de viscosidade em sistemas aquosos, sendo empregados como espessantes. A parede celular bruta de levedura, lavada com água, produz uma viscosidade mínima de 500 centipoise

quando suspensa em uma solução aquosa, a 10% em peso à 25°C, de acordo com uma patente americana (E.U.A. Pat. 4, 122, 196, 1978).

Outra aplicação de grande interesse é a utilização como substituto de gorduras em certos tipos de alimentos dietéticos, tais como coberturas de saladas, sorvetes, etc., devido ao gosto semelhante a gordura, *flavor* agradável e aparência suave (E.U.A. Pat. 3, 867, 554, 1975).

A glucana pode ser usada como emulsificante, estabilizante, espessante e texturizante em molhos para saladas. A *Food and Drug Administration* (FDA) permite seu uso como estabilizante, espessante e texturizante em doces e sobremesas congeladas, coalhada, pastas de queijo e análogos (DZIEZAK, 1987a).

A manoproteína extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é um efetivo bioemulsificante, sendo que a proteína representa papel fundamental nesta propriedade. Emulsões de querosene em água foram estabilizadas com manoproteína em diversas condições na faixa de pH 2 a 11, em concentrações de cloreto de sódio superiores a 5% e acima de 50% de etanol na fase aquosa. Além disso, na presença de concentrações menores de vários solutos, as emulsões de manoproteína apresentaram estabilidade por três ciclos de congelamento e descongelamento. Este bioemulsificante pode ser extraído de forma simples e com bom rendimento de *Saccharomyces cerevisiae*, o que demonstra ser esse resíduo da indústria cervejeira uma potencial fonte para produção em larga escala desse importante produto (CAMERON *et al.*, 1988).

A glucana de levedura encontra também uso como fibra dietética. Considera-se fibra dietética uma mistura de diferentes compostos (principalmente polissacarídeos) que permanecem intactos após tratamento enzimático específico. A parte insolúvel da fibra dietética consiste de celulose e lignina e a solúvel de substâncias pécticas, gomas e glucanas mistas (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

O interesse crescente na fibra dietética é devido ao efeito benéfico da fibra solúvel como lipocolesterolêmica. Dados recentes sobre o teor de fibra dietética de levedura, são reportados por SARWAR *et al.* (1985). O teor de fibra dietética de seis linhagens de *S. cerevisiae* variou de 15,4 a 17,8%; o teor de celulose foi baixo, de 2,5 a 5,5%. Resultados similares foram obtidos por SALÓ, citado por HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

A glucana incorporada na dieta hipercolesterolêmica de ratos baixou rapidamente e de forma significativa os níveis de colesterol sérico, podendo ser considerada um agente hipocolesterolêmico (ROBBINS & SEELEY, 1977).

Na área médica a β glucana isolada de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido referida como apresentando propriedades imunoestimulantes. Essa glucana pertence à classe de drogas conhecidas como Modificadoras da Resposta Biológica (*Biological Response Modifiers - BRMs*), com efeito benéfico em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas. Além disso, atua como modificadora da supressão imunológica e também de doenças neoplásicas em nível experimental. Isso tem estimulado pesquisas no potencial de aplicações biomédicas dessa β glucana BRM. Com o interesse nesse potencial terapêutico da glucana, foram desenvolvidos estudos para converter a β glucana de levedura na forma solúvel em água, não tóxica e ativa imunologicamente, para administração parenteral. O método para a solubilização dessa β glucana na forma de micropartículas tem empregado o uso de metil sulfóxido e uréia e parcialmente fosforilada a 100°C, resultando a glucana fosfato solúvel em água (WILLIAMS *et al.*, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

Foram empregados para este estudo dois tipos de materiais:

a) levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) na forma de células frescas em suspensão aquosa, peneirada e desamargada, gentilmente cedida pela PRODESA S.A.; a suspensão original de levedura é proveniente de processo industrial de produção de cerveja. Essa suspensão foi mantida acondicionada e sob refrigeração até sua utilização, e foi amostrada do mesmo lote do qual se obteve a parede residual (item b).

b) parede celular industrial residual, do processo industrial de autólise e preparo do extrato de levedura (PRODESA S.A.). Este material foi mantido acondicionado e sob refrigeração até sua utilização.

A suspensão de levedura residual de cervejaria é um subproduto que encontra mercado como matéria-prima para obtenção de extrato de levedura. Essa suspensão é formada por células de levedura, mosto fermentado e componentes do lúpulo utilizado no processo de fabricação da cerveja; o lúpulo tem por finalidade conferir o sabor amargo característico da cerveja. Para obtenção do extrato há necessidade de um pré-processamento, para eliminar componentes residuais do lúpulo e mosto, através de lavagem com solução alcalina e água, geralmente utilizando o carbonato de sódio. Obtém-se assim a suspensão aquosa de células de levedura peneirada e desamargada, referida no item a. Esta suspensão constitui a matéria-prima preparada para o processo de obtenção de extrato de levedura, sendo submetida a autólise para rompimento da célula; a parede celular, como componente insolúvel é separada e origina o subproduto denominado de parede celular residual, referido no item b.

3.2. Tratamento das matérias-primas para obtenção da parede celular bruta

A levedura de cerveja (a) e parede celular industrial residual (b) foram processadas para obtenção de parede celular bruta a ser submetida à extração e caracterização química. A levedura de cerveja é inicialmente submetida a rompimento mecânico das células para posterior separação e liofilização da parede celular; a parede celular industrial residual foi seca em *spray-drier*.

3.3. Otimização do processo de rompimento mecânico da parede celular da levedura

A desintegração das células foi realizada por processo mecânico, em moinho *Dyno-Mill*, que consiste de uma câmara de rompimento com capacidade de 1,4 litros formada por um cilindro horizontal com discos rotatórios, e preenchida com esferas de vidro de 0,3 a 0,6mm de diâmetro. O sistema foi mantido a uma temperatura entre 10 e 18 °C, com a circulação de etilenoglicol no interior da camisa da câmara de rompimento, com uma unidade de refrigeração auxiliar. O pH da suspensão de células foi corrigido para 8,0 com o emprego de Na_2CO_3 , para fragilizar a parede e obter maior solubilidade das proteínas, favorecendo o processo de ruptura.

Foram testadas três variáveis com o objetivo de otimização das condições de rompimento celular, visando obter no mínimo 90% de ruptura das células. Para a realização do estudo das variáveis foi fixado o volume de esferas de vidro em 70% da câmara de rompimento. As variáveis testadas foram:

a) velocidade dos discos rotatórios: foram testadas as velocidades de 1910, 2400 e 3350 rpm, em fluxo constante de 40 mL/min de suspensão de levedura com concentração de 5% de sólidos secos ou 25% (V/V) de células em base úmida. Também foi testado o reciclo da suspensão, com duas reciclagens.

b) concentração e fluxo da suspensão de células de levedura: com base na etapa anterior, foi estabelecida a velocidade de 2400 rpm, variando a concentração (5 e 8% de sólidos secos ou 25 e 40% (V/V) de células em base úmida) e o fluxo (40 e 80 mL/min) da suspensão de leveduras.

A suspensão de células rompidas foi centrifugada sob refrigeração (10°C e 16.274 x g) . A parede celular sedimentada foi mantida em freezer (-18°C) até sua liofilização. A Figura 1 mostra os passos gerais do processo.

A avaliação do rompimento celular foi realizada através da determinação do nitrogênio total (método de Kjeldahl) no sobrenadante da centrifugação e na suspensão de células intactas. A quantidade de nitrogênio no sobrenadante, liberado pelo rompimento, em relação ao nitrogênio total da suspensão, foi considerado como % de rompimento ou rendimento do rompimento.

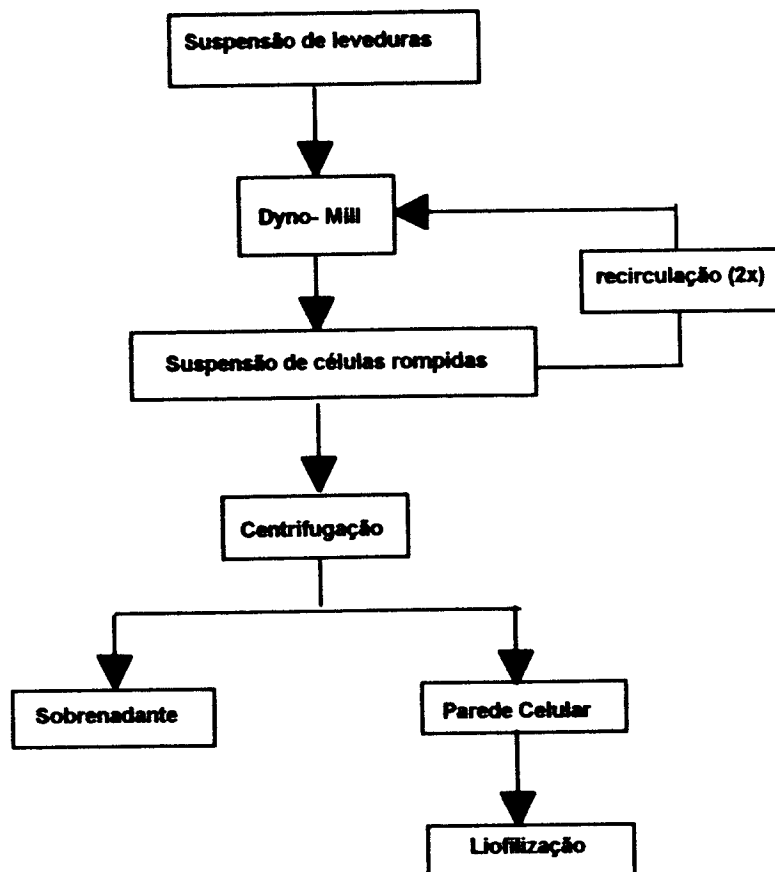


FIGURA 1 - Esquema da obtenção de parede celular através do rompimento mecânico da parede celular da levedura de cerveja em moinho Dyno-Mill.

3.4. Extração da glicoproteína da parede celular bruta

Para a extração da fração de glicoproteína (Figura 2), segundo metodologia descrita por LLOYD (1970), 100g de parede celular bruta foram reidratadas em 400mL de solução tampão fosfato 0,05M (pH 7,0), com homogeneização. Essa suspensão foi autoclavada a 120°C por 30 minutos. Após o resfriamento essa suspensão foi centrifugada a 13.188 x g por 30 minutos a 5°C. O sobrenadante foi concentrado a vácuo até 100mL e adicionado a 300mL

de etanol 95 °GL, sob agitação, e deixado 12 horas a 4 °C, para precipitação da glicoproteína. Após a centrifugação desse material, o precipitado foi dissolvido em água destilada, dialisado por 48 horas em água corrente e liofilizado. Essa fração corresponde à glicoproteína bruta (GPR e GPI).

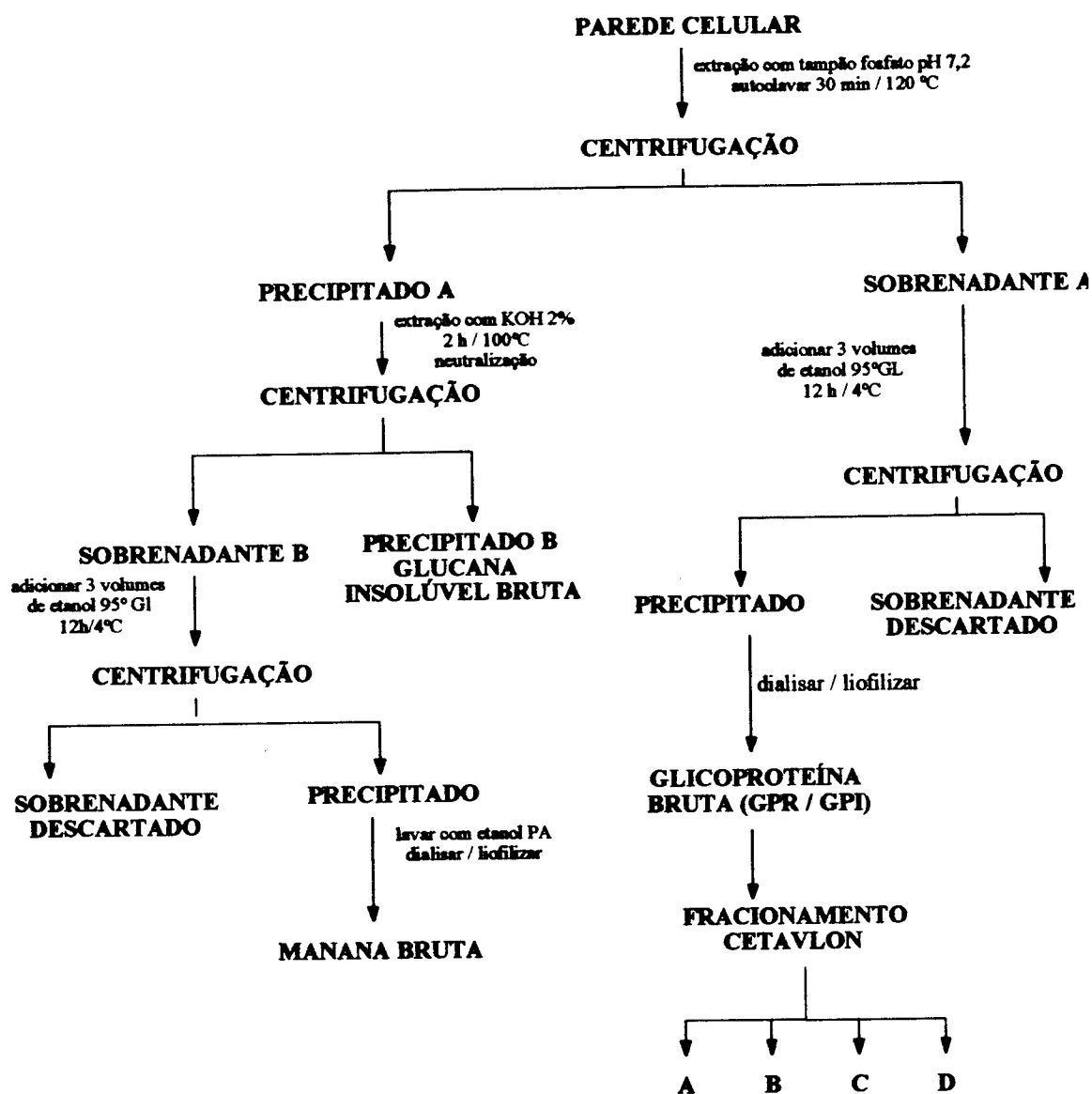


Figura 2 - Esquema do isolamento e fracionamento de glicoproteína, glucana insolúvel bruta e manana bruta da parede celular de *S. cerevisiae* (BARRETO-BERGTER *et al.*, 1981).

3.4.1. Purificação da glicoproteína bruta com Cetavlon

A glicoproteína bruta liofilizada foi submetida a purificação com brometo de hexadeciltrimetilamônio (Cetavlon), de acordo com metodologia descrita por LLOYD, (1970), conforme o esquema apresentado nas Figuras 3a e 3b. Para esse processo, 3,6g de glicoproteína bruta foram dissolvidas em 100 mL de água destilada e a esta solução foram adicionados 3,6g de Cetavlon previamente dissolvido em 50 mL de água destilada. Após precipitação em temperatura ambiente, o Precipitado I foi lavado com água destilada, centrifugado e o precipitado ressuspenso em cerca de 2 mL de NaCl 1M, permanecendo 12 horas sob agitação. O precipitado separado por centrifugação foi desprezado, e o sobrenadante precipitado com três volumes de etanol 95 °GL. Após centrifugação o precipitado foi lavado com ácido acético a 2% em etanol e centrifugado. O precipitado foi dialisado e liofilizado (Fração A: GPR-A e GPI-A).

Ao Sobrenadante I foi adicionado 1/2 volume de ácido bórico 1% e o pH foi ajustado a 8,8 pela adição de NaOH 2N permanecendo 12 horas à temperatura ambiente. Esse material foi centrifugado e o Precipitado II foi lavado com borato de sódio 0,5% (pH 8,8). Submetido à centrifugação, o resíduo foi dissolvido em 50 mL de ácido acético a 2% contendo 1 g de acetato de sódio; essa mistura foi precipitada com 3 volumes de etanol 95 °GL. O precipitado formado foi coletado por centrifugação e lavado com ácido acético 2% em etanol, centrifugado e o precipitado finalmente lavado com etanol absoluto. Após centrifugação o precipitado foi dissolvido em água destilada, dialisado e liofilizado (Fração B: GPR-B e GPI-B).

O Sobrenadante II foi ajustado a pH 9,5 com NaOH 2N, permanecendo 12 horas. Após centrifugação, o Precipitado III foi dissolvido em ácido acético 2% contendo 1 g de acetato de sódio, e deixado 12 horas para precipitação em três volumes de etanol 95 °GL. Após centrifugação o precipitado foi lavado em ácido acético 2% em etanol, centrifugado e o precipitado lavado

finalmente com etanol absoluto. Após centrifugação o precipitado foi dialisado em água corrente e liofilizado (Fração C: GPR-C e GPI-C).

O Sobrenadante III foi precipitado em 3 volumes de etanol 95°GL, centrifugado e o precipitado dialisado e liofilizado (Fração D: GPR-D e GPI-D).

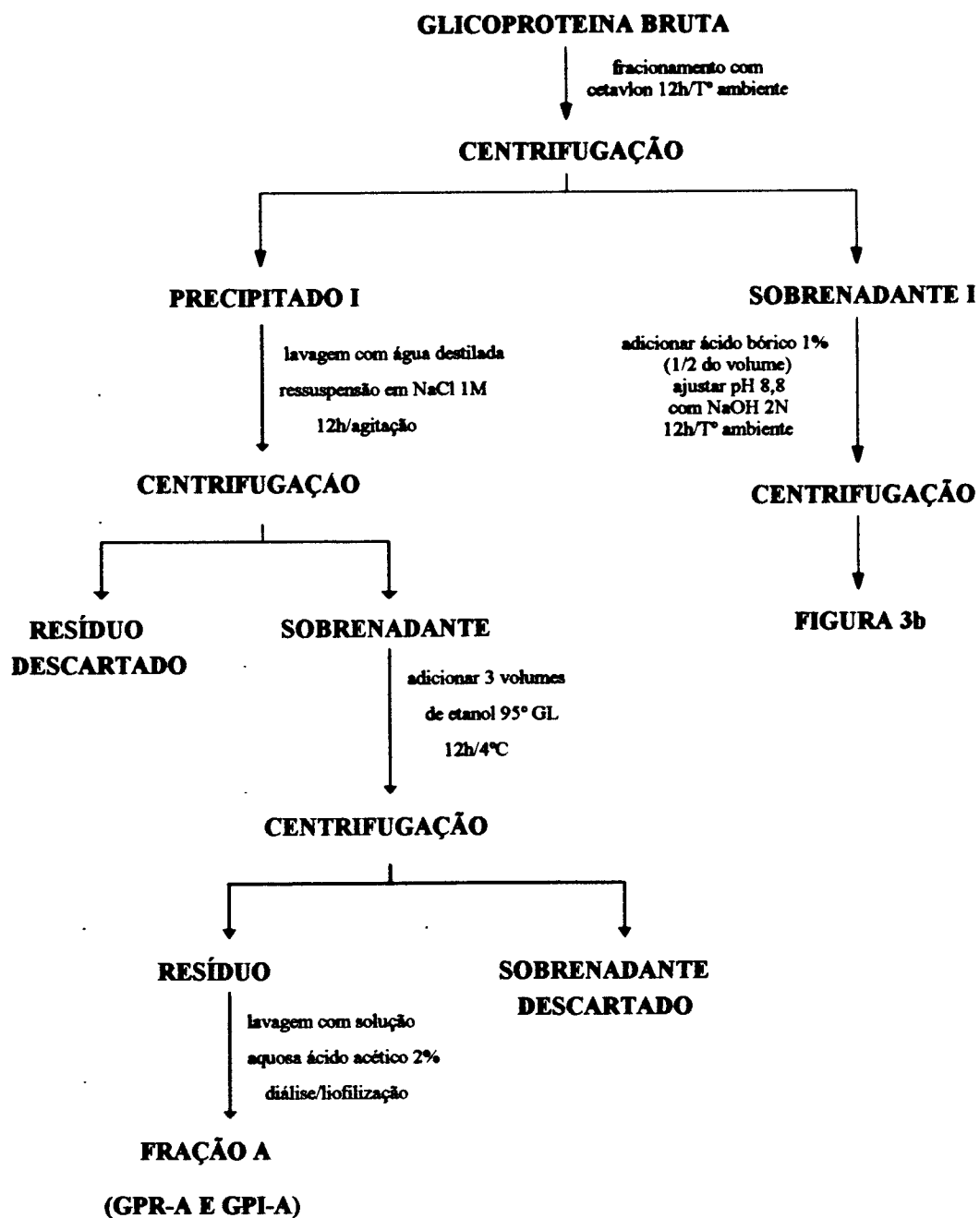


Figura 3a - Esquema de fracionamento da glicoproteína com Cetavlon (LLOYD, 1970)

FIGURA 3A

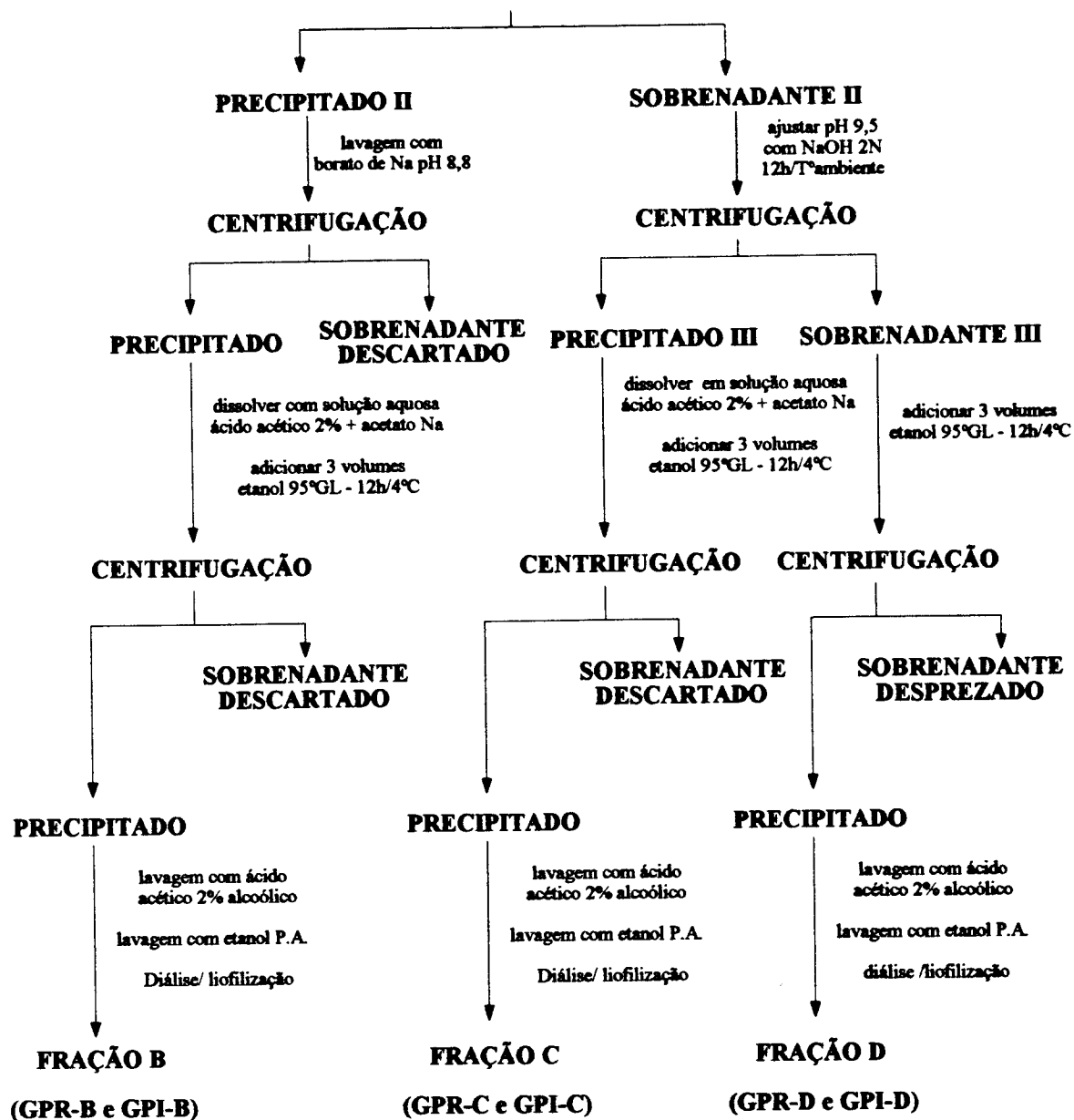


Figura 3b - Esquema de fracionamento da glicoproteína com Cetavlon (LLOYD, 1970)

3.5. Extração da manana, glucana álcali solúvel, glucana insolúvel e glucana ácido solúvel

O Precipitado A, obtido após a extração das glicoproteínas, foi submetido à extração para obtenção das frações de glucana e manana (Figura 2). Esse precipitado foi submetido a hidrólise alcalina com 150 mL de KOH 2% durante 2 horas a 100 °C, sob refluxo, conforme metodologia de BARRETO-BERGTER *et al.* (1981).

3.5.1. Extração dos polissacarídeos álcali solúveis

O Sobrenadante B (Manana Bruta), foi concentrado até 100 mL e precipitado em três volumes de etanol 95° GL, durante 12 horas a 4°C, após neutralização (pH 7,0) com ácido acético glacial e centrifugação. Após centrifugação o precipitado foi lavado com etanol absoluto, dialisado e liofilizado (Figura 2). Essa fração, que corresponde à manana bruta, foi purificada através de precipitação com solução de Fehling por 12 horas a 4°C (Figura 4). O precipitado foi dissolvido em água destilada e agitado juntamente com resina catiônica (Amberlite IR-120, [H⁺]). Após filtração em filtro de placa sinterizada (M), o filtrado foi precipitado em três volumes de metanol, permanecendo 12 horas a 4°C, sendo centrifugado e o precipitado dialisado e liofilizado (Frações MNR e MNI). O sobrenadante da centrifugação, após a precipitação das mananas com solução de Fehling, foi submetido a neutralização com ácido acético e centrifugação para separação de impurezas. Ao sobrenadante foram adicionados 3 volumes de etanol 95 °GL, mantendo-se em repouso por 12h a 4 °C, seguindo diálise e liofilização da fração de polissacarídeos denominada glucana álcali solúvel (Frações GALR e GALI).

3.5.2. Extração dos polissacarídeos álcali insolúveis

O Precipitado B álcali insolúvel - glucana insolúvel bruta (Figura 2) foi submetido à extração com ácido acético 0,5M a 100°C por 2 horas, sob refluxo (Figura 5). Após resfriamento e centrifugação, o resíduo insolúvel foi reextraído com ácido acético por seis vezes, nas mesmas condições descritas. O precipitado foi então dialisado e liofilizado. Esta fração corresponde à glucana insolúvel (GIR e GII). Todos os sobrenadantes ácidos foram combinados, neutralizados (pH 7) com NaOH 2N, concentrados à vácuo e precipitados em três volumes de etanol 95 °GL a 4 °C por 12 horas; centrifugado, o precipitado lavado com etanol P.A. e em seguida com éter, centrifugado e o precipitado liofilizado, de acordo com MANNERS *et al.* (1973a). Esta fração corresponde à glucana ácido solúvel (Frações GACR e GACI).

3.6. Determinação do rendimento das frações

As frações obtidas em todo o processo de fracionamento, realizado em triplicata, foram liofilizadas e pesadas em balança analítica para determinação do rendimento e acondicionadas a -18°C para posterior realização das análises.

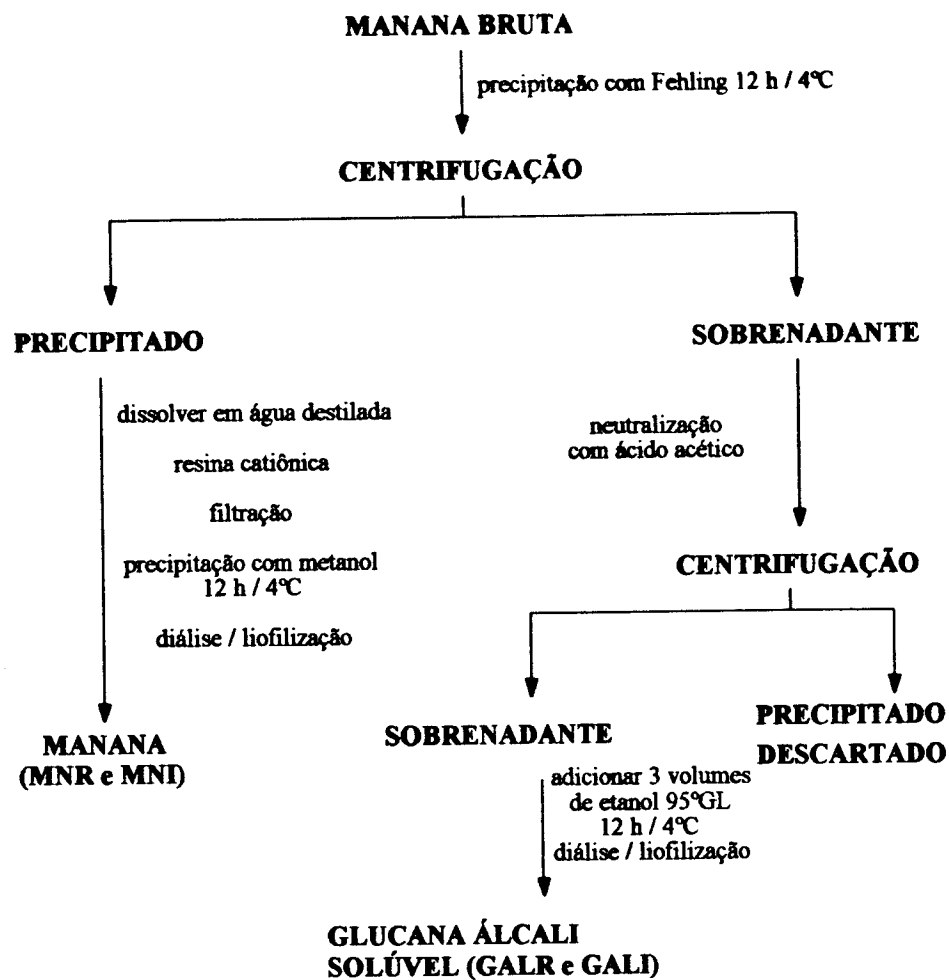


Figura 4 - Esquema de purificação de polissacarídeos álcali solúveis (BARRETO-BERGTER *et al.* (1981))

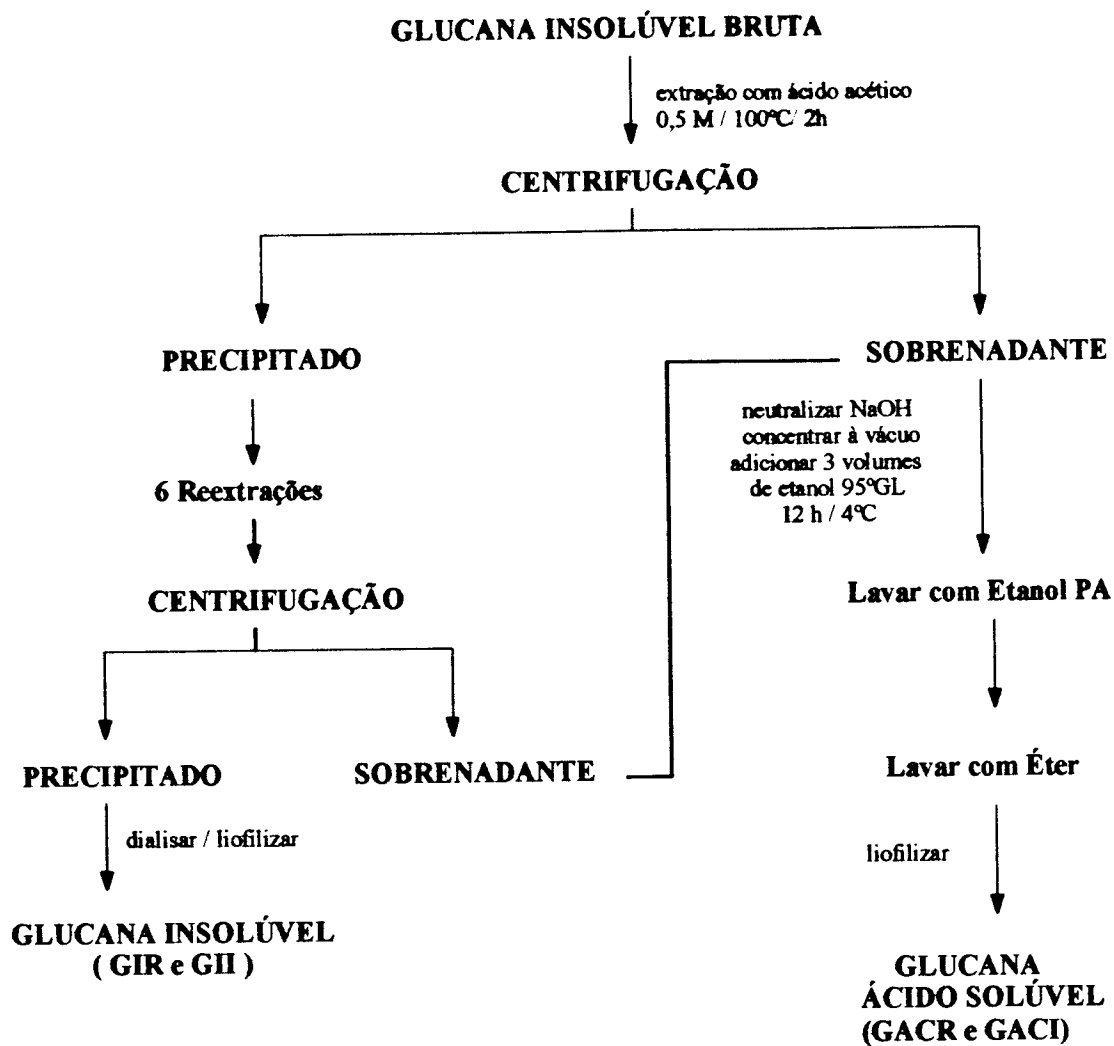


Figura 5 - Esquema da purificação dos polissacarídeos álcali insolúveis (MANNERS *et al.*, 1973a)

3.7. Métodos analíticos de caracterização geral

3.7.1. Umidade (AOAC, 1975) - A umidade foi determinada por gravimetria com emprego de estufa a 105 °C.

3.7.2. Cinzas (AOAC, 1975) - O teor de minerais foi obtido por incineração em mufla a 550 °C.

3.7.3 Lipídios totais (BLIGH & DYER, 1959) - Os lipídios polares e apolares foram determinados gravimetricamente após extração com uma mistura de solventes clorofórmio : metanol : água na proporção de 10:20:08.

3.7.4. Ácidos nucleicos (HEBERT *et al.*, 1971) - O teor de ácidos nucleicos na levedura e na parede celular bruta foi determinado por reação de orcinol para RNA. Após extração do RNA com ácido perclórico 0,05 M, a temperatura de 37 °C por 2 horas, o mesmo foi hidrolisado a 100 °C por 15 minutos, para liberação da ribose que irá complexar-se com o reagente de orcinol, resultando uma coloração esverdeada, medida por espectrometria (670 nm), utilizando como padrão uma curva realizada com RNA purificado de levedura (Sigma).

3.7.5. Carboidratos Totais (DUBOIS *et al.*, 1956) - Foram adicionados em tubo de ensaio 2 mL de uma solução de polissacarídeo (30 µg/mL); foram adicionados 0,05 mL de fenol 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação vigorosa e descanso de 10 minutos, essa mistura foi aquecida em banho-maria a 30 °C por 20 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS (PerKin-Elmer 139) a 480 nm. A manose foi utilizada como padrão, na faixa de 10 - 70 µg/mL.

3.7.6. Nitrogênio total e proteína (AOAC, 1975) - Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método de microkjeldahl, multiplicando o resultado pelo fator 6,25 para obter o conteúdo de proteína.

3.7.7. Fosfatos (AMES, 1966) - 50 µl de uma solução aquosa de polissacarídeo (1,5 mg/mL) foram adicionados a 30 µL de $Mg(NO_3)_2$. Esta mistura foi aquecida diretamente na chama do bico de bunsen, até evaporação total. O resíduo foi dissolvido em 600 µL de HCl 0,5 N e aquecido durante 15 minutos a 100 °C. Foram adicionados os seguintes reagentes, na proporção 1:6 (V/V), ácido ascórbico 10% e molibdato de amônio 0,42% em H_2SO_4 1 N, e os tubos deixados em repouso durante uma hora a 37 °C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 820 nm. Uma solução de Na_2HPO_4 numa faixa de concentração de 1,5 a 6,5 µg/mL de fosfato foi usada como padrão.

3.7.8. Hexosaminas (BELCHER *et al.*, 1954) - A amostra (1 g) com polissacarídeo foi hidrolisada com HCl 3 N durante 3,5 horas a 100 °C; a seguir a mesma foi evaporada até a secura. Em seguida a amostra foi ressuspensa com a adição de 2 mL de água destilada e adicionado 1 mL de acetil acetona. Esta mistura foi aquecida durante 10 minutos a 100 °C, resfriada, e adicionado 5 mL de etanol absoluto. A mistura foi submetida à temperatura de 75 °C durante 5 minutos, adicionando 1 mL de solução de p-dimetilamino benzaldeído, e novamente aquecida a 75 °C, por 30 minutos, com agitação ocasional. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 512 nm. A D-glucosamina em HCl foi usada como padrão na faixa de 10 - 100 µg/mL.

3.8. Caracterização dos polissacarídeos das frações da parede celular

3.8.1. Cromatografia em papel e líquido-gás dos monossacarídeos

Os monossacarídeos componentes das paredes brutas e das frações obtidas através dos processos de extração e purificação foram identificados após hidrólise ácida. Foram hidrolisadas 10 mg de cada amostra com H_2SO_4 0,5 M, por 18 horas a 100 °C, em ampola selada. O hidrolisado foi neutralizado com BaCO_3 e filtrado em filtro sinterizado (M). O filtrado foi submetido a agitação durante 2 horas com mistura de resinas de troca iônica Amberlite IR 120⁺ e Dowex 1x8 (OAC), filtrado novamente e evaporado à secura total (BARRETO-BERGTER *et al.*, 1980).

Cromatografia de papel (HOUGH & JONES, 1962) - Os hidrolisados acima foram resuspensos em pequeno volume de água destilada e uma alíquota de cada amostra aplicada em papel Whatman nº 1, usando como solvente n-butanol / etanol / água (40:11:19, V/V/V). Os açúcares foram revelados com solução saturada de AgNO_3 em acetona e NaOH 0.5 N em etanol (TREVELYAN & PROCTER, 1950). Soluções de manose, arabinose, galactose, ribose, ramnose e glicose a 2% foram usadas como padrão e os monossacarídeos foram identificados de acordo com seus valores de R_f, quando comparados aos padrões utilizados.

Cromatografia líquido-gás (SAWARDEKER *et al.*, 1965) - Os produtos de hidrólise dos polissacarídeos foram reduzidos com boroidreto de sódio (5 mg) por uma hora. O excesso de boroidreto foi então decomposto pela adição de ácido acético glacial e o borato removido através de lavagens com metanol. O resíduo foi acetilado com anidrido acético : piridina (1 :1, V/V) a 100 °C por 1 hora. A extração dos alditóis-acetato foi feita com clorofórmio, sendo lavado várias vezes com água destilada, concentrado em evaporador rotativo e evaporado à secura em fluxo de N₂. Os alditóis-acetato foram analisados por cromatografia líquido-gás acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM), utilizando coluna capilar de sílica fundida OV-225 (30 m x 0,25 mm d.i.) e temperatura programada de 50 - 220°C, 50 °C/min. Os açúcares foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos seguintes derivados acetilados: eritritol, fucitol, ribitol, xilitol, manitol, galactitol e glucitol.

3.8.2. Espectrometria de Infravermelho - Os espectros de absorção na região de infravermelho (IV), em pastilhas de KBr, foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier. Como referência foi utilizada a absorção em 1601 cm⁻¹ de um filme de poliestireno.

3.8.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 - Os espectros de RMN ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker AC 300/P (75,47 MHz), em tubo de 10 mm de diâmetro, a 70°C (343K), utilizando como solvente óxido de deutério (D₂O) e/ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram registrados em ppm, sendo utilizado como padrão interno/externo tetrametilsilano (TMS, δ = 0,0). Em alguns casos, para interpretação dos dados de RMN ¹³C foi realizada a técnica DEPT 135°, onde: CH₃/CH = sinal positivo e CH₂ = sinal negativo e DEPT

90°, onde só aparecem os sinais de CH (positivos) (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

3.8.4. Análise de Aminoácidos - Os aminoácidos da levedura foram analisados em auto-analisador com coluna de troca iônica e derivatização pós coluna com ninidrina. As amostras foram hidrolisadas com LiOH 4 N para quantificação de triptofano, por 24 horas à temperatura de 110 °C, e com HCl 6 N para os demais aminoácidos, à mesma temperatura por 22 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização e Composição da levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*)

A levedura utilizada foi confirmada como pertencente à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pelo Laboratório de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP.

Essa levedura teve sua composição química avaliada através da análise de nitrogênio total, proteína, RNA, carboidratos totais, lipídios e cinzas. Essa composição pode ser vista na Tabela 1.

Em base seca, o teor de proteína e carboidratos, as duas maiores frações, atingiram 49,96 e 32,86%, respectivamente; ou seja, 82,82 % da massa celular. Os demais componentes apresentaram: cinzas 8,33%, RNA 7,52% e lipídios 3,44%.

Tabela 1 - Composição da levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) liofilizada

Composição %	<i>S. cerevisiae</i>	Referências	
		(a)	(b)
Proteína(Nx6,25)	49,96	49,80	45-49
RNA	7,52	8,40	8-12
Carboidratos	32,86	nd	26-27
Cinzas	8,33	5,1	5-10
Lipídios	3,44	1,91	4-7

(a) Levedura de cervejaria, *S. cerevisiae*; FARNUN & CLELAND (1975).

(b) Levedura de diversas espécies; GUZMAN-JUAREZ (1983).

4.2. Otimização do processo de rompimento mecânico da parede celular da levedura

A ruptura celular visa a obtenção da parede celular, possibilitando a separação do conteúdo citoplasmático. A ruptura mecânica foi escolhida por preservar ao máximo os componentes bioativos, lembrando que a viabilidade do processo pressupõe a recuperação de vários componentes celulares, além da parede, como proteínas, enzimas e outros.

Os experimentos tiveram por objetivo otimizar e avaliar o grau de rompimento das células. Assim, foram testadas velocidades de rotação do moinho, concentração da suspensão de células e seu fluxo. Quanto maior o índice de rompimento, melhor a pureza da fração de parede celular.

O primeiro experimento (Tabela 2) envolveu a operação com suspensão de células de leveduras a 25% (base úmida), fluxo de 2,4 L/h e duas variáveis: a velocidade do rotor da câmara de moagem, em três níveis (1910, 2400 e 3340 rpm), e o reciclo da suspensão de células no moinho (duas reciclagens).

As amostras de suspensão de levedura integral (SLI) e de sobrenadantes, obtidos por centrifugação após cada moagem, foram avaliados para matéria seca, N total e proteína; foram calculadas as recuperações de N nos sobrenadantes em relação à SLI, expressando o rendimento do rompimento.

Pelos resultados observou-se que as condições de concentração e fluxo da suspensão, proporcionaram a obtenção de elevados índices de rompimento, independentemente das velocidades e da reciclagem da suspensão. Ou seja, nestas condições, o rompimento foi praticamente máximo já na primeira moagem. Outrossim, a reciclagem traz o inconveniente de aumentar a energia de dissipação na câmara de desintegração, causada pelo atrito entre as células e consequentemente representando maior risco de desnaturação. Esses dados

concordam com GAVER & HUYGHEBAERT (1990), que trabalharam com um moinho em escala laboratorial semelhante ao *Dyno-Mill*, o *CoBall-Mill*, onde o grau de rotação do rotor não provocou influência no grau de ruptura, nas velocidades estudadas.

Considerando os resultados (Tabela 2), a velocidade de 1910 rpm forneceu energia suficiente para um rompimento máximo. Para a realização de outro experimento foi eleita a velocidade intermediária de 2400 rpm, com o objetivo de procurar condições de otimização de processamento, ou seja, foram comparadas suspensões com 25 e 40% (V/V) de células em base úmida e fluxos de 2,4 e 4,8 L/h e reciclagem da suspensão. Os resultados (Tabela 3) mostram que na velocidade de 2.400 rpm o rompimento foi maior com o fluxo mais elevado de 4,8 L/h na suspensão com 40% de células. Em vista dos resultados foram eleitas as seguintes condições para se proceder ao preparo de suspensão de células rompidas: concentração de 40% (V/V) de células em base úmida (equivalente a 8% de sólidos secos), velocidade de 2.400 rpm, fluxo de 4,8 L/h e sem reciclo da suspensão no moinho.

Os resultados obtidos com 40% de células em suspensão, velocidade do moinho de 2.400 rpm e com duas reciclagens no moinho estão na Tabela 3. Dentre os trabalhos com proteínas de organismos unicelulares que utilizam o rompimento celular com *Dyno-mill*, encontra-se o de HUANG & KINSELLA (1986), que utilizando uma suspensão com 5% de sólidos secos e fluxo de 6 L/h, obtiveram uma ruptura superior a 95% com uma única passagem pelo equipamento.

Os resultados obtidos são concordantes com trabalhos citados na literatura, que operaram com diferentes equipamentos de ruptura mecânica como o *Dyno mill*, *Perlmill* e *Mixer-mill*, mas com o mesmo princípio de moagem. Rendimentos de extração de proteína superiores a 90% foram obtidos por HUMMEL & KULA (1989), HENDENSKOG & EBBIGHAUS (1972) e FARNUM & CLELAND (1975). ARRIOLA *et al.* (1989) conseguiram 97% de ruptura das paredes de células de levedura empregando um desintegrador de laboratório

com bolas de vidro com diâmetro de 0,3 a 0,5mm, por um tempo de 27 minutos e pH 9,0.

Tabela 2 - Resultados da avaliação do rendimento do rompimento da parede celular da suspensão de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) em *Dyno-Mill*, com concentração de 25% (V/V) de células em base úmida, fluxo de 2,4 L/h e diferentes velocidades e reciclagens da suspensão.

AMOSTRA	VELOCIDADE (rpm)	Mat. Seca (%)	N Total (%)	Proteína (%)	Rend. Rompi- mento (%)
SLI	1910	5,06	8,08	50,50	
Sobren.1ª moagem		5,29	6,48	40,50	80
Sobren.2ª moagem		5,08	6,58	41,12	81
Sobren.3ª moagem		5,27	6,59	41,19	82
SLI	2400	5,05	8,16	51,00	
Sobren.1ª moagem		4,94	6,74	42,12	83
Sobren.2ª moagem		4,81	6,74	42,12	83
Sobren.3ª moagem		4,78	6,69	41,81	82
SLI	3340	5,22	8,13	50,81	
Sobren.1ª moagem		5,14	6,62	41,38	81
Sobren.2ª moagem		5,13	6,64	41,50	82
Sobren.3ª moagem		5,00	6,71	41,94	83

SLI: Suspensão de levedura íntegra 25%(V/V) em base úmida (antes do rompimento).

Tabela 3 - Resultados da avaliação do rendimento do rompimento da parede celular, da suspensão de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) em *Dyno-Mill*, na velocidade de 2.400 rpm, concentração de 25% e 40%(V/V) de células em base úmida, fluxos de 2,4 e 4,8 L/h e reciclagens da suspensão.

AMOSTRA	FLUXO (L/h)	Mat. Seca (%)	N Total (%)	Proteína (%)	Rend. Rompimento (%)
SLI 25%		5,05	8,16	51,00	
Sobren. 1ªmoagem	2,4	4,94	6,74	42,13	83
Sobren. 2ªmoagem	2,4	4,81	6,74	42,13	83
SLI 25%		5,42	7,69	48,05	
Sobren. 1ªmoagem	4,8	4,91	6,99	43,68	91
Sobren. 2ªmoagem	4,8	4,85	7,40	46,25	96
SLI 40%		8,15	8,21	51,31	
Sobren. 1ªmoagem	2,4	7,86	7,48	46,75	91
Sobren. 2ªmoagem	2,4	7,56	8,85	49,06	96
SLI 40%		8,56	8,38	52,35	
Sobren. 1ªmoagem	4,8	7,81	8,03	50,19	96
Sobren. 2ªmoagem	4,8	7,56	8,18	51,13	98

SLI: Suspensão de levedura íntegra (antes do rompimento).

4.3. Rendimento e composição da parede celular

Através do rompimento das células em moinho *Dyno-Mill*, o rendimento de parede celular em base seca foi de 30% do peso total da célula. Segundo AL-BASSAM *et al.* (1986), a parede celular seca representa cerca de 25% do peso total da célula de levedura. JACOB (1992) cita dados de autores segundo os quais a parede celular de *S. cerevisiae* varia entre 25 a 30% do peso seco total da célula.

A composição da parede celular rompida (PBR) e industrial (PBI), é apresentada na Tabela 4. O teor de carboidratos (58 e 65%), e de proteínas (28 e 15%), juntos representam cerca de 80 e 75% da massa da parede, respectivamente.

Observando os resultados da Tabela 4, verifica-se que o teor de proteínas na PBI é significativamente menor em relação à PBR; o mesmo ocorre com a fração de glicoproteína, conforme a Tabela 5 apresentada no item a seguir. Uma possível explicação desse resultado é que o processo de rompimento mecânico não é totalmente eficiente, o que permite a inclusão de células inteiras junto com a parede celular bruta; essas células contribuem para a presença de maior quantidade de proteína na PBR. A autólise, com condições favoráveis e drásticas para o rompimento (temperatura e pH mais elevados), conduz a um material de parede celular com menos contaminantes. O teor de proteína da parede celular de levedura de cervejaria varia de 10 a 25% segundo MACWILLIAM (1970). Outra explicação para esta diferença é que a PBR separada por centrifugação não sofre lavagem para eliminar proteína contaminante. Essa lavagem, por outro lado, também eliminaria uma percentagem das frações mais solúveis de polissacarídeos, como a glicoproteína; no item a seguir, este fato é comentado e confirmado.

No processamento industrial a parede celular separada é submetida a lavagem para extração de proteínas solúveis residuais; essa lavagem também arrasta outros componentes solúveis, como é o caso da glicoproteína.

O resultado inferior para proteínas na PBI, ocasiona um aumento relativo no teor dos demais componentes.

A presença de RNA na parede celular (3,53 e 3,03%, na PBR e PBI, respectivamente) indica a persistência de ácidos nucleicos da levedura, mostrando a necessidade de lavagem desse material para eliminação de contaminantes, nas fases seguintes de purificação. REUVERS *et al.* (1969) também relacionou o teor inferior a 0,5% de ácidos nucleicos com um elevado grau de pureza das frações, em *Saccharomyces fragilis*. Em relação aos lipídios foram encontrados valores de 5,28 e 4,11% nas paredes PBR e PBI, respectivamente. O teor de lipídios da parede celular de levedura de cervejaria varia de 3 a 10% segundo MACWILLIAM (1970). Na opinião de ROSE (1993), durante o isolamento da parede podem ser recuperados fragmentos de membrana celular que estavam ligados à parte interna da parede, o que justifica a presença de lipídios contaminantes na mesma. A presença de membrana pode explicar o alto teor em lipídios nas frações de parede bruta.

O teor de cinzas apresentou-se com 4,8 e 4,3%, na PBR e PBI, respectivamente, valores esses menores em relação à célula total da levedura, provavelmente por serem componentes solúveis e se concentrar em fase aquosa.

Considerando, em média, que a parede celular representa 30% em peso da célula, e que o seu teor de carboidratos é de 60%, a quantidade de carboidratos em peso é de 18% da biomassa celular seca. Numa biomassa úmida com 70% de umidade, esse teor seria de 5,4%.

Tabela 4 - Composição média (%) da parede bruta (PBR) liofilizada de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) rompida em moinho *Dyno-Mill* e da parede celular residual (PBI) seca do processo industrial de autólise da levedura.

Análise	PBR % peso	PBI % peso
N Total	4,70	2,49
Proteína (N Tot.x 6.25)	28,64	15,57
RNA	3,53	3,03
Carboidrato total	58,40	65,34
Lipídeo	5,28	4,11
Cinzas	4,80	4,33
Fosfato	2,97	2,81
Hexosamina	0,25	0,41

4.4. Rendimento e Composição Centesimal das Frações de Polissacarídeos da Parede Celular.

As frações obtidas a partir do processo de fracionamento (Figuras 2, 4 e 5) foram avaliadas segundo seu rendimento em peso (Tabela 5) e composição centesimal (Tabela 6). Um resumo do fracionamento e características das frações obtidas é apresentado na Tabela 7, com uma visão global e sequencial da separação das frações.

Do processo de fracionamento para obtenção de frações brutas (não purificadas), glicoproteína e glucana insolúvel podem ser obtidas em 6-7 etapas, a manana em 10. A glucana álcali solúvel e a glucana ácido solúvel são

obtidas no processo de purificação da manana e glucana insolúvel, respectivamente.

Como se observa na Tabela 5, as três primeiras frações são as de maior rendimento em massa, a partir da parede rompida ou industrial: glucana insolúvel com 59 e 64%; glicoproteína com 17 e 12% e manana com 7 e 8%, respectivamente. Esses três componentes perfazem em ambos os materiais, 83% da massa da parede celular, aproximadamente.

A literatura traz poucas referências à quantidade e proporção de frações de polissacarídeos na parede celular de *S. cerevisiae*. Além disso, três aspectos se destacam: a) são referências da década de 50 e 60; b) são analisadas células cultivadas em meio sintético de laboratório, em condições ótimas de crescimento; c) os dados referem-se exclusivamente a duas frações com denominação de glucana e manana.

MACWILLIAM (1970) relata que glucanas representam 30 a 45% do peso seco da parede celular de leveduras de cervejaria; e as mananas representam também 30 a 45%. Cita ainda que o valor médio para cada uma dessas frações é de 40%. ROSE (1993) também cita que 60 a 90% da parede celular é composta por polissacarídeos. MILLER & PHAFF (1958) e outros autores citam publicações de Northcote & Horne (1952) e Northcote (1954) apresentando dados de *S. cerevisiae*, com 29% de glucana e 31% de manana na parede celular.

Assim, em resumo, a literatura aponta para a existência de glucanas e mananas em proporções praticamente iguais na parede celular de *S. cerevisiae* e com teor total entre 60 a 90%.

Os resultados obtidos (Tabela 5) mostram a parede celular de células rompidas mecanicamente (PBR) composta por cerca de 85% de polissacarídeos, destacando-se cerca de 60% de glucana insolúvel, 7% de manana e 17% de glicoproteína; a soma destas duas últimas frações daria cerca de 24% de frações com mananas. Para a parede celular residual do processo de

autólise (PBI), os dados são similares, apenas com menor teor em glicoproteína, de cerca de 12%; com um total de frações com mananas de 20%. Deste modo, os dados obtidos mostram clara alteração na proporção de polissacarídeos, em relação à literatura, embora a quantidade de parede celular tenha sido de 30% em relação ao peso seco da célula, o que está entre os valores mais elevados relatados na literatura. A alteração na proporção possivelmente seja atribuída às células de *S. cerevisiae* utilizadas serem provenientes de processo industrial de fabricação de cerveja, ou seja, das condições de crescimento da levedura, onde são submetidas à presença de etanol e atividade fermentativa intensa por vários ciclos.

Tabela 5 - Rendimento (%) das frações extraídas da parede celular de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*), a partir da parede bruta de células rompidas em *Dyno-Mill* (PBR) e da parede celular subproduto de processo de autólise industrial (PBI).

FRAÇÃO	PBR % peso	PBI % peso
Glicoproteína	16.7	11.9
Manana	7.1	7.8
Glucana álcali solúvel	0.8	1.0
Glucana insolúvel	59.2	63.8
Glucana ácido solúvel	1.8	2.2
Total	85.6	86.7

Alguns componentes das frações da PBR e PBI são apresentados na Tabela 6. A glucana insolúvel apresentou teor de carboidratos de 82 e 79%, respectivamente para GIR e GII, na manana o teor foi de 91 e 93%, respectivamente para MNR e MNI. Na glicoproteína o teor de carboidratos foi de 71 e 83%, para GPR e GPI, respectivamente. As frações minoritárias o teor de carboidratos foi de 92 e 89% na glucana álcali solúvel (GALR e GALI, respectivamente) e 94 e 89% na glucana ácido solúvel (GACR e GACI, respectivamente). De acordo com esses resultados, observa-se que os valores referentes a carboidratos são praticamente similares entre as frações correspondentes (extraídas da parede obtida pelo processo mecânico e da parede resíduo industrial), com exceção da glicoproteína.

A fração de glicoproteína apresenta maior teor de proteínas que as demais, com 23% para a rompida (GPR) e 13% para a industrial (GPI), valores bastante diferentes, provavelmente ocasionado pelas lavagens da parede residual da autólise. Nas demais frações para ambas as paredes (rompida e industrial), os teores de proteínas variam entre 3 e 11%.

Também se destaca o teor de fosfatos das frações de glicoproteína, com 1,7 e 2,2% para GPR e GPI, respectivamente. Alguns pesquisadores relatam a presença de fosfatos nas regiões externas da parede celular e sua relação com a forma como estas células são atraídas e unidas a outras superfícies (REISS *et al.*, 1992), o que apresenta certa coerência com os resultados encontrados, uma vez que a glicoproteína é um componente de superfície.

De acordo com os resultados da Tabela 6, foram encontrados traços de hexosaminas em quase todas as frações da parede celular, com variações de 0,01 a 0,58%. O teor de hexosamina determina o teor de quitina, que segundo HALÁSZ & LÁSTITY (1991) é um polímero de ligações β (1 $\rightarrow$ 4) de *N*-acetilglucosamina. De acordo com VUKOVIC *et al.* (1994) a parede celular contém cerca de 2 - 3% de quitina, relacionada com a formação de cicatrizes resultantes da gemulação no processo reprodutivo da levedura.

Na tabela 8 são apresentados os resultados da análise de aminoácidos da célula de levedura e da glicoproteína, frações GPR e GPI. Em relação à glicoproteína, foi possível observar que a serina e treonina apresentaram valores altos, em relação ao seu teor na célula intacta, o que, de acordo com LLOYD (1970), é atribuído ao grande número de carboidratos de cadeia curta ligados aos resíduos peptídicos. Ainda, segundo esse mesmo autor, também é característica a alta proporção de ácido aspártico e glutâmico, assim como a escassez ou ausência de cisteína e metionina, na glicoproteína.

Tabela 6 - Composição média (%) das frações extraídas da parede celular de levedura *S. cerevisiae* obtida por rompimento celular em *Dyno-Mill* (PBR) e da parede celular subproduto de processo de autólise industrial (PBI).

Análises	Glicoproteína		Manana		Glucana			Glucana		
	GPR	GPI	MNR	MNI	GALR	GALI	GIR	GII	GACR	GACI
N Total	3,76	2,14	1,08	1,24	0,83	0,63	1,08	1,09	0,49	0,40
Proteína	23,50	13,34	6,75	7,73	5,19	3,94	6,75	11,87	3,06	2,50
Carboidr. Tot.	71,09	83,29	91,03	93,49	92,43	89,26	82,52	79,23	94,40	88,73
Fosfato	1,70	2,20	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,34	0,34
Hexosamina	0,18	0,11	0,37	0,58	0,00	0,30	0,19	0,43	0,35	0,01

Tabela 7 - Fracionamento dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae* e características das frações.

FRACIONAMENTO	FRAÇÃO OBTIDA	CARACTERÍSTICA
1. Água (tampão fosfato pH 7,2) 120°C	Glicoproteína Bruta GP	Solúvel em água
Cetavlon 20°C	Fração A GP-A	Insolúvel Cetavlon
Complexação com boro pH 8,8 20°C	Fração B GP-B	Solúvel Cetavlon Complexada boro
NaOH pH 9,5 20°C	Fração C GP-C	Não complexado boro Insolúvel em álcali
	Fração D GP-D	Solúvel em álcali
2. Álcali (KOH 2%) 100°C	Manana Bruta	Solúvel em álcali
Complexação cobre 4°C	Manana MN	Complexada cobre
	Glucana Álcali Sol. GAL	Não complexada cobre
	Glucana Insolúvel Bruta	Insolúvel em álcali
Ácido acético 0,5M 100°C	Glucana Insolúvel GI	Insolúvel em ácido
	Glucana ácido sol GAC	Solúvel em ácido

Tabela 8 - Composição de aminoácidos da célula de levedura (*S. cerevisiae*) e da glicoproteína extraída da parede celular de levedura rompida em *Dyno-Mill* e da parede celular subproduto de processo de autólise industrial (g aminoácido/ 100g de proteína).

Aminoácido	<i>S. cerevisiae</i> de cervejaria	GPR ^a	GPI ^b	REFERÊNCIA ^c
Triptofano	1,52	0,33	0,79	nd
Lisina	6,78	9,60	8,16	2,5
Histidina	2,24	2,28	1,94	traços
Arginina	3,98	4,42	3,75	traços
Ácido Aspártico	11,61	12,75	10,76	9,9
Treonina	4,66	9,75	8,22	28,5
Serina	4,63	11,08	7,54	14,6
Ácido Glutâmico	11,03	15,83	13,89	9,9
Prolina	4,08	4,21	3,94	7,8
Glicina	4,93	8,06	6,42	4,8
Alanina	7,07	0,08	7,25	9,0
Cistina	0,34	0,36	5,14	0,0
Metionina	2,27	0,64	1,29	0,0
Valina	6,20	7,62	8,59	6,1
Isoleucina	5,64	3,60	0,79	2,1
Tirosina	4,68	2,79	2,96	1,3
Fenilalanina	5,30	2,14	3,06	1,3
Leucina	8,84	4,42	5,50	2,2

^a GPR- Glicoproteína da parede celular da levedura rompida em *Dyno-Mill*.

^b GPI- Glicoproteína da parede celular subproduto de processo de autólise industrial.

^c Valores citados por LLOYD (1970): glicoproteína de *S. cerevisiae*.

Subfracionamento da glicoproteína

A fração de glicoproteína foi submetida a fracionamento com Cetavlon (Figura 3a e 3b), separando-se quatro frações: A, B, C e D. Essas frações foram avaliadas segundo seu rendimento em peso e composição química (Tabela 9).

LLOYD (1970) também realizou subfracionamento da glicoproteína da levedura *Cladosporium wernneckii*. Os rendimentos de cada fração foram muito semelhantes aos obtidos, mostrando que a fração B pode representar, em geral, cerca de 50% em peso.

A fração B, que segundo LLOYD (1970) corresponde às peptidiomananas, em *S. cerevisiae*, aparece em maior proporção, atingindo 56 e 44% da glicoproteína da PBR e PBI, respectivamente; em relação à parede celular, essa fração representa cerca de 9,5 e 7,5% (Tabela 9).

Tanto para a PBR como para a PBI, a fração A é a mais rica em proteína, com valores ao redor de 20% em média; a fração D é a de menor teor em proteína, com média de 6,8%. As frações B e C apresentam valores entre 10-15% mais elevados que a determinação através do nitrogênio total multiplicado pelo fator 6,25.

Os fosfatos estão presentes em pequena quantidade, praticamente, apenas nas frações A e D e ausentes na B e C em ambas amostras. Os resultados de LLOYD (1970) mostram que os fosfatos estão presentes nas frações A, B e D e muito pouco na C.

As hexosaminas estão ausentes na fração A. Na fração B, na PBR e a PBI, apresentaram valores similares de 0,87 e 0,65%, respectivamente. Nas frações C e D ocorreram variações nos resultados, cuja causa ainda não permite hipóteses.

Todas as frações apresentam teores de carboidratos de 75 a 90%, aproximadamente. Apenas a fração B apresentou uma variação mais ampla entre a GBR e a GPI, com valores de cerca de 77 e 89%, respectivamente.

Tabela 9 - Análise e rendimento das subfrações extraídas das glicoproteínas da parede celular de levedura *S. cerevisiae* pelo fracionamento com Cetavlon.

Análises	Fração A		Fração B		Fração C		Fração D	
	(%)		(%)		(%)		(%)	
	GPR	GPI	GPR	GPI	GPR	GPI	GPR	GPI
N Total	3,50	3,10	2,10	2,02	1,90	1,60	1,10	1,08
Proteína	21,87	19,37	13,12	12,62	11,12	10,00	6,87	6,75
Carboidr. Tot.	74,36	79,03	76,68	89,09	81,54	86,96	90,61	88,94
Fosfato	1,35	2,85	0,00	0,90	0,00	0,00	0,08	1,02
Hexosamina	0,00	0,00	0,87	0,65	1,35	0,00	0,43	0,90
Rend/ glicoprot.	1,25	2,72	56,30	44,20	10,50	12,00	10,60	12,67
Rend/ parede	0,21	0,46	9,43	7,40	1,76	2,01	1,78	2,12

GPR- Glicoproteína da parede celular da levedura rompida em *Dyno-Mill*.

GPI - Glicoproteína da parede celular subproduto de processo de autólise industrial.

4.5. Caracterização Analítica das Frações dos polissacarídeos da Parede Celular

Para o estudo em nível de estrutura química dos polissacarídeos provenientes da parede celular de *S. cerevisiae*, as amostras em estudo foram analisadas por CG-EM, espectrometria de infravermelho e de RMN ^{13}C .

4.5.1. Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas

As análises por CG-EM forneceram a porcentagem relativa molar das unidades monossacarídicas de cada amostra. Para realização desta análise os polissacarídeos foram hidrolisados com ácido sulfúrico, os monossacarídeos obtidos foram reduzidos com boroidreto de sódio, os produtos foram acetilados com anidrido acético em piridina, fornecendo assim os alditóis acetatos que foram analisados por CG-EM. Nesta análise os monossacarídeos foram identificados pela comparação com os tempos de retenção e espectros de massas dos seguintes padrões: eritritol, fucitol, ribitol, xilitol, manitol, galactitol e glucitol. Estes alditóis são correspondentes aos monossacarídeos eritrose (ERIT), fucose (FUC), ribose (RIB), xilose (XIL), manose (MAN), galactose (GALAC) e glucose (GLC), respectivamente. Na figura 6(a) é apresentado o cromatograma da mistura de padrões alditóis acetatos e nas Figuras 6(b) e 6(c) os espectros de massas de cada um dos alditóis acetatos.

PADRÃO

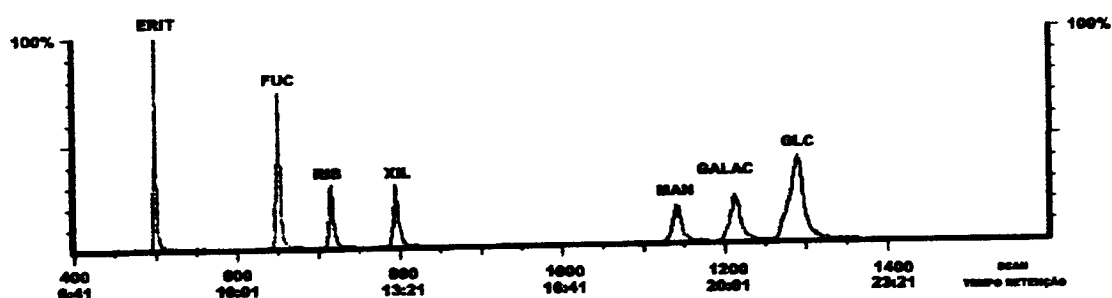
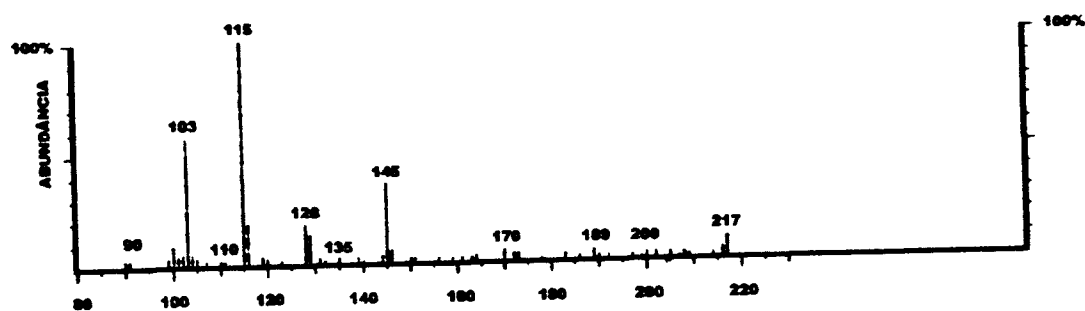
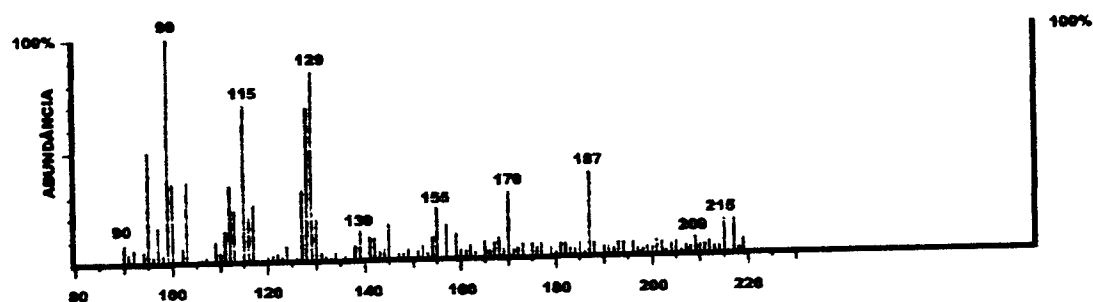


Figura 6(a) - Cromatograma da mistura de padrões alditóis acetatos dos monossacarídeos: eritrose, fucose, ribose, xilose, manose, galactose e glucose.

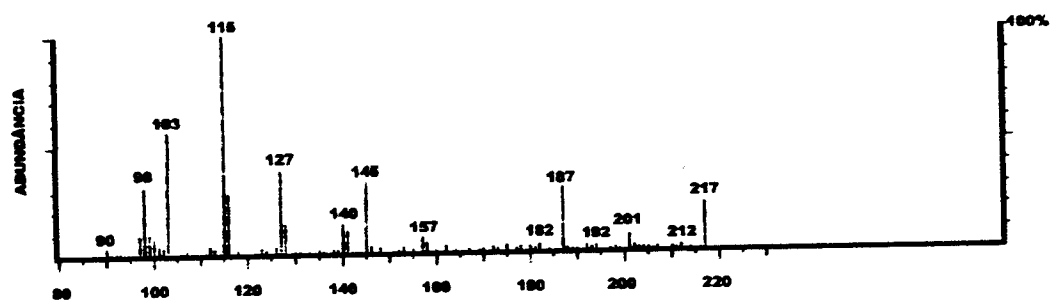
ERITRITOL



FUCITOL



RIBITOL

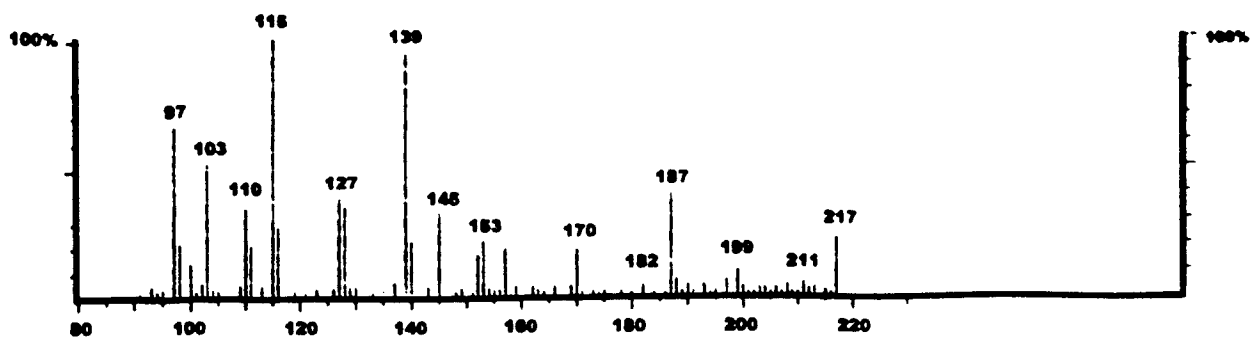


XILITOL

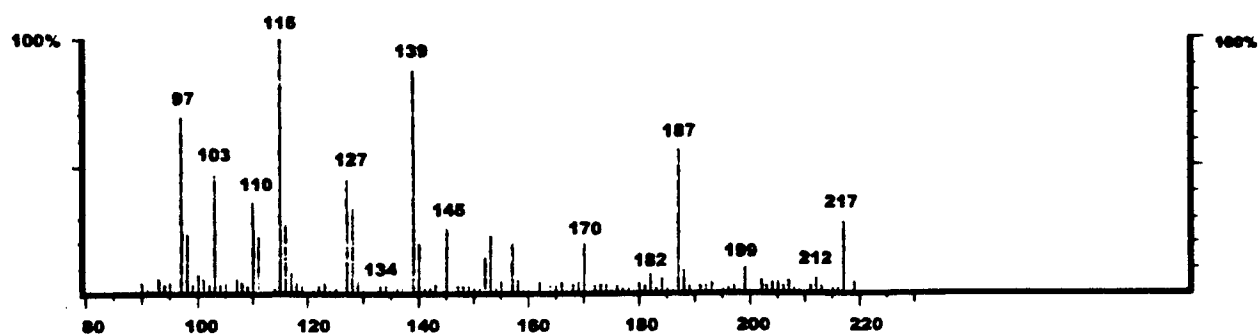


Figura 6(b) - Espectros de massas dos padrões eritritol, fucitol, ribitol e xilitol.

MANITOL



GALACTITOL



GLUCITOL

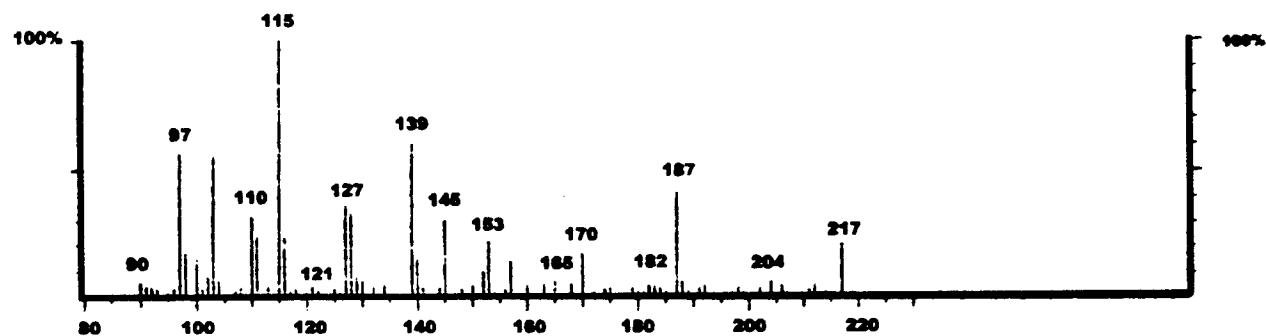
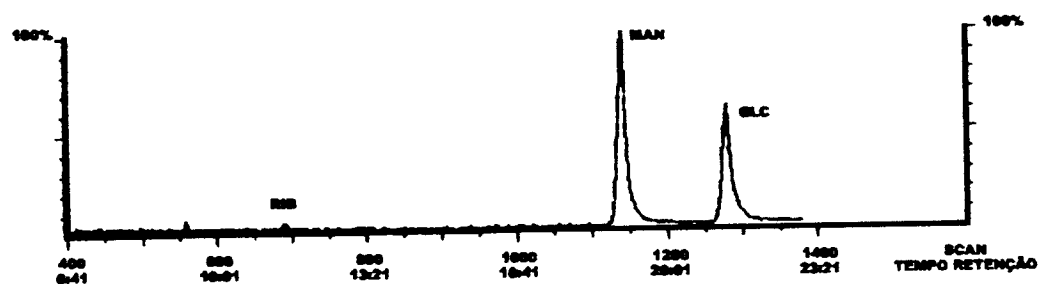


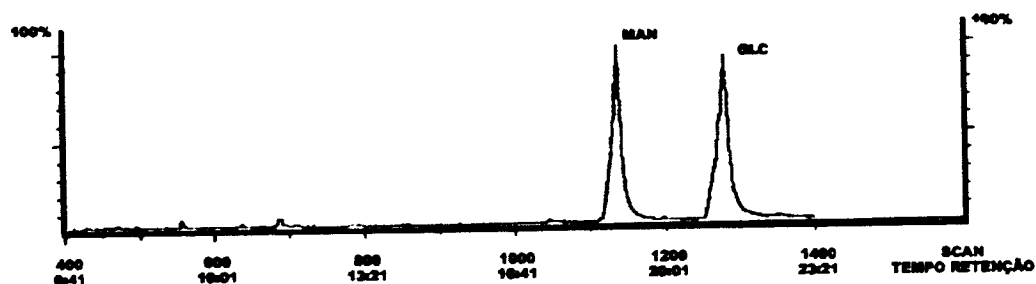
Figura 6(c) - Espectros de massas dos padrões manitol, galactitol e glucitol.

Através dos parâmetros de tempo de retenção e espectro de massas dos padrões apresentados nas figuras 6(a), 6(b) e 6(c), foi conduzida a identificação dos monossacarídeos das diferentes amostras e frações da parede celular de *S. cerevisiae*. Os cromatogramas das diferentes amostras e frações de parede celular de *S. cerevisiae* são apresentados nas Figuras 7(a), 7(b), 7(c) 7(d) e 7(e).

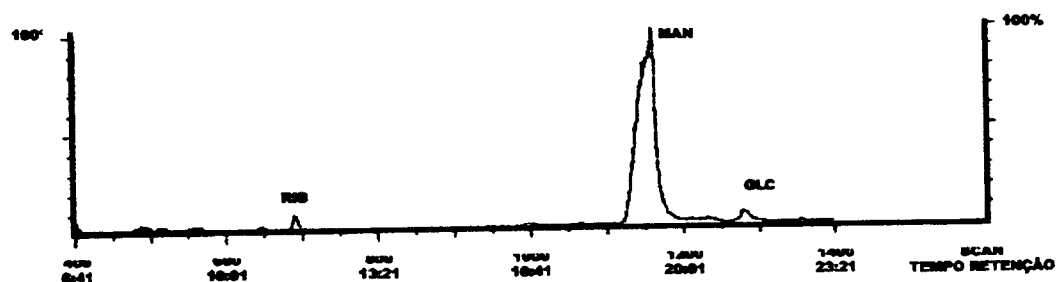
PBR



PBI



GPR



GPI

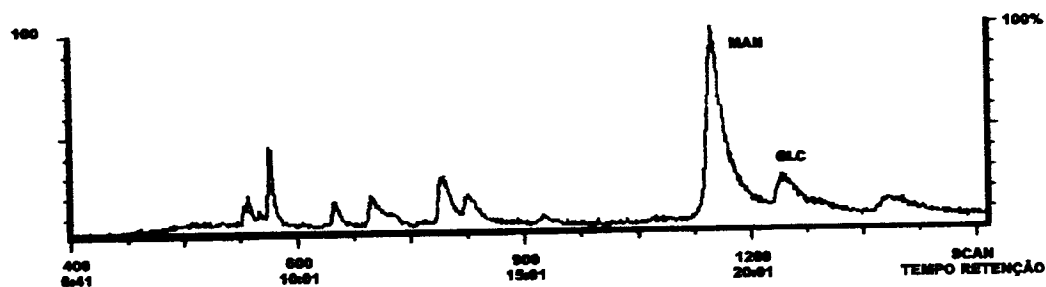


Figura 7(a) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos: ribose manose e glucose, das frações PBR, PBI, GPR e GPI, da parede celular de *S. cerevisiae*.

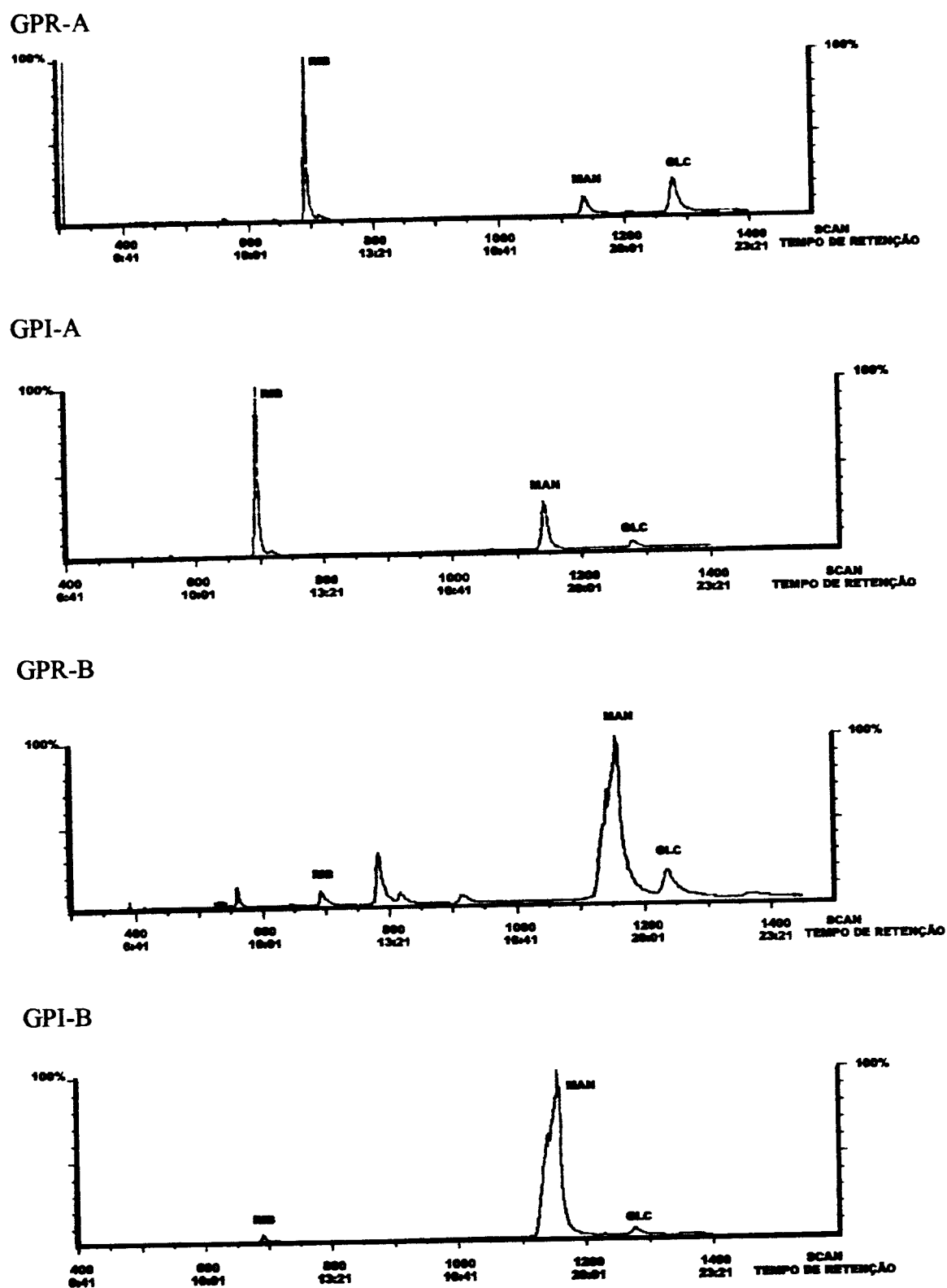
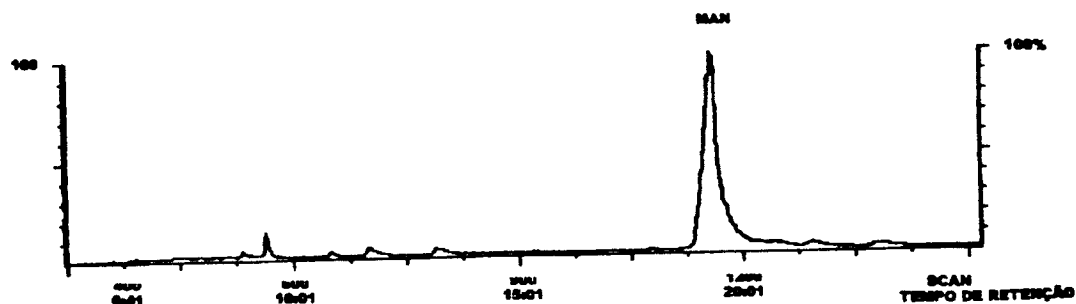


Figura 7(b) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos: ribose manose e glucose das subfrações GPR-A, GPI-A, GPR-B e GPI-B, da parede celular de *S. cerevisiae*.

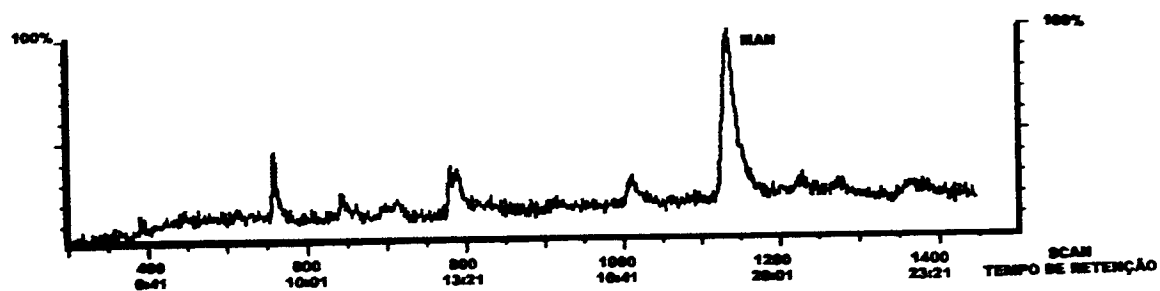
GPR-C



GPI-C



GPR-D

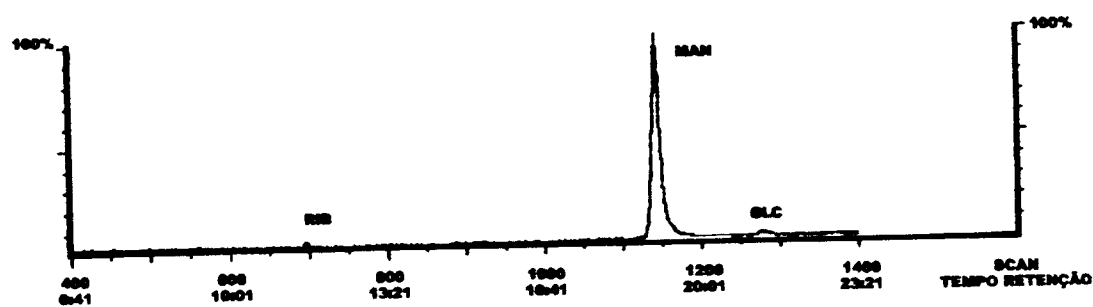


GPI-D

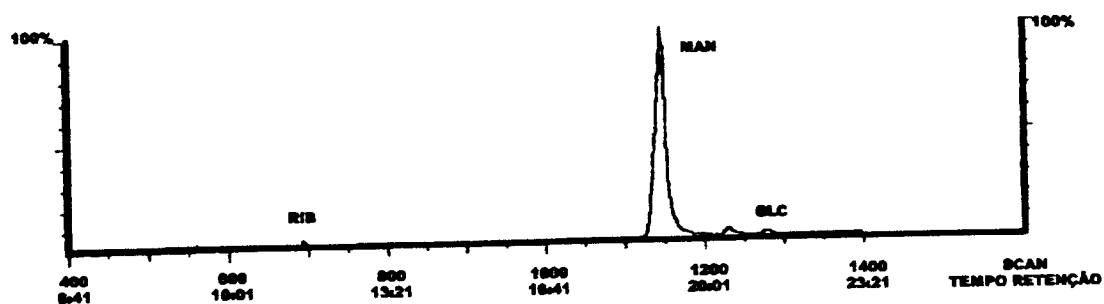


Figura 7(c) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos: ribose manose e glucose, das subfrações GPR-C, GPI-C, GPR-D e GPI-D, da parede celular de *S. cerevisiae*.

MNR



MNI



GALR

Espectro não disponível

GALI

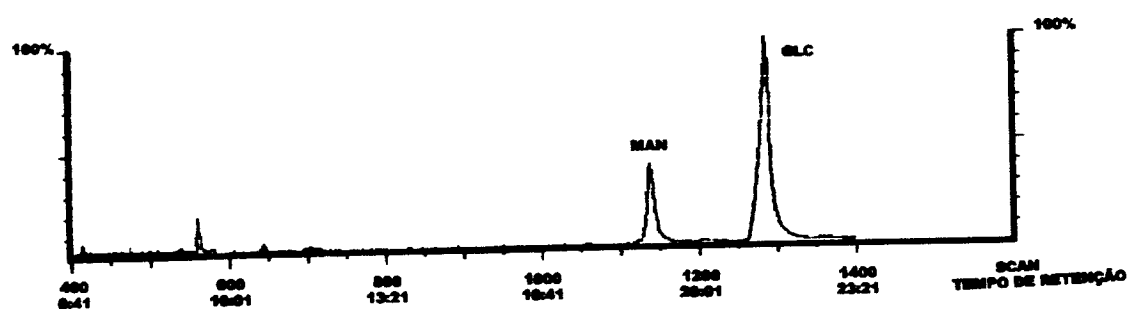
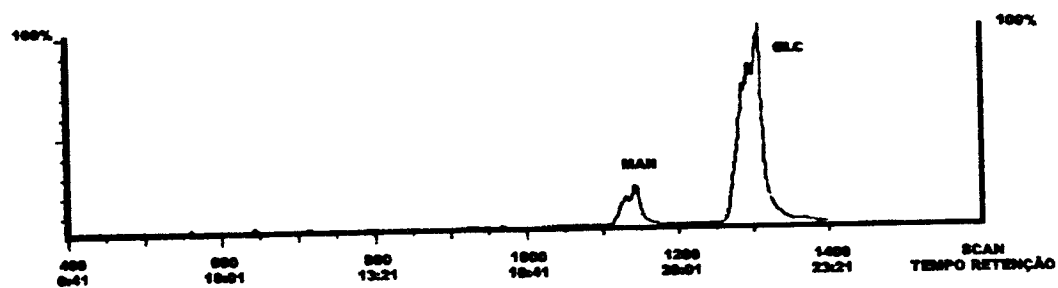
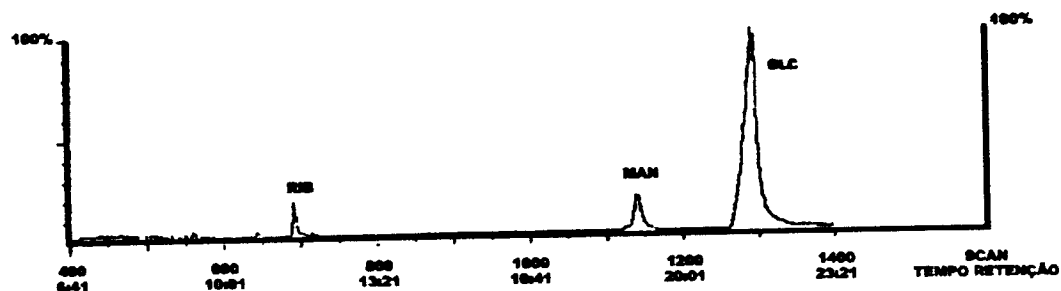


Figura 7(d) - Cromatogramas dos aldítóis acetatos dos monossacarídeos: ribose manose e glucose das frações, MNR, MNI, GALR e GALI da parede celular de *S. cerevisiae*.

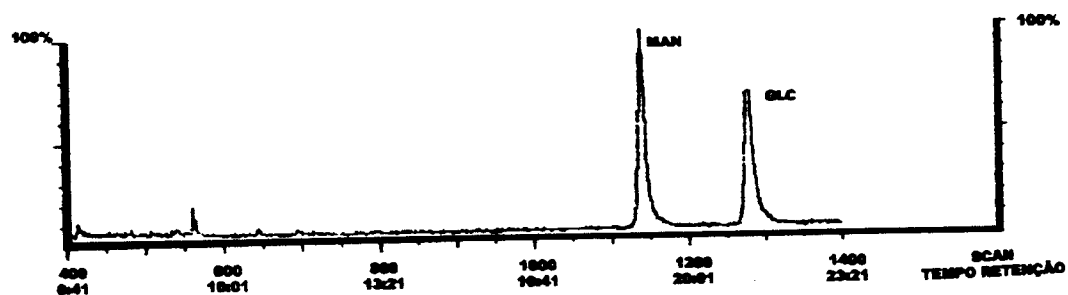
GIR



GII



GALR



GALI

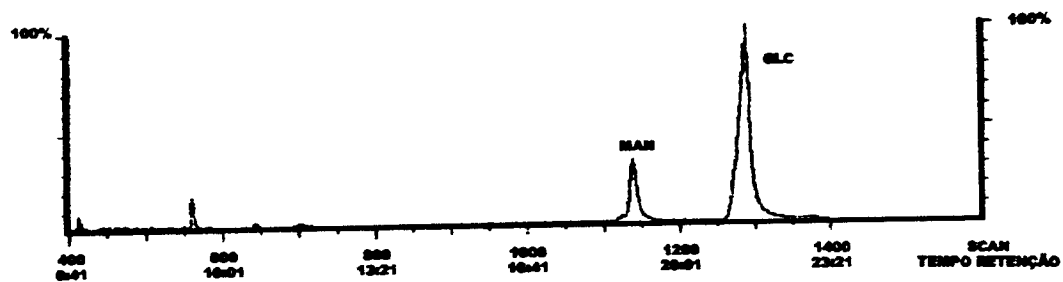


Figura 7(e) - Cromatogramas dos alditóis acetatos dos monossacarídeos: ribose manose e glucose das frações GIR, GII, GACR e GACI da parede celular de *S. cerevisiae*.

Para melhor visualização e comparação dos resultados das análises por CG-EM das amostras e frações de parede celular de *S. cerevisiae*, os resultados estão agrupados na Tabela 10, com a apresentação da taxa molar das unidades monossacarídicas de manose, glucose, ribose e galactose, encontradas nas frações da parede.

Tabela 10 - Percentual relativo das unidades monossacarídicas obtidas por CG-EM, da parede celular e suas frações de *S. cerevisiae*.

AMOSTRAS	PERCENTUAL RELATIVO		
	Manose	Glucose	Ribose
PBR	58	41	01
PBI	47	52	01
GPR	95	03	02
GPI	80	15	05
GPR-A	14	30	55
GPI-A	33	05	62
GPR-B	88	09	03
GPI-B	96	03	01
GPR-C	99	01	00
GPI-C	98	02	00
GPR-D	93	04	03
GPI-D	65	33	02
MNR	97	02	01
MNI	96	03	01
GALR	38	62	00
GALI	21	79	00
GIR	13	87	00
GII	10	86	04
GACR	52	48	00
GACI	18	81	00

4.5.2. Espectrometria de Infravermelho

As amostras foram submetidas a espectrometria de infravermelho, revelando um perfil com semelhanças nas várias frações. Os espectros permitem associar a presença de grupos γ O-H ($3650 - 3400 \text{ cm}^{-1}$); γ C-O-C e γ C-O ($1040 - 1160 \text{ cm}^{-1}$) e γ N-C=O ($1660 - 1640 \text{ cm}^{-1}$) (SILVERSTEIN *et al.*, 1987; KALINOWSKI *et al.*, 1984).

Somente os espectros das frações GPR-A e GPI-A apresentaram absorções intensas em 1241 e 1238 cm^{-1} , características de grupos γ C-O-C em anéis de 5 carbonos (pentoses), diferindo da faixa de $1160 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ para grupos γ C-O-C de hexoses que foram sempre observados nas demais frações.

O alto percentual relativo de ribose nessas frações (55 e 62% na GPR-A e GPI-A, respectivamente) é também confirmado nos resultados por CG-EM (Tabela 10). Os espectros de infravermelho da fração GPI-A e MNR são apresentados nas Figuras 8 e 9 para visualizar as características apontadas.

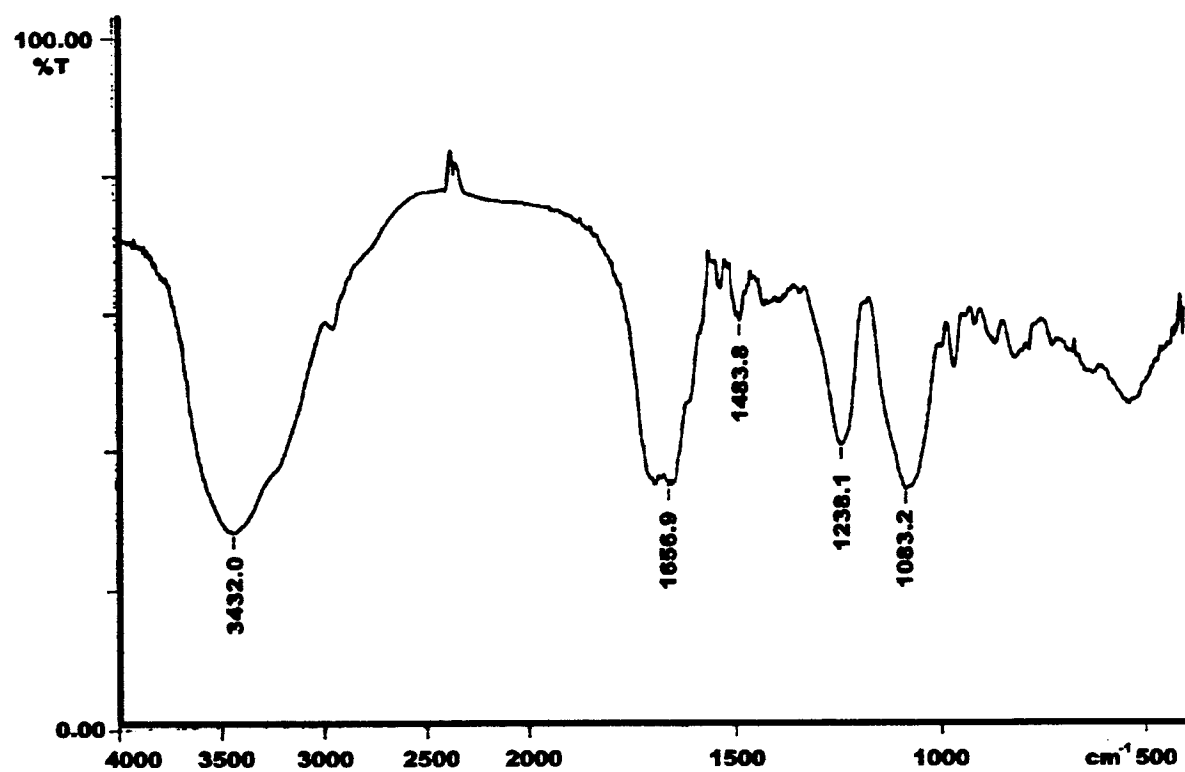


Figura 8 - Espectro de infravermelho da fração A da glicoproteína (GPR-A) isolada da parede celular de *S. cerevisiae*.

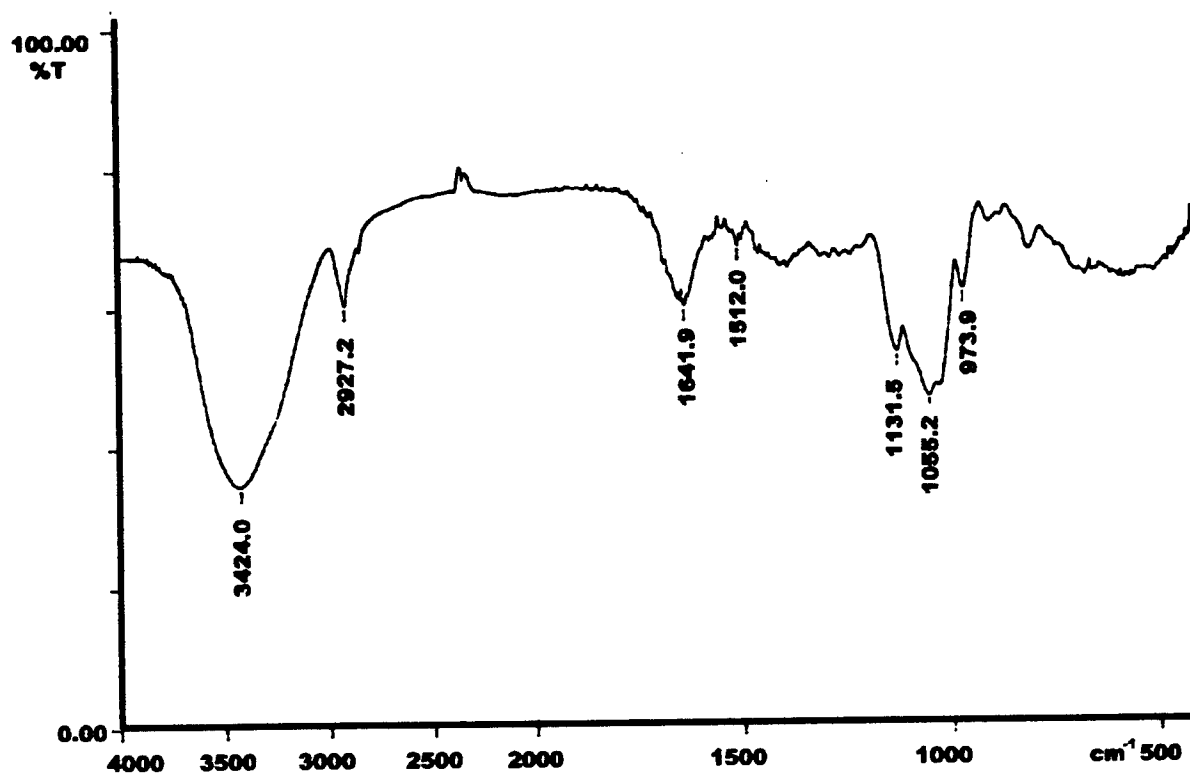


Figura 9 - Espectro de infravermelho da manana (MNR) isolada da parede celular de *S. cerevisiae*

4.5.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Após a avaliação das amostras por CG-EM e determinação de seus principais monômeros, foi realizado um estudo por espectrometria de RMN ^{13}C , ou seja, a nível de ligações glicosídicas, para determinar como estas unidades monossacarídicas estão interligadas.

A análise de polissacarídeos por espectroscopia de RMN ^{13}C baseia-se nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono. Para a interpretação dos espectros de RMN ^{13}C de polissacarídeos é analisada, por exemplo, a região de carbonos anoméricos (C1), aproximadamente δ 98 - 109 ppm, que comparada à literatura existente permite em muitos casos determinar ligações tipo α - ou β -Manp, -Glc p, etc.. Da mesma forma ligações tipo (1 $\rightarrow$ 6) podem ser identificadas pelo valor do deslocamento químico do C6-O-substituído na região de aproximadamente δ 64-67 ppm; caso o C6 seja O-não-substituído seu sinal apareceria na região de δ 60-62 ppm, e portanto, não existiriam ligações tipo (1 $\rightarrow$ 6).

Para uma melhor visualização e comparação das diferentes amostras analisadas por RMN ^{13}C , os sinais de deslocamento químico dos carbonos foram agrupados em faixas de deslocamento químico de carbono e são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Deslocamentos químicos dos carbonos (δ) observados no espectro de RMN ^{13}C das diferentes amostras e frações da parede celular de *S. cerevisiae***.

AMOSTRA	C ₁	C _{Nucleosídeo}	C ₃ O-subst.	C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅			C ₆ -O-subst.	C ₆ -O-livre	
PBR e PBI	102,6	120-135	77,9	75,5	71,1	66,8	60,9		
	101,7	168-175		74,6	70,3				
	100,2			73,0	69,9				
	99,6								
	98,1								
GPR* e GPI	101,7	116-166	89,1-87,2	73,0	71,0-70,2	65,6	60,9		
	100,2				69,9				
	98,1				69,4				
					66,7				
					66,0				
GPR-A e GPI-A	102,3	116-166	89,1-87,2	73,9	64,8	60,9			
	101,9			73,1		60,4			
				82,1		72,6			
GPR-B e GPI-B	101,7	116-166	89,1-87,2	73,0	71,1	66,8	60,9		
	100,2				70,3			66,0	
	98,1				69,9				
					69,4				
MNR* e MNI	102,0	116-166	78,7-77,7	73,1	71,1-69,4	65,6	60,9		
	101,7			72,9	66,9-65,8				
	101,6								
	100,2								
GALR e GALI	98,1	116-166	78,7-77,7	73,1	71,6-70,3	66,8	60,5		
	102,7							77,2	
	102,0							75,6	
GII	99,5	116-166	86,1	74,7					
GACI e GACR*	103,0	116-166	86,1	76,4	73,5	70,2	61,0		
				75,5	73,0	68,8			
						68,5			
GACI e GACR*	102,7	116-166	78,2-77,2	73,1	71,4-71,1	66,7	60,9		
	101,7			72,5	70,3		60,5		
	99,5			74,7	69,4				
					68,7				

* Análise por DEPT.

** O solvente utilizado foi D₂O, 70°C, com excessão das amostras GII, PBR e PBI onde foi empregado DMSO-d₆.

4.6. Verificação das estruturas dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae*

4.6.1. Parede bruta (PBR e PBI)

A análise da parede bruta liofilizada (PBR e PBI) por CG-EM apresentou o percentual relativo manose: glucose: ribose de 58:41:1 e 47:52:1, respectivamente (Tabela 10). O perfil de monossacarídeos foi semelhante nas duas amostras, onde o teor de manose foi aproximadamente proporcional ao de glucose.

Através da análise de RMN ^{13}C das amostras PBR e PBI foi possível observar na região de carbonos anoméricos sinais intensos (δ 101,7 - 100,2 - 99,6 e 98,1 ppm) característicos de ligações α -D-(1 $\rightarrow$ 6) manopiranosídicas (Figura 10); ambas as amostras apresentaram espectros idênticos.

Não foram observados sinais distintos do carbono C1 (δ 104,0 ppm) em campo baixo, característicos de configuração β , e de C3 (δ 86,0 - 87,9 ppm) de ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) glucp, apesar de ocorrer β -(1 $\rightarrow$ 3) glucana na parede bruta, na proporção de cerca de 60% em peso seco (Tabela 5). A única evidência no espectro (Figura 10) são os sinais que aparecem na região de δ 20 - 32 ppm, aos quais se atribui a formação de hélice, proveniente da conformação das β -(1 $\rightarrow$ 3) glucanas no estado de gel (KOGAN, 1988). Segundo REED & NAGODAWITHANA (1991) a conformação de hélices triplas na estrutura terciária da glucana é uma característica particular da mesma.

Outros sinais na região de δ 120 - 135 ppm e δ 168 - 175 ppm podem ser atribuídos à presença de resíduos de ácidos nucleicos (KALINOWISKI *et al.*, 1984).

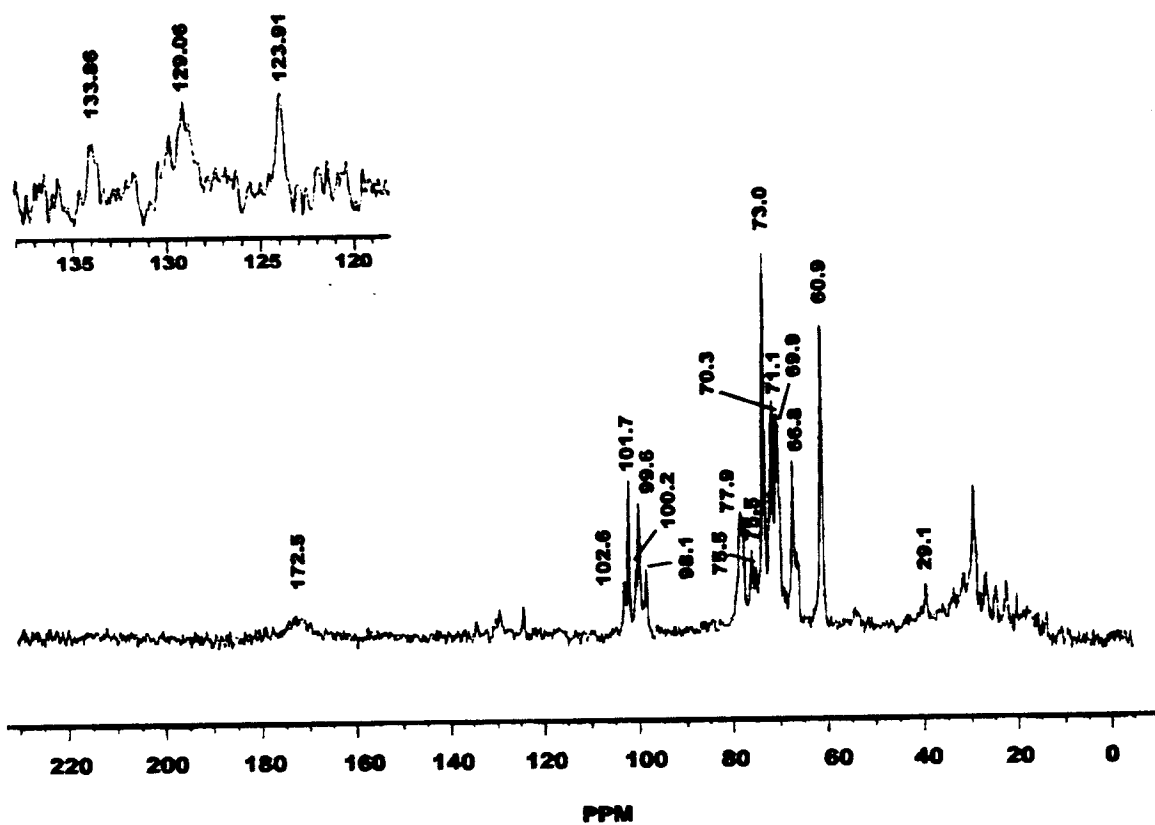


Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C da parede celular bruta (PBI) de *S. cerevisiae*, $\text{DMSO}-d_6$ 70°C .

4.6.2. Glicoproteína (GPR e GPI)

As glicoproteínas extraídas a quente em pH 7,2, ou seja, em pH neutro (Figura 2), frações GPR e GPI, foram analisadas por CG-EM, cujo percentual relativo manose: glucose: ribose foi de 95:03:02 e 80:15:05, respectivamente (Tabela 10). A maior proporção em glucose na GPI pode ser atribuída a contaminação proveniente de resíduos solúveis de glucose que podem ser extraídos junto com a glicoproteína.

O espectro de RMN ^{13}C das frações GPR e GPI foram idênticos (Tabela 11). O espectro da fração GPR mostrado na Figura 11 apresenta três sinais na região de carbono anomérico (δ 101,7 - 100,2 - 98,7). A região de C1 dos carboidratos corresponde a uma manana, contendo uma cadeia principal constituída de unidades α -D-(1 $\rightarrow$ 6) manopiranana 2-O-substituídas (δ 98,07 ppm), ligadas a unidades α -D- (1 $\rightarrow$ 2) manp (δ 100,17 ppm) e uma unidade terminal não redutora de α -D-(1 $\rightarrow$ 3) manp (δ 101,7 ppm).

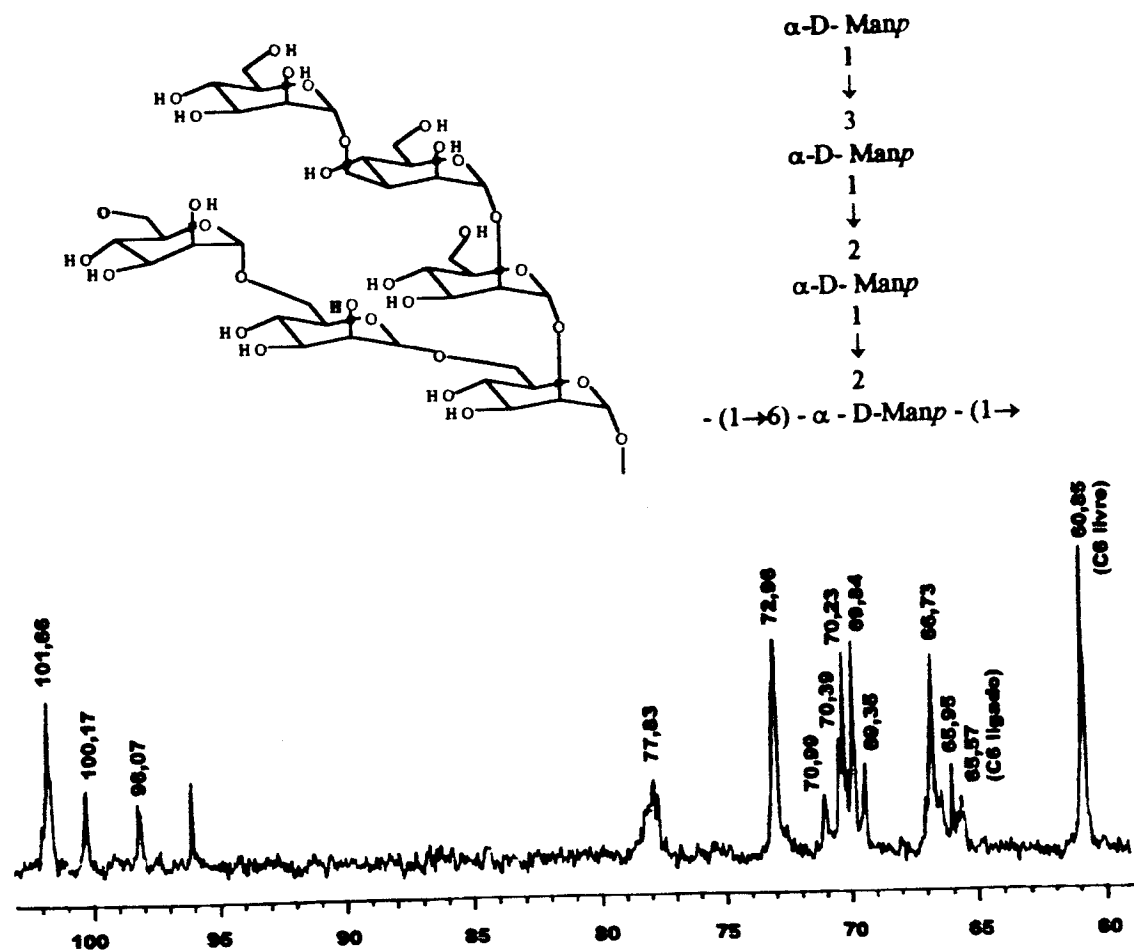
Considerando o alto conteúdo de manose na parede celular da maioria das leveduras e que em *S. cerevisiae* de panificação a α -D-manana é descrita como um componente ativo de superfície (GORIN & BARRETO-BERGTER, 1983), comparou-se os espectros de RMN ^{13}C da fração GPR (Figura 11), com os de um espectro de α -D-manopiranana de cadeia ramificada (GORIN, 1973 e 1981), obtido nas mesmas condições aqui analisadas (D_2O , 70°C); este último espectro apresenta perfil idêntico (Figura 12), porém com uma variação na escala dos deslocamentos químicos da ordem de 2,0 ppm (δ 103,5; 102,0 e 100,0 ppm). Para melhor analisar a questão foi solicitado ao Prof. Dr. P.A.J. Gorin uma amostra da α -D-manopiranana padrão, citada anteriormente, para realização de espectro de RMN ^{13}C no mesmo aparelho em que foram realizadas as análises desta pesquisa.

O espectro da manana padrão (Figura 13) apresentou sinal de carbono anomérico em δ 101,7; 100,2 e 98,1 ppm, que são equivalentes à fração GPR estudada, confirmando que a estrutura das frações GPR e GPI se adequam à estrutura proposta por GORIN (1981), observada na Figura 12.

Dentre os sinais majoritários, destaca-se o sinal C₆-O-não substituído em δ 60,4 - 61,4 ppm indicativo de grupos -CH₂OH, ou seja, com grupo hidroxila ligado ao C₆ livre. Para averiguar a presença de ligações 1→6 foi necessário utilizar a técnica de RMN ¹³C denominada DEPT, devido à sobreposição de sinais na região de C₆-O-substituído (δ 64-67 ppm). A técnica DEPT 135° permite diferenciar os sinais de CH₂ - C_{quant.} dos sinais de CH-CH₃; o DEPT 90° identifica os sinais de CH visto que os sinais de CH₃ não aparecem. Com o auxílio dos espectros DEPT pode-se observar nos espectros da amostra GPR a presença de grupos CH₂ (C6) em δ 65,57 e 60,85 ppm. Por esta técnica o sinal em aproximadamente δ 65,5 ppm é relativo aos C₆-O-substituído, e com isso evidenciou-se a presença de ligações (1→6).

BARRETO-BERGTER & GORIN (1983) classificam a glicoproteína da parede celular de *S. cerevisiae* como uma manana ramificada que contém uma cadeia principal α (1→6) manopirosídica, substituída no átomo O-2 por cadeias laterais de α -D-manp, α -D-manp(1→2)- α -manp e α -D-manp(1→3)- α -manp(1→2)- α -manp. Traços de glucose presentes são provenientes da ponte manana-proteína.

O fato de não se detectar sinais característicos da grande quantidade de peptídios presentes pode sugerir que as proteínas não estão firmemente ligadas ao polissacarídeo, fato observado e apontado por Ohno *et al.* (1985), citado por HAIDO (1993). Esses autores também relatam que o aquecimento pode causar rompimento das ligações peptídicas e os resíduos não apresentam tais unidades. As glicoproteínas apresentariam ligações N-glucosídicas, que são invariavelmente ligações β com o nitrogênio amídico



GPR (a)

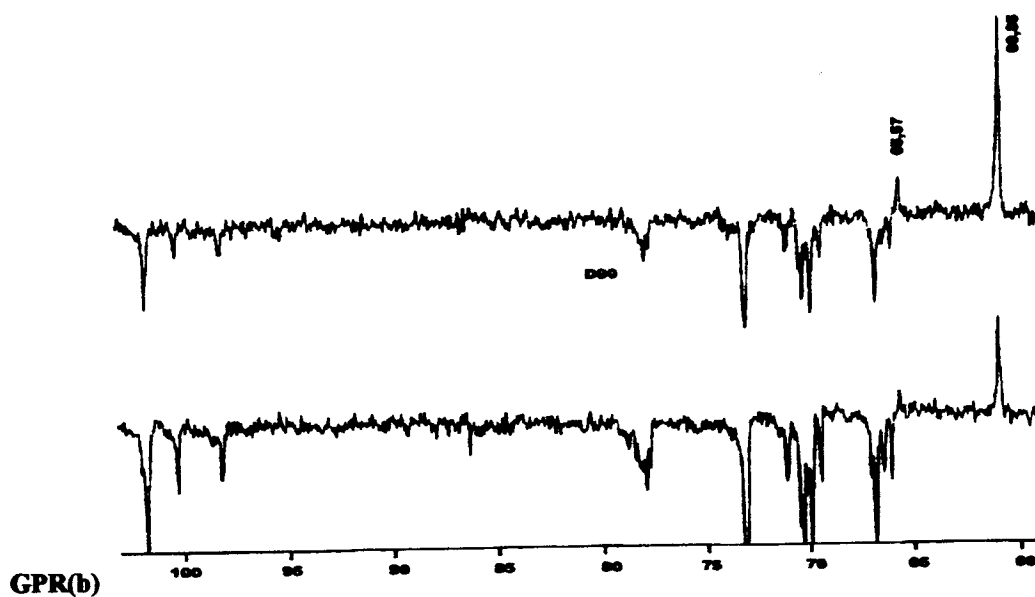


Figura 11 - (a) Espectro de RMN ¹³C e estrutura proposta da glicoproteína (GPR) da parede celular de *S. cerevisiae* (D₂O, 70°C, sinal em 96 ppm relativo ao solvente CCl₄) e (b) DEPT CH₂ (sinal negativo); CH e CH₃ (sinal positivo).

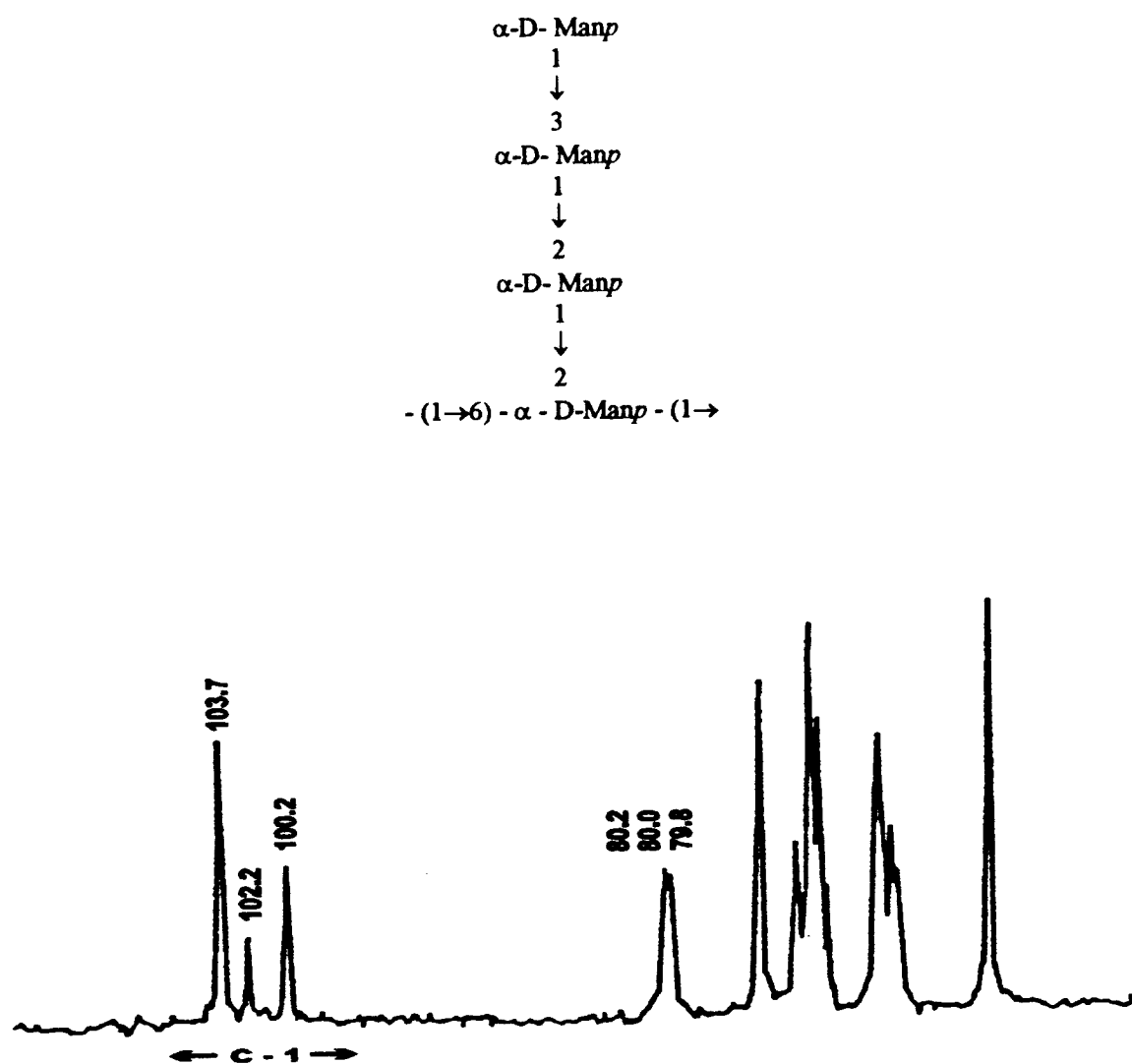


Figura 12 - Espectro de RMN ^{13}C e estrutura da manana da parede celular de *S. cerevisiae*, D_2O
 - 70° (GORIN, 1981).

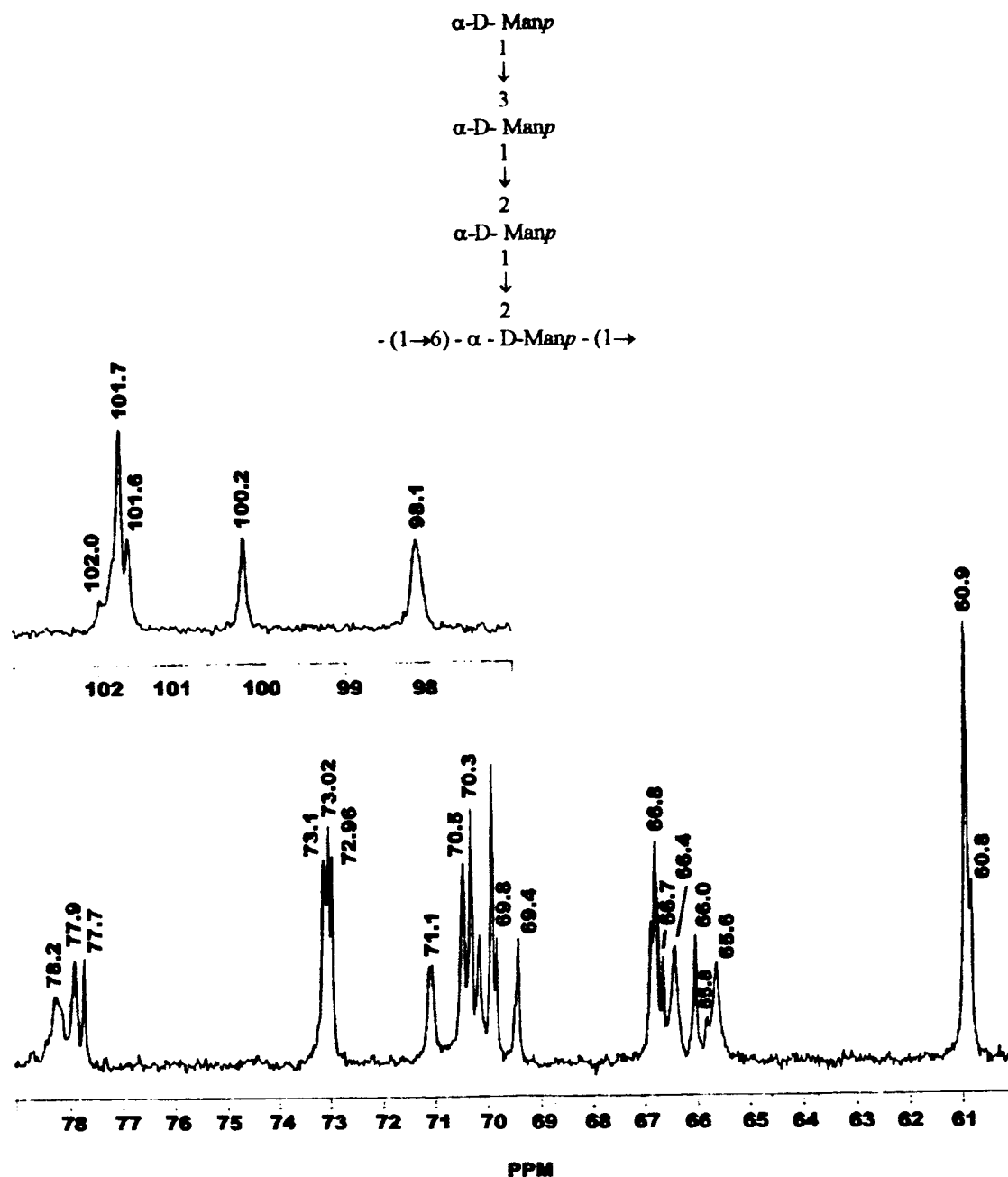


Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C de manana da parede celular de *S. cerevisiae*, D_2O - 70°C
 (amostra padrão fornecida pelo Prof. Dr. P.A.J. Gorin)

57,2 ppm indicativo de carbono-N-substituído. Segundo BARLET *et al.* (1993) esse grupo deve apresentar sinais em δ 49,8 - 55,5 e 57,0 ppm.

Concluindo, as frações de glicoproteínas em estudo são constituídas por uma manana ramificada de cadeia principal α -(1 $\rightarrow$ 6) manopirranana cujas ramificações são unidades (1 $\rightarrow$ 2) manp e α (1 $\rightarrow$ 3) manp .

4.6.3. Glicoproteína - Fração A (GPR-A e GPI-A)

O tratamento inicial de glicoproteína bruta com Cetavlon a pH 7,0 resultou na formação de um precipitado, Fração A (Figura 3a), devido à presença de porção ácida (LLOYD, 1970).

As análises das frações GPR-A e GPI-A por CG-EM apresentaram manose: glucose: ribose com percentual relativo de 14:30:55 e 33:05:62, respectivamente (Tabela 10); onde observou-se um elevado conteúdo de ribose (55 e 62%), mostrando que ácidos nucleicos estavam presentes na fração.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) verificou-se sinais com deslocamento químico em campo mais baixo (δ 116 - 165,8 ppm) do que o esperado para polissacarídeos (δ 60 - 110 ppm), o que veio a confirmar os ácidos nucleicos.

HAIDO (1993) constatou a presença de sinais em campo baixo (δ 39 - 174 ppm) nos espectros de RMN ^{13}C da fração A de *Aspergillus fumigatus*, assim como uma alta proporção de ribose (44%), que atribuiu à presença de ácidos nucleicos.

Dados da literatura (KALINOWSKY *et al.*, 1984) mostraram que sinais de deslocamento químico na região de δ 111 - 116 ppm são característicos do C1 dos carboidratos ligados a unidades nucleosídicas, como por exemplo a

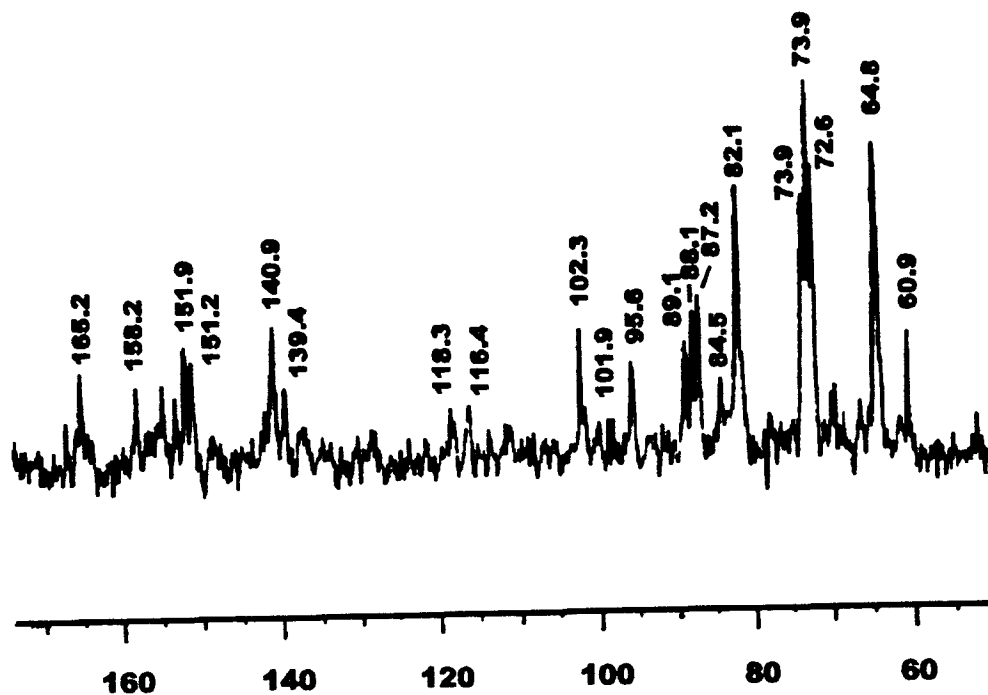


Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C da fração A da glicoproteína (GPR-A) isolada de *S. cerevisiae*, D_2O ; 70°C .

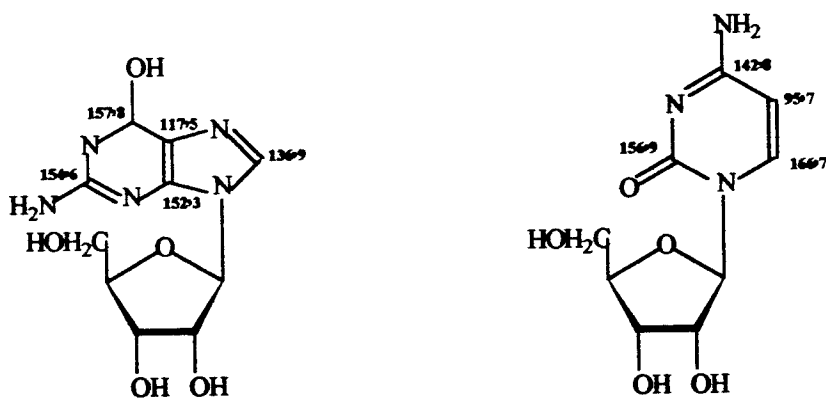


Figura 15 - Estrutura da Guanosina e Citidina (KALINOWSKY *et al.*, 1984).

guanosina (Figura 15) que apresenta sinais em δ 117,5 - 136,9 - 151,9 - 154,6 - 157,8 ppm compatíveis com alguns sinais encontrados no espectro das frações A (δ 118,3 - 137,4 - 152,3 - 154,6 - 157,8 ppm); outro nucleosídeo, a citidina, também apresenta sinais de carbono (δ 95,7 - 142,8 - 156,9 - 166,7 ppm) compatíveis com outros sinais encontrados nas amostras das frações A (δ 95,6 - 140,9 - 156,9 - 158,9 - 165,8 ppm). Esses dados são indicativos da presença de grande quantidade de unidades nucleosídicas (proveniente de contaminação com RNA).

A alta concentração de nucleosídeos e a baixa concentração de manose e glicose determinadas por CG-EM tornaram inviável a elucidação da estrutura do polissacarídeo existente nas amostras em estudo (Fração A). Os resultados analíticos das frações A mostraram tratar-se de uma fração contendo um polissacarídeo e grande quantidade de contaminante proveniente de RNA.

4.6.4. Glicoproteína - Fração B (GPR-B e GPI-B)

A análise dos alditóis-acetato obtidos pela redução e acetilação das frações B (GPR-B e GPI-B) originadas pelo fracionamento da glicoproteína com Cetavlon (Figuras 3a e 3b), mostrou que o percentual relativo manose: glicose: ribose de 88:09:03 e 96:03:01, respectivamente (Tabela 10), foi semelhante nas duas frações, com predominância de manose.

As estruturas químicas das peptídiomananas das amostras GPR-B (Figura 16) e GPI-B de *S. cerevisiae* mostraram bastante semelhança ao serem estudadas por RMN ^{13}C (Tabela 11). Os estudos baseados em espectros de RMN ^{13}C mostraram que ambas amostras apresentam sinais de deslocamentos químicos muito semelhantes na região de carbono anomérico. Os sinais presentes na região de C1, em δ 98,1 ppm corresponde a ligações α -D- (1 $\rightarrow$ 6) manp na cadeia principal, em δ 100,2 ppm corresponde às substituições com

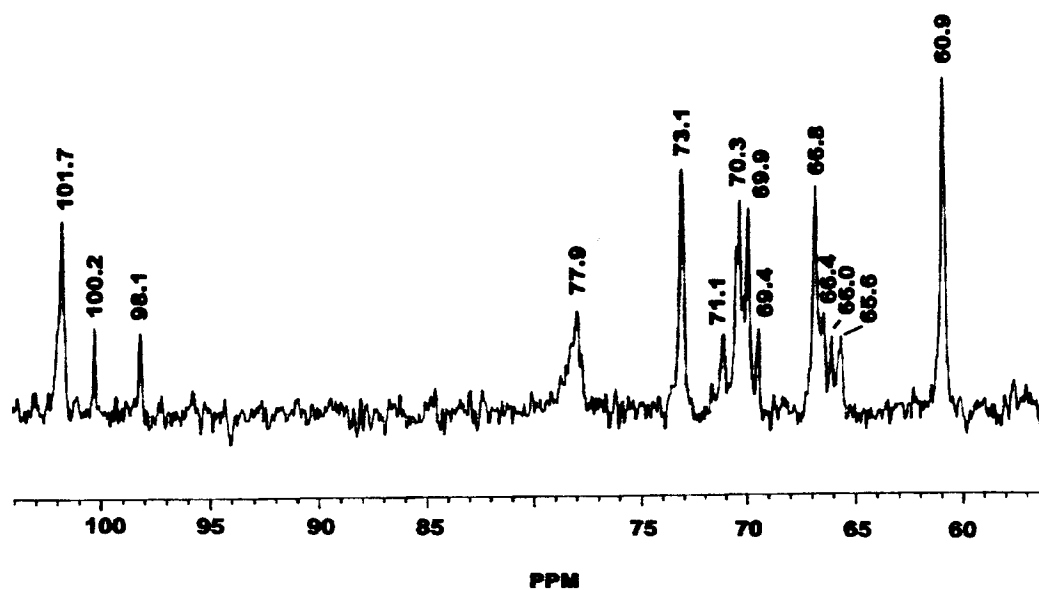
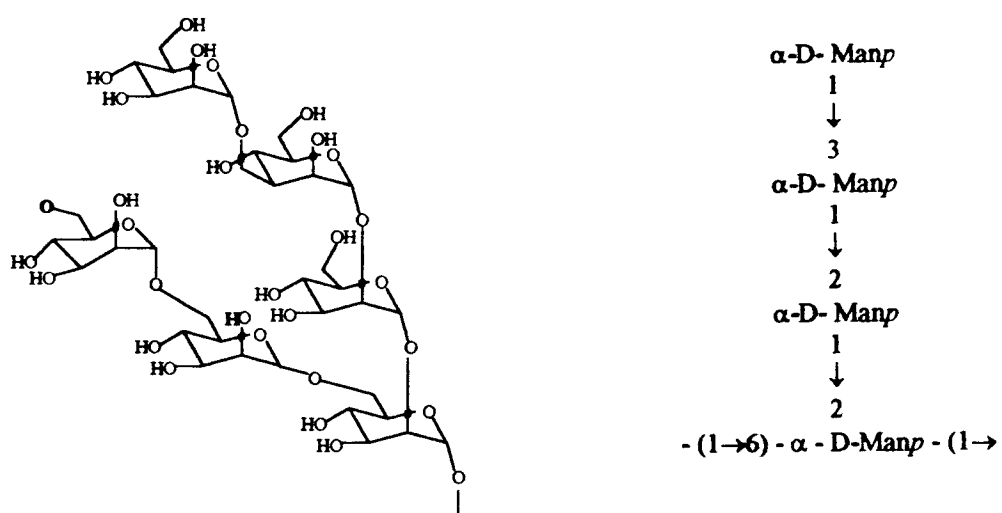


Figura 16 - Espectro de RMN^{13}C e estrutura proposta da fração B da glicoproteína (GPR-B) isolada de *S. cerevisiae*, D_2O ; 70°C).

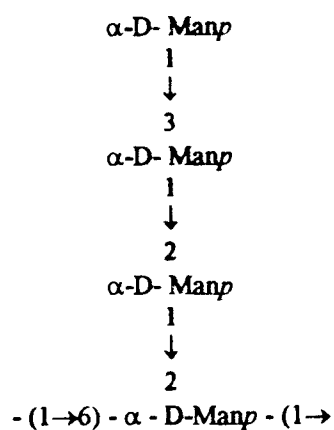
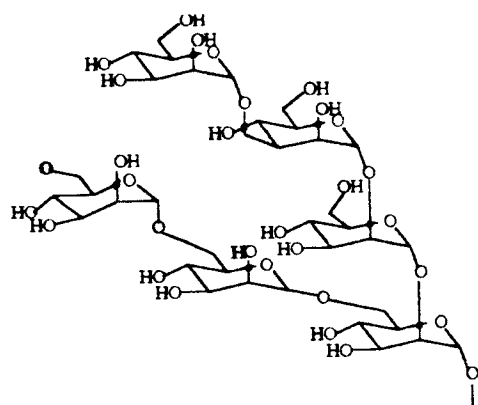
unidades α -D- (1 $\rightarrow$ 2) manopiranose e em δ 101,7 ppm corresponde à unidade terminal não redutora de α -D-(1 $\rightarrow$ 3) manopiranose, por analogia aos sinais correspondentes que aparecem nos espectros da GPR e na manana padrão cedida pelo Prof. Dr. P.A.J. Gorin (Figuras 11 e 13).

4.6.5. Mananas (MNR e MNI)

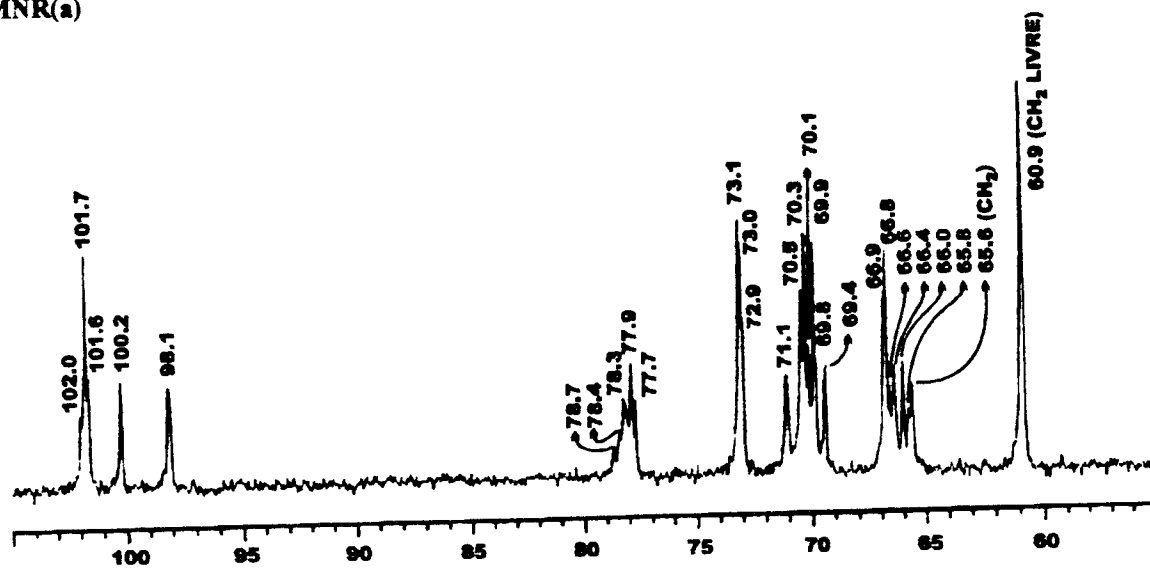
Os polissacarídeos álcali solúveis precipitados com Fehling, MNR e MNI (Figura 4) foram analisados por CG-EM apresentando percentual relativo manose: glicose:ribose de 97:02:01 e 96:03:01, respectivamente (Tabela 10).

Os espectros de RMN ^{13}C das amostras MNR (Figuras 17) e MNI são idênticos aos espectros da GPR, GPI, GPR-B, GPI-B e da manana padrão cedida pelo Prof. Dr. P.A.J. Gorin (Figuras 11, 16 e 13).

Os sinais na região de C1 dos carboidratos correspondem a uma manana com cadeia principal α -D-(1 $\rightarrow$ 6) manopiranana 2-O-substituída (δ 98,1 ppm), ramificada com unidades α -D-(1 $\rightarrow$ 2) manopiranose (δ 100,2 ppm) e uma unidade terminal não redutora α -D-(1 $\rightarrow$ 3) manopiranose (δ 101,7 ppm).



MNR(a)



MNR(b)

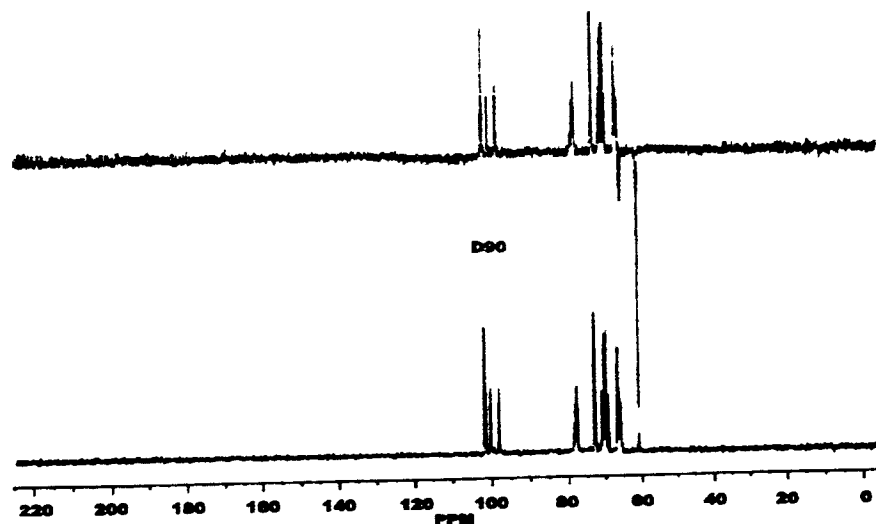


Figura 17 - (a) Espectro de RMN ^{13}C e estrutura proposta da manana (MNR) da parede celular de *S. cerevisiae* (D_2O , 70°C) e (b) DEPT CH_2 (sinal negativo); CH e CH_3 (sinal positivo).

4.6.6. Glucana álcali solúvel (GALR e GALI)

Os sobrenadantes da precipitação com Fehling (Figura 4) continham a fração GALR e GALI. O percentual relativo, obtido por CG-EM, das unidades monossacarídicas de manose, glucose e ribose foi de 38:62:00 e 21:79:00 naquelas frações, respectivamente (Tabela 10).

Os espectros de RMN ^{13}C das frações GALR e GALI foram idênticos (Tabela 11; Figura 18) e não permitem identificar ligações correspondentes a unidades β -D-glucopiranosídicas, embora a literatura relata que o polissacarídeo álcali solúvel é uma β -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucopiranana (MANNERS *et al.*, 1973b). BARRETO-BERGTER & GORIN (1983) citam pesquisas de Bacon *et al* (1969), em que esses autores também identificam a glucana solúvel como uma β -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucopiranana, com técnica de espectrometria de infra vermelho e análises químicas.

Quando os sinais na região do C1 anomérico aparecem em δ 104,0 e 103,9 ppm correspondem aos C1 de unidades β -D-glucopiranosídicas, (PREVIATO, 1978; GORIN, 1981).

Os sinais em δ 60,5 e 61,0 ppm intensos na GALR e GALI, respectivamente, indicam que os C6 estão, em sua maioria, livres. Na região de δ 64 - 67 ppm, característica de C6-O-substituído há um sinal de baixa intensidade, que sugere a existência de ligações (1 $\rightarrow$ 6), mesmo que em menor proporção.

Todavia, outros estudos (GORIN, 1981) revelam sinais em campo mais baixo que 100 ppm para β - glucanas (δ 102 - 104 ppm). Nas frações GALR e GALI, embora em menor intensidade, podemos observar sinais em δ 102,7ppm (C1) e 66,2 ppm (C6) característicos de ligações β -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucopiranosídicas, o

que não descarta a possibilidade da existência dessas ligações, mesmo que em menor quantidade.

Os espectros de RMN ^{13}C das frações GALR e GALI apresentaram sinal intenso em δ 99,5 ppm, que corresponde ao carbono anomérico C1. Sinais em campo alto (δ 99,5 - 100,0 ppm) são característicos de ligações α -D-glucopiranosídicas (COLSON *et al.*, 1974; GORIN, 1981).

A literatura mostra o espectro de RMN ^{13}C de uma glucana $\alpha(1\rightarrow4)$ (amilose de batata) em DMSO- d_6 , com sinais majoritários em 99,9 - 78,8 - 73,1 - 71,5 e 60,6 (DAIS & PERLIN, 1982), bastante coincidentes com os obtidos na GALR e GALI (Figura 18) de 99,5 - 77,2 - 73,1 - 71,4 - 71,1 e 60,5. Esta informação leva a supor a existência de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ glucopiranosídicas na frações estudadas, como no glicogênio, embora a literatura relata a presença deste na fração ácido solúvel, como contaminante da amostra.

Em face dos resultados, não foi possível observar a estrutura do polissacarídeo constituinte desta fração álcali solúvel.

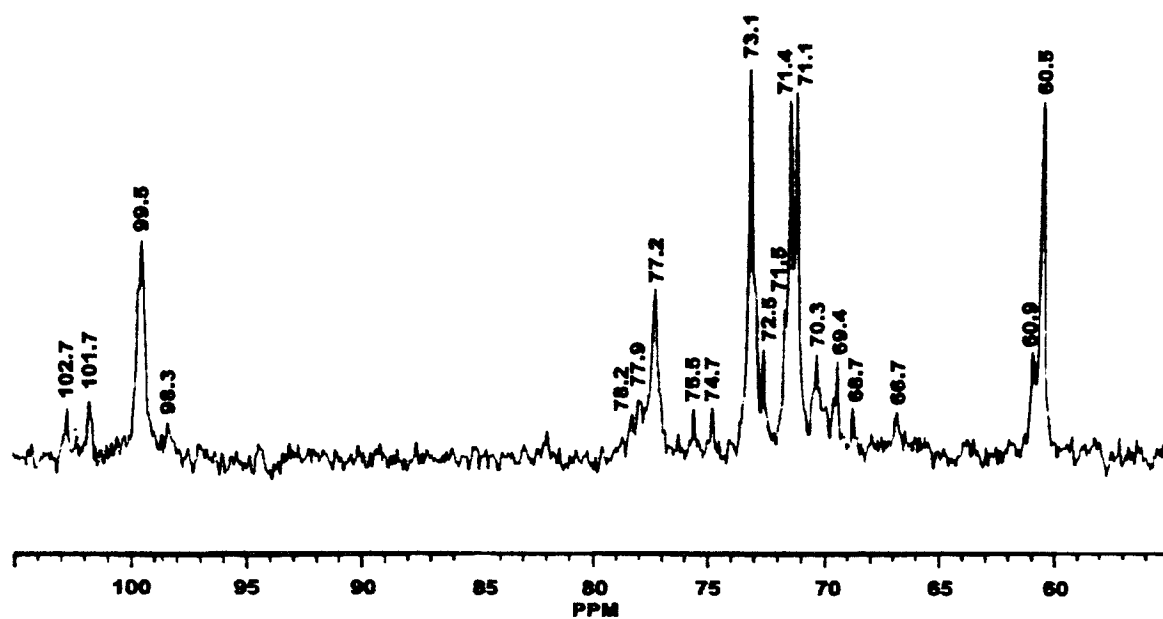


Figura 18 - Espectro de RMN ^{13}C e da glucana álcali solúvel (GALI) isolada da parede celular de *S. cerevisiae*, D_2O , 70°C .

4.6.7. Glucana Insolúvel (GIR e GII)

A análise dos monossacarídeos da fração GIR e GII (Figura 5), obtida por CG-EM apresentou percentual relativo de manose: glucose: ribose de 13:87:00 e 10:86:04, respectivamente (Tabela 10), onde podemos observar a elevada proporção de glucose.

Não foi possível obter o espectro de RMN ^{13}C da fração GIR, mesmo após várias tentativas devido à sua grande viscosidade. Foi observado, durante a manipulação para purificação, que a fração GIR se apresentou com maior viscosidade que a GII.

O espectro de RMN ^{13}C da fração GII apresentou o sinal de carbono anomérico em δ 103,02 ppm que provavelmente corresponde ao C1 das unidades β -D-glucosídicas (Figura 19). Os carbonos anoméricos de α -glucanas encontram-se geralmente na região de δ 97 - 101,6 ppm e de β -glucanas em campo um pouco mais baixo δ 98,0 - 104,0 ppm (GORIN, 1988).

O sinal de ressonância do C1 de unidades β -D-glucopiranosídicas substituídas na posição 3 de uma glucana linear está em δ 104,6 ppm, enquanto que para uma (1 $\rightarrow$ 6)-glucana, a ressonância do C1 ocorre em δ 104,8 ppm. Esses aparecem em campo mais baixo do que aqueles de unidades α -D-glucopiranosídicas.

É bem evidente na literatura a presença de três sinais para β (1 $\rightarrow$ 3)glucana; um sinal de carbono anomérico em δ 103-104 ppm, outro em δ 86,2 - 87,9 ppm característico de C3 O-substituído, e o terceiro em δ 68,52 ppm atribuído ao C4 de β (1 $\rightarrow$ 3)glucopiranoose. Estes sinais são observados no espectro da Figura 19 (δ 103,02; 86,06 e 68,52 ppm) e indicam a presença de ligações β (1 $\rightarrow$ 3)glucp.

Os sinais em δ 103,8 - 104,0 ppm característicos de C1 de $\beta(1\rightarrow4)\text{glcp}$ e em δ 80,0 - 80,3 ppm característico de C4 O-substituído não aparecem no espectro da amostra, o que indica a ausência de ligações $\beta(1\rightarrow4)\text{glcp}$.

Observa-se (Figura 19) que os sinais de baixa intensidade presentes no espectro da fração GII, a δ 75,0; 73,0 e 70,18; e que os sinais em campo alto a δ 24,5 - 30,0 ppm são característicos de formação de hélices, devido à conformação e estrutura da amostra no estado de gel.

A alta intensidade do sinal em δ 61,02 ppm característico de C6 O-não-substituído e a ausência ou sobreposição de sinal em δ 64 - 69 ppm característico de C6 O-substituído é indicativo de pouca ou ausência de ligações $\beta(1\rightarrow6)\text{glucosídicas}$.

Estes dados aliados à semelhança do perfil e coerência do espectro RMN ^{13}C (Figura 20) de uma glucana isolada de *S. cerevisiae* descrita por KOGAN (1988) em suas pesquisas, permitiu propor para a fração GII a estrutura apresentada na Figura 19, representativa de uma $\beta(1\rightarrow3)\text{glucana}$.

ENSLEY *et al.* (1994) atribuem ao espectro RMN ^{13}C de β glucana (insolúvel em água) de *S. cerevisiae*, sinais em δ 102,7 (C1); 72,6 (C2); 86,0 (C3); 68,2 (C4); 76,1 (C5) e 60,7 (C6). Com resultados de RMN ^1H e outros, atribuem uma estrutura $\beta(1\rightarrow3)$ e também concluem que contém poucas ou nenhuma ramificação, o que foi confirmado por WILLIAM *et al.* (1991). Os sinais detectados para glucana $\beta(1\rightarrow3)$ também de *S. cerevisiae* por KOGAN *et al.* (1988) e WILLIAM *et al.* (1991, 1992), são similares aos anteriores.

KOGAN *et al.* (1988) concluem que a glucana insolúvel é composta por uma cadeia principal $\beta(1\rightarrow3)$ com cadeias laterais $\beta(1\rightarrow6)$. Todavia a extração descrita demonstra que a glucana insolúvel relatada é equivalente à glucana insolúvel bruta deste trabalho, pois a glucana ácido solúvel não foi separada pelos autores citados.

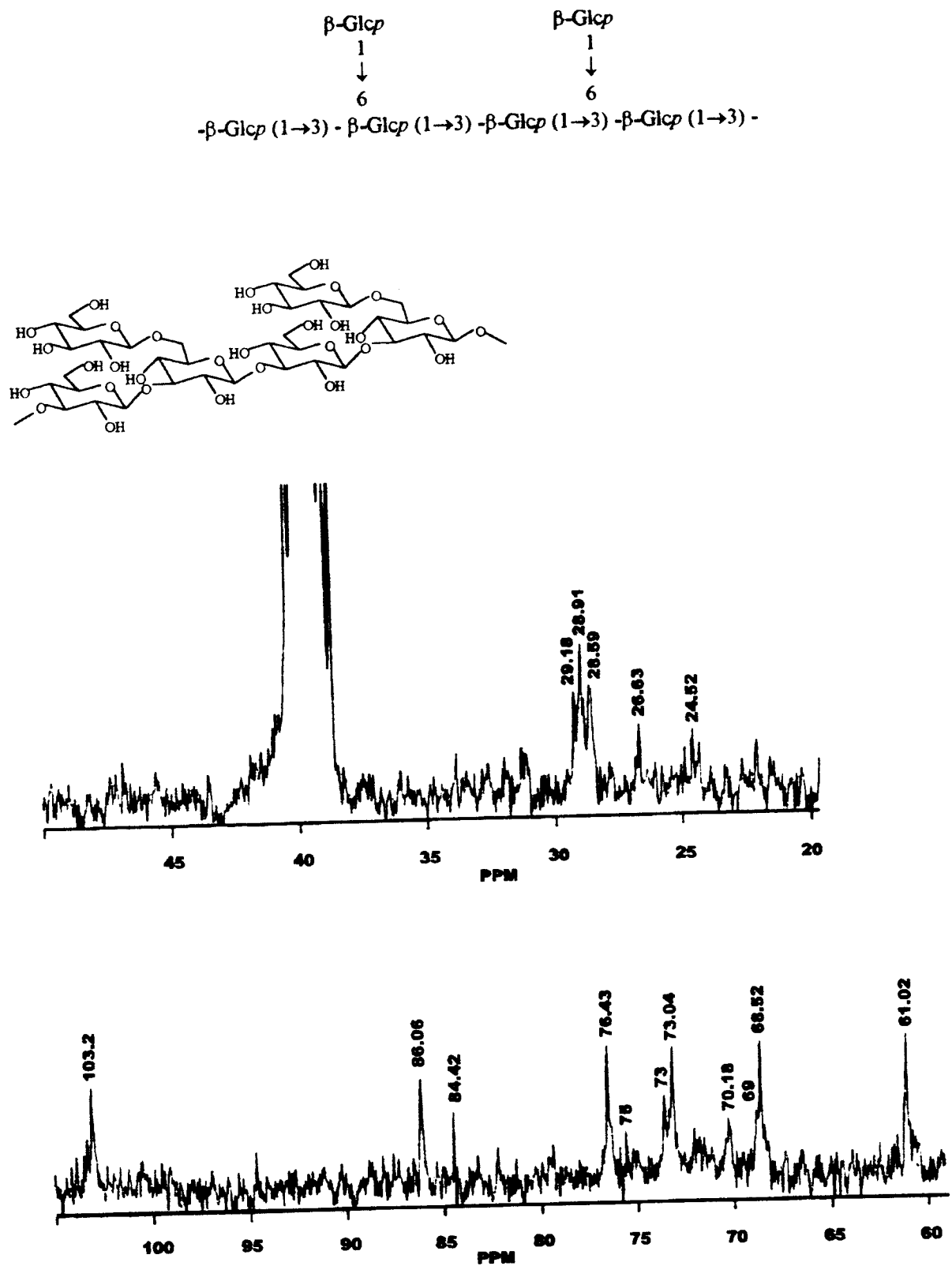


Figura 19 - Espectro de RMN¹³C e estrutura proposta da glucana insolúvel (GII), sinal largo em 39,7 ppm corresponde ao solvente da amostra, DMSO-d₆, 70°C.

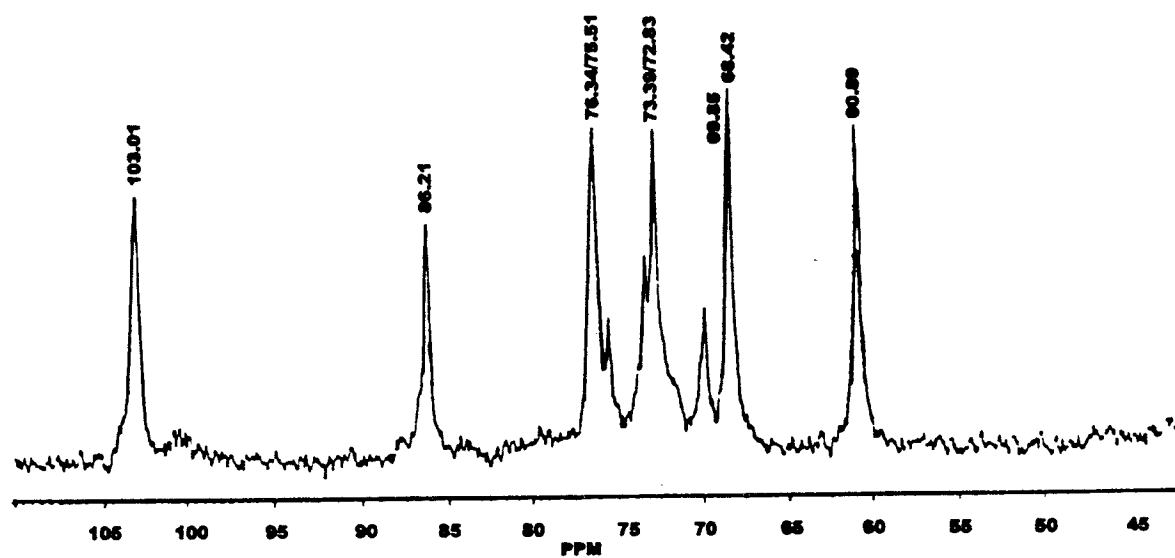


Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C da glucana de *S. cerevisiae* (KOGAN, 1988), DMSO, d_6 , 28°C.

Com relação à extração da glucana insolúvel utilizada por ENSLEY *et al.* (1994), segundo metodologia exposta por WILLIAM *et al.* (1991), fica evidente o tratamento drástico e o baixo rendimento obtido, de apenas 2% em relação a células secas de *S. cerevisiae* (neste trabalho o rendimento equivalente da fração GIR e GII foi cerca de 18%, conforme Tabela 5). No método de extração utilizado por esses autores os carboidratos ácido solúveis foram extraídos por HCl, mas não foram caracterizados.

4.6.8. Glucana ácido solúvel (GACR e GACI)

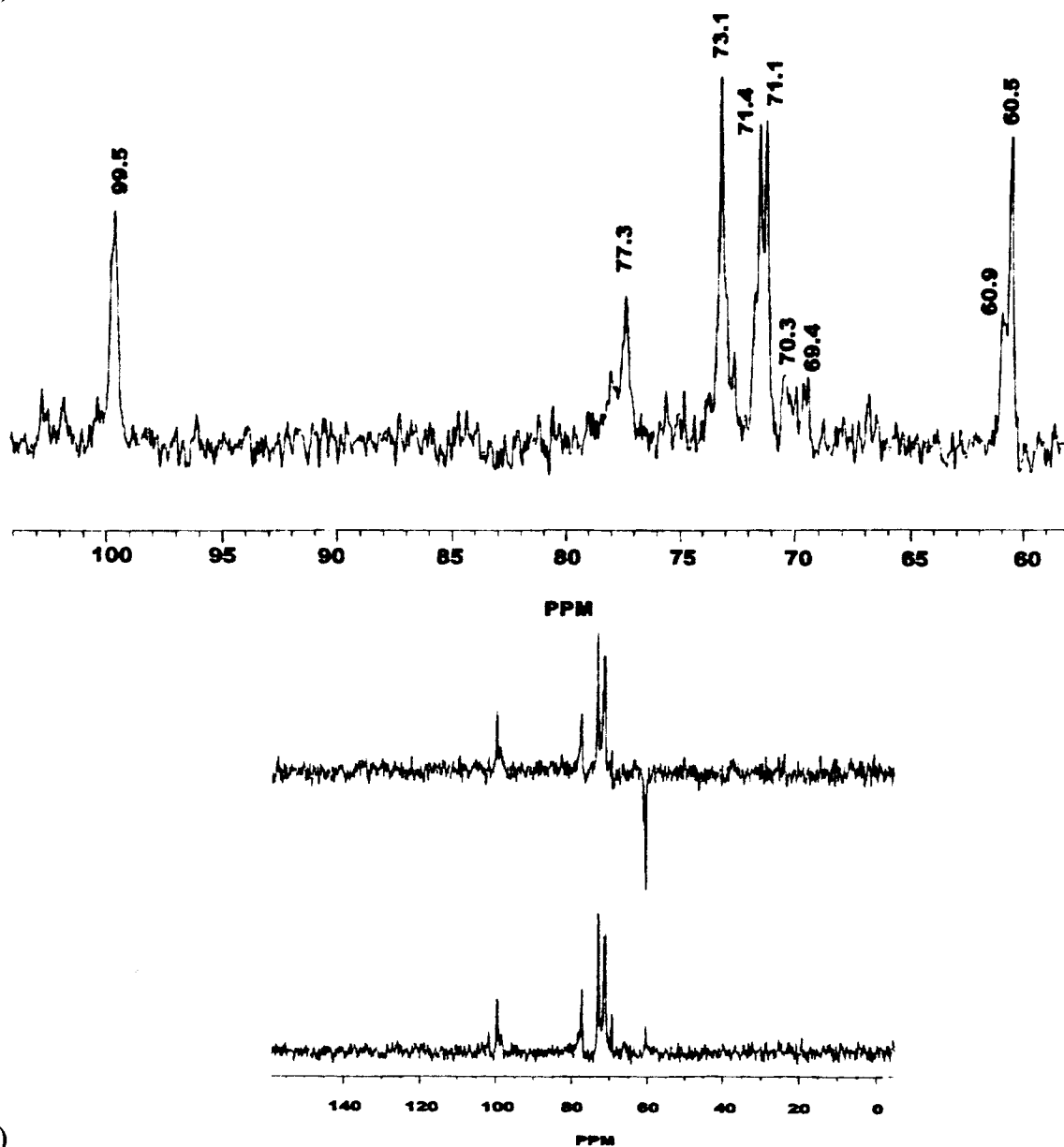
Os sobrenadantes das extrações com ácido continham as frações GACR e GACI (Figura 5). Devido à pequena proporção dessas frações na parede celular, as mesmas não foram purificadas, isto é, não foi eliminado o glicogênio conforme relatado por MANNERS *et al.* (1973a).

O percentual relativo, obtido por CG-EM, das unidades monossacarídicas de manose: glucose: ribose, foi de 52:48:00 para a GACR e de 18:81:00 para a GACI. (Tabela 10). Esta diferença entre as duas amostras foi a mais significativa entre elas neste trabalho; mas sua ocorrência numa fração de mínimas proporções parece também mostrar que as diferenças entre as matérias-primas é bastante reduzida.

As mesmas considerações realizadas na discussão dos resultados para glucana álcali solúvel GALR e GALI (Figura 18) podem ser aplicadas a estas frações, lembrando que seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 21) são bastante similares, e que o relato de presença de glicogênio é dirigido pela literatura para estas frações ácido solúveis.

Em face dos resultados, não foi possível observar a estrutura do polissacarídeo constituinte da parede celular.

(a)



(b)

Figura 21 - (a) Espectro de RMN ^{13}C da glucana ácido solúvel (GACR), isolada da parede celular de *S. cerevisiae*, D_2O , 70°C ; **(b)** DEPT CH_2 (sinal negativo) e CH (sinal positivo).

5 . CONCLUSÕES

O fracionamento e caracterização dos polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* de processo industrial de produção de cerveja, obtida tanto por rompimento mecânico das células em moinho de esferas tipo *Dyno-Mill*, como também de uma amostra de subproduto industrial constituído pela parede celular residual rompida por autólise enzimática no processo de produção de extrato de levedura, permitiu as seguintes conclusões:

1 . A parede celular constituída pelo subproduto industrial do processo de autólise das células de levedura, mostrou características gerais similares e polissacarídeos de estrutura idêntica aos da parede separada por rompimento mecânico, ou seja, mesmo exposta à ação de enzimas nativas e outras (adicionadas para atuar no rompimento da parede celular), esta parede celular é basicamente preservada, embora seja possível observar seu comportamento diferenciado em termos de solubilização e dispersão, durante as etapas de fracionamento. Esta analogia também é observada na comparação com as frações de parede celular descritas pela literatura

2. Para utilização comercial no setor de alimentos, as frações mais abundantes podem apresentar interesse, como as glicoproteínas, mananas e glucanas insolúveis, considerando que o fracionamento adotado permite excelente separação dessas frações brutas e com polissacarídeos principais amplamente majoritários em cada uma delas. A exigência relativa de pureza do produto para fins alimentícios, também leva a sugerir a utilização dessas frações brutas com menor custo de obtenção.

3. A obtenção das frações brutas mais abundantes de glicoproteínas, mananas e glucanas insolúveis da parede celular de *S. cerevisiae*, é efetuada através de processamento que demanda operações simples e poucas etapas, indicando ser tecnicamente viável. A viabilidade econômica, portanto também apresenta boas

possibilidades uma vez que é decorrente do processo e conta ainda com o baixo custo da matéria-prima que provém de subprodutos industriais.

4. A proporção de polissacarídeos nas paredes estudadas diferem bastante dos dados apresentados pela literatura, levando a crer que sofreram efeitos, provavelmente, das condições de crescimento das leveduras no processo industrial de fermentação de cerveja, uma vez que as paredes não diferem significativamente em relação ao processo de obtenção (ruptura mecânica e autólise para obtenção de extrato de levedura).
5. O RNA presente na parede celular extraída está concentrado quase que totalmente na fração A da glicoproteína, ou seja, as demais frações estão praticamente livres deste componente.
6. A amostra de levedura submetida a rompimento mecânico apresentou um rendimento em parede celular em base seca de 30% do peso total da célula.
7. As frações de glicoproteína e glucana insolúvel apresentaram os menores teores em carboidratos totais, em relação às demais frações, com valores médios ao redor de 80%. Nas frações de manana, glucana álcali e ácido solúveis, o teor médio foi de cerca de 92%.
8. Todas as frações isoladas apresentaram proteínas em sua composição, em geral entre 2 a 8% em relação à parede bruta, com exceção da glicoproteína que apresentou 23,5 e 13,3% para PBR e PBI, respectivamente.
9. A glicoproteína, frações GPR e GPI, representam, respectivamente, 16,7 e 11,2%, em relação à parede celular seca. A fração B das glicoproteínas é a mais abundante, representando 56 e 44% da GPR e GPI, respectivamente. O polissacarídeo da fração B, que pode ser considerado a fração de glicoproteína purificada, teve sua estrutura identificada como uma α -D-(1→6) manopirranana 2-

O-substituída, com ramificações α -D-(1→2) manopiranosídicas e uma unidade terminal não redutora α -D-(1→3) manopiranosídica.

10 . A manana, frações MNR e MNI, representam respectivamente, 7,1 e 7,8% da parede celular seca. O polissacarídeo presente foi identificado como uma α -D-(1→6) manopiranana 2-O-substituída, com ramificações α -D-(1→2) manopiranosídicas e uma unidade terminal não redutora α -D-(1→3) manopiranosídica.

11. A glucana insolúvel, frações GIR e GII são majoritárias na composição da parede, representando respectivamente, cerca de 59 e 64% da parede celular seca. O polissacarídeo dessas frações foi identificado como uma glucana β -D-(1→3) glucopiranana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-AL, A.T. H. & PHAFF, H.J. Purification and properties of endo- β -glucanase in the yeast *Hanseniaspora valbyensis*. ***Canadian journal of Microbiology***, **15**(7):697-701, 1969.
- AL-BASSAM, R.; AL-JUMAILY, W.; RAWI, A.A. & SUFFI, F.A. Evaluation of methods of extraction and partial characterization of cell wall carbohydrates of brewer's yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae*. ***Mircen Journal***, **2**: 383-388, 1986.
- AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. ***Methods of Enzimology***, **8**: 115-118, 1966.
- ANDERSON, F.B. & MILLBANK, J.W. Protoplast formation and yeast cell-wall structure. ***Biochemical Journal***, **99**(1): 682-687, 1966.
- AOAC. ***Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists***. Washington, D.C., 12 ed., 1975.
- ARRIOLA, M.C.; ZEPEDA, M. & ROLZ, C. A protein concentrate from distillery yeast, and its application to supplement corn tortillas. ***Archivos Latinoamericanos de Nutrición***, **39**(4): 565-575, 1989.
- ASPINAL, G.O. ***Carbohydrates***. London, Butterworths, 1973. v.7, 283p.
- BACON, J.S.D. Nature and disposition of polyssaccharides within the cell envelope. In: ARNOLD, W.N. ***Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure***. New York, CRC Press, 1970. v.1, p.65-84.
- BACON, J.S.D. & FARMER, V.C. The presence of a predominantly $\beta(1\rightarrow6)$ component in preparations of yeast glucan, ***Biochemistry Journal***, **110**(1): 34P-35P, 1969.

- BALLOU, C.E. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. ***Advances in Microbial and Physiology***, **14**: 93-158, 1976.
- BALLOU, C.E. Some aspects of the structure immunochemistry, and genetic control of yeast mannans. ***Advance in Enzymology***, **40**: 239-270, 1974.
- BARRETO-BERGTER, E. ; TRAVASSOS, L. R. & GORIN, P.A.J. Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component from hyphae of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* spp. ***Carbohydrate Research***, **86**(1): 273-285, 1980.
- BARRETO-BERGTER, E. Chemical structure, Immunology and Application of Polysaccharids of Fungi and Lichens. In: ATTA-UR-RAHAMAN. ***Studies in Natural Products Chemistry.***, Structure Elucidation (part B). New York. Elsevier, 1989. v.5, p. 275-340.
- BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P.A.J & TRAVASSOS, L.R. Cell constituents of mycelia and conidia of *A. fumigatus*. ***Carbohydrate Letters***, **95**(1): 205-218, 1981.
- BARTELT, M.; SHASHKOV, A.S.; KOCCHANOWSKI, B.J. & JANN, K. Structure of the O-specific polysaccharide of the 023 antigen (LPS) from *E. coli*. ***Carbohydrate Research***, **248**: 233-240, 1993.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. ***Annual Review of Microbiology***, **22**: 87-108, 1968.
- BARTNICKI-GARCIA, S. & LIPPMAN, E. Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Muca rouxii*. ***Science***, **165**(1): 302-304, 1969.
- BELCHER, R.A.; NUTTEN, A.J. and SAMBOOK, C.M. The determination of glucosamine. ***Analyst***, **79**(2):201-218, 1954.

- BELL, D.J. & NORTHCOTE, D.H. The structure of cell-wall polysaccharide of baker 's yeast. *Journal of the Chemical Society*, **12**: 1944-1954, Part II. 1950.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Phisiology*, **37**(7): 911-917, 1959.
- CABIB, E. Molecular aspects of yeast morphogenesis . *Annual Review of Microbiology*, **29**: 191-214, 1975.
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.R. & NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(6): 1420-1425, 1988.
- CAWLEY, T.N.; HARRINGTON, M.G. & LETTERS, R. A study of the phosphate linkages in phosphomannan in cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, **129**(2): 711-720, 1972.
- CHEN, S.L. & PEPPLER, H.J. Single cell protein in food applications. In: *Microbial Products in Foods*, 1990.
- COLSON, P.; JEENNINGS, H. & SMITH, I.C.P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Journal of American Chemical Society*, **96**: 8081-8087, 1974.
- CORTRAT, M. MATILE, P. & WIEMKEN, A. Isolation of glucanase-containing vesicles from budding yeast. *Archives of Mikrobiology*, **82**: 189-205, 1972.
- CURRIE, J.A.; DUNNIL, P. & LILLY, M.D. Realease of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitador mill. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**(5): 725-736, 1972.

- DAIS, P. & PERLIN, A.S. ^{13}C .M.R. Spectroscopy of D-glucans. ***Carbohydrate Research***, **100**: 117-130, 1982.
- DELPECH, I.; BIZEAU, C.; BONALY, R. & GALZY, R. E'tude de l'action des genes de la série pli sur la structure de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. ***Annals of Microbiology*** (Inst. Pasteur), **128**: 439-450, 1977.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBER, P.A. & SMITH, E. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. ***Analitical Chemistry***, **28**: 350-356, 1956.
- DZIEZAK, J.A. Yeast and yeast derivates: Applications. ***Food Technology***, **41**(2): 122-125, 1987b.
- DZIEZAK, J.A. Yeasts and yeast derivatives: Applications. ***Food Technology***, **41**(2): 104-121, 1987a.
- E.UA. Pat. 3,867,554 R.W. SUCHER; E.A. ROBBINS & D.R. SIDOTI. ***Yeast glycan and process of making same***, 18 feb. 18, 1975.
- E.UA. Pat. 4, 122, 196 H.R. ROBBINS & R.D. SEELEY. ***Process for the manufacture of yeast glycan***. 24 Oct. 24, 1978.
- E.UA. Pat. 4,285,976 C. AKIN & R.M. MURPHY. ***Methods for accelerating autolysis of Yeast***. 25 aug. 25, 1981.
- EDEBO, L. & MAGNUSSON, K.E. Desintegration of cells and protein recovery. ***Pure Applied Chemistry***, **36**(3): 32 5-338, 1973.
- ENSLEY, H.E.; TOBIAS, B.; PRETUS, H.A.; MCNAMEE, R.B.; JONES, E.L.; BROWDER, W.I. & WILLIAMS, D. L. NMR spectral analysis of a water-insoluble (1→3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. ***Carbohydrate Research***, **258**: 307-311, 1994.

- EVANS, R.B. & MANNERS, D.J. Observations on the purity of some yeast glycogen preparations. *Biochemical Journal*, **125**: 31p-37p, 1971.
- FARNUM, C. & CLELAND, J. Extration of protein from mecanically disrrupted freeze-dried brewer's yeast. *Journal Milk Food Technology*, **38** (2): 219-222, 1975.
- FEDOROVA, N.V. & NEKLYUDOV, A.D. Influence of concentration of yeast biomass and exogenous proteolytic enzymes on intensity of process of autolysis in baker's yeasts. *Applied Biochemistry*, **21**(6): 573-577, 1985.
- FLEET, G.H & MANNERS, D.J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, **94**: 180-192, 1976.
- FLEET, G.H. & MANNERS, D.J. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, **98**(1): 315-327, 1977.
- FOLLOWS, M.; HETHERINGTON, P.J.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. Realease of enzymes from baker's yast by disruption in an industrial homogenizer. *Biotechnology and Bioengineering*, **13**(4): 549-560, 1971.
- FRIEDMAN, M. Protein crosslinking stereochemistry and nomeclature. In: *Protein crosslinking: Nutricional and Medical consequences*. Friedman (Ed.). New York, Plenum Press, 1977. p.1-26.
- GANDER, J.E. Fungal cell wall glycoproteins and peptidio-polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, **28**: 103-109, 1974.
- GAVER, D.V. & HUYGHEBAERT, A. Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bead mill. *Biotechnology and Bioengineering*, **13**: 665-671, aug. 1990.

- GÓMEZ, H.J. & VINIEGRA, G. Extracción del ARN de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones alcalinas suaves. *Revista de la Sociedad de Química*, **21** (3): 97-102, 1977.
- GORIN, P.A.J. ^{13}C -N.M.R. Spectroscopy of polysaccharides. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. New York, Academic Press, 1981. v.38, p.13-14.
- GORIN, P.A.J. Rationalization of Carbon-13 Magnetic Resonance Spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. *Canadian Journal Chemical*, **51**: 2375-2383, 1973.
- GORIN, P.A.J. & BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: *The Polysaccharides*. New York, Academic Press, 1983. v. 2., p. 365-409.
- GORIN, P.A.J. & PERLIN, A.S. A mannan produced by *Saccharomyces rouxii*. *Canadian Journal Chemistry*, **34**: 1796-1803, 1988.
- GUZMÁN-JUÁREZ, M. Yeast Protein. In: HUDSON, B.J.F. *Development in Food Proteins*. London, Applied Science Publishers, 1983. v.2, p.263-291.
- GUZMÁN-JUÁREZ, M. & HUDSON, B.J.F. Yeast protein isolates low in nucleic acids. *Journal Science and Food Agriculture*, **29**(12): 1091, 1978.
- HAIDO, R.M.T. Caracterização química e antigênica de peptidogalactomananas de *Aspergillus fumigatus*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1993. 128p. (Tese de Doutorado).
- HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. *Use of yeast biomass in food production*. New York, CRC Press, 1991. 312p.
- HARRISON, J.S. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The Yeasts*. New York, Academic Press, 1970. v.3, p.529-545.

- HASENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. Immunochemical studies on polysaccharides of yeast. *Journal of Immunology*, **93**(6): 763-771, 1964.
- HAZEN, K.C. & CUTLER, J.E. Optimal conditions for breaking mechanically import yeasts by an inexpensive and simple method. *Mycopathologia*, **80**(2): 113-116, 1982.
- HEBERT, D.; PHILLIPS, P.J. & STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells In: NORRIS, J. R. & RIBBORS, P.W. *Methods in Microbiology*. London, Academic Press, 1971. v. 5B, 695p.
- HEDENSKOG, G. & EBBIGHAUS, L. Reduction of the nucleic acid content of single-cell protein concentrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**(3): 447-457, 1972.
- HEDENSKOG, G.; MOGREN, H.; ENEBO, L.A. A method for obtaining protein concentrates from microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, **12**: 947-952, 1970.
- HELBERT, J.R. Beer. In: PRESCOTT & DUNN'S. *Industrial Microbiology*. New York, AVI, 4^{ed.}, 1982. p.403-467.
- HENDENSKOG, G. & MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, **15**(1): 129-142, 1973.
- HETHERINGTON, P.J.; FOLLOWS, M.; DUNNIL, P. & LILLY, M.D. Realease of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogenizer. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **49**(2): 142-148, 1971.
- HOUG, L. & JONES, J.K.N. Chromatography on paper. *Methods Carbohydrates Chemical*, **1**: 21-31, 1962.
- HOUGH, J.S. *Biotechnología de la Cerveza y de la malta*. Zaragoza, Acribia, 1990. 194p.

- HUANG, Y.T. & KINSELLA, J.E. Phosphorilation of yeast protein: reduction of ribonucleic acid and isolation of yeast protein concentrate. ***Biotechnology and Bioengineering***, **18**: 1690-1698, 1986.
- HUGHES, D.E.; WINPENNY, J.W.T. & LLOYD, D. The desintegration of microorganisms. In: ***Methods in Microbiology***. London, Academic Press, 1971. v. 5B, 695p.
- HUMMEL, W. & KULA, M.R. Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeast. ***Journal of Microbiological Methods***, **9**: 2011-209, 1989.
- JACOB, Z. Yeast Lipids: Extraction, quality analysis, and acceptability. ***Critical Reviews in Biotechnology***, **12**(5/6): 463-491, 1992.
- KALINOWSKI, H.O.; BERGER, S. & BRAUN, S. ***¹³C-NMR- Spektroskopie***. New york, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1984. 685p.
- KIDBY, D.K. & DAVIES, R. Invertase and disulphid bridges in the yeast wall. ***Journal of General Microbiology***, **61**(3): 327-333, 1970.
- KITAMURA, K.; KANEKO, T. & YAMAMOTO, Y. Comunications: Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, **145**(1): 402-407, 1971.
- KNOOR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F. & KINSELLA, J.E. An enzymatic method for yeast autolysis. ***Journal of Food Science***, **44**(5): 1362-1365, 1979.
- KOGAN, G.; ALFOLDI, J. & MASLER, L. ¹³C-N.M.R. Spectoscopic Investigation of Two Yeast cell wall β -D-Glucans. ***Biopolimers***, **27**:1055-1063, 1988.
- LEE, C.H.; TSANG, S.K.; URAKABE, R. & RHA, C.K. Desintegration of dried yeast cells and its effect on protein extractibility, sedimentation property and viscosity of the cell suspension. ***Biotechnology and Bioengineering***, **21**(1):1-17, 1979.

- LINDBLOM, M. & MOGREN, H. Enzymatic RNA reduction in desintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. ***Biotechnology and Bioengineering***, **26**(8): 1123-1133, Aug. 1974.
- LLOYD, K.O. Isolation, characterization, and partial structure of peptidogalactomannans from yeast form of *Cladosporium werneckii*. ***Biochemistry***, **9**(12): 3446-3453, 1970.
- MACWILLIAM, I.C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall - A review. ***Journal of Institute of Brewing***, **76**(4): 524-535, 1970.
- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J. & PATTERSON, J.C. The heterogeneity of glucan preparations from the walls of various yeasts. ***Journal of General Microbiology***, **80**(1): 411-417, 1974.
- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J. & PATTERSON, J.C. The structure of β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. ***Biochemical Journal***, **135**(1):19-30, 1973a.
- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J. & PATTERSON, J.C. The structure of a β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan from yeast cell walls, ***Biochemical Journal***, **135**(1):31-36, 1973b.
- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J. & STURGEON, R. J. An enzymic method for the determination of the degree of polymerisation of glucans. ***Carbohydrate Research***, **17**(1): 109-114, 1971.
- MILLER & PHAFF. On the cell wall composition of the apiculate yeasts. ***Antonie Van Leeuwenhoek***, **24**: 255-238, 1958.
- MILLER, M.W. Yeasts. In: Prescott & Dunn's. ***Industrial Microbiology***, New York. AVI, 4th ed., 1982. p.15-43.
- MISAKI, A.; JOHNSON, J.; KIRKWOOD, S.; SCALETTI, J.V. & SMITH, F. Structure of the cell-wall glucan of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) ***Carbohydrate Research***, **6**: 150-157, 1968.

- MOGREN, H.; LINDBLON, M. & HEDENSKONG, G. Mechanical desintegration of microorganisms in an industrial homogenizer. ***Biotechnology and Bioengineering***, **16**(2): 261-274, 1974.
- MOSQUEIRA, R.G.; HIGGINS, J.J.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. Characteristics of mechanically disrupted bakers' yeast in relation to its separation in industrial centrifuges. ***Biotechnology and Bioengineering***, **23**(2): 335-445, 1981.
- NAUMENKO, N.I. & GORDIENKO, S.V. Study of autolysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. ***Applied Biochemistry Microbiology***, **21**(6): 577-580, 1985.
- NICKERSON, W.J. Chemical composition of cell walls and membranes of yeasts . ***Annals of the New York Academy of Sciences***, **235**:105-108, 1974.
- NICKERSON, W.J. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. IV. Molecular bases of form in yeast . ***Bacteriology Review***, **27**: 305-324, 1963.
- NORTHCOTE, D.H. & HORNE, R.W. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. ***Biochemical Journal***, **51**: 232-236, 1952.
- PEAT, S.; TURVEY, J.R. & EVAN, J.M. Polysaccharides of baker's yeast. Part III. The presence of 1:6-linkages in yeast glucan. ***Journal of the Chemical Society***, **38**: 3868-3872, Part 4, 1958b.
- PEAT, S.; WHELAN, W.J. & EDWARDS, T.E. Polysaccharides of baker's yeast. Part II. Yeast glucan. ***Journal of the Chemical Society***, **38**: 3862-3867, Part 4, 1958a.
- PHAFF, H.J. Enzymatic yeast cell wall degradation. ***Advance Chemical Serology***, **160**: 244-282, 1977.

- PHAFF, H.J. Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope In: ROSE, A.H. & HARRINSON, J.S. **The Yeast**. New York, Academic Press, 1971. v.2p, 135-210.
- POWER, D.M. & CHALLINOR, S.W. The effects of inositol-deficiency on the chemical composition of the yeast cell wall. **Journal of General Microbiology**, **55**: 169-176, 1969.
- PREVIATO, J.O. **Estudo da parede celular de *Sporothrix schenckii***. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978. 113p. (Tese de Doutorado).
- REED, G. & PEPPLER, H.J. Yeast-Derived Products. In: **Yeast Technology**, New York, AVI, 1973. p.355-366.
- REED, G. & NAGODAWITHANA. Yeast derived product. In: **Yeast Technology**. New York, AVI Book, 1991. p. 369-412.
- REISINGER, O.; AL-BASSAM, R.; BIZEAU, P.; BONALY, R. & GALZY, P. Ultrastructure study of a wild strain and three mutants of a wild strain and three mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. **Cellular and Molecular Biology**, **26**(2): 227-233, 1980.
- REISS, E.; HEARN, V.M.; POULAIN, D. & SHEPHERD, M.G. Structure and function of the fungal cell wall. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Supplement1, **30**: 143-156, 1992.
- REUVERS, T.; TACORONTE, E., GARCIA MEDOZA, C. & NOVAES-LEDIEU, M. Chemical composition of cell walls of *Saccharomyces fragilis*. **Canadian Journal of Microbiology**, **15**(9): 989-993, 1969.
- ROBBINS, E.A. & SEELEY, R.D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal of Food Science**, **42**(3): 694-698, 1977.
- ROEHRING, K.L. Specialized uses of carbohydrates. In: **Carbohydrate Biochemistry and Methabolism**. New York, AVI, 1984. p. 193-199.

- ROSE, A.H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. ***Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 74(22): 110S-118S, 1993.**
- SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative determination of monossaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. ***Analitical Chemistry*, 20: 41-50, 1965.**
- SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. Effect of thiol reagents on extractibility of protein from yeast. ***Biotechnology and Bioengineering*, 20(5): 755-766, 1978.**
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C. & MORRIL, T.C. ***Identificação espectrométrica de compostos orgânicos***. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. 278p.
- SPENCER, J.F.T. & GORIN, P.A.J. Biotechnology Review: Mannose-containing polysaccharides of yeasts. ***Biotechnology and Bioengineering*, 15: 1-12, 1973.**
- STEWART, T.S. & BALLOU, C.E. A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. ***Biochemistry*, 7: 1855-1863, 1968.**
- SUGIMOTO, H. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food grade yeast extracts. ***Journal of Food Science*, 39(5): 939-942, 1974.**
- TANAKA, H. & PHAFF, H.J. Enzimatic hidrolisis of yeast cell walls. ***Journal of Bacteriology*, 89(6): 1570-1580, 1965.**
- TREVELYAN, W.E. Chemical methods for the reduction of the purine content of baker's yeast, a form of SPC, ***Journal of Science of Food and Agriculture*, 27(3): 25-30, 1976a.**
- TREVELYAN, W.E. & PROCTER, D.P.J.S. Detection of sugar in paper chromatogram. ***Nature*, 166(4219): 444-445, 1950.**

- TREVELYAN, W.E. Autolytic methods for the reduction of the purine content of baker's yeast, a form of SCP. *Journal Science and Food Agriculture*, **27**(8): 753-762, 1976b.
- VOET, D. & VOET, J.G. **Biochemistry**. New York, John Wiley & Sons, INC. 2nd ed. 1995. 1361p.
- VUKOVIC', R. & MRSA, V. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Croatica Chemica Acta*, **68** (3): 597-605, 1995.
- VUKOVIC', R.; HUNDINA-DOMLADOVEC, M. & MRSA, V. Molecular organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Prehrambeno-Tehnology Review*, **32**: (2-3) 99-102, 1994.
- WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R.B.; JONES, E.L.; PRETUS, H.A.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.I. & LUZIO, N.R.D. A method for the solubilization of a (1→3)-β-D- glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*, **219**: 203-213, 1991.
- WILLIAMS, D.L.; PRETUS, H.A.; JONES, E.L.; ENSLEY, H.E. & BROWDER, W.I. Development of a water-soluble, sulfated (1→3)-β-D- glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*, **235**: 247-257, 1992.