República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016028658-1 A2

(22) Data do Depósito: 06/12/2016

(43) Data da Publicação: 17/07/2018

(54) Título: PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS, PAREDE CELULAR, MANANAS E ¿-GLUCANAS

(51) Int. Cl.: C12P 19/34; C12P 19/04; C12N 9/14; C12R 1/865

(73) Titular(es): CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES POSITIVO LTDA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, BIO4 SOLUÇÕES BIOTECNOLÓGICAS LTDA. - ME

(72) Inventor(es): MIGUEL DANIEL NOSEDA; LEILA TERESINHA MARANHO; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA; ALAN GUILHERME GONÇALVES; MARCELO CALIDE BARGA; JULIANA TEODORO; JENIFER MOTA RODRIGUES; CLAUDIA CRISTINA FERREIRA SENA; MAX INGBERMAN

(74) Procurador(es): BARIL & ADVOGADOS ASSOCIADOS

(57) Resumo: A presente patente de invenção trata de um processo para obter quatro subprodutos de leveduras empregadas em usinas sucroalcooleiras e indústrias cervejeiras: (i) uma fração rica em 5?-ribonucleotídeos, (ii) parede celular (casca), (iii) mananas equivalentes a MOS comercial e (iv) ß-glucanas, permitindo obter, em forma sequencial após autólise das leveduras, quatro distintos produtos: uma fração solúvel contendo 5?-ribonucleotídeos e outra insolúvel com a parede celular (casca), que a partir de extrações origina uma fração solúvel rica em mananas e uma fração insolúvel rica em ß-glucanas, todas com elevada atividade de ligação a bactérias enteropatogênicas e atividade imunoestimulante quando aplicadas em ração animal.

FIGURA 2

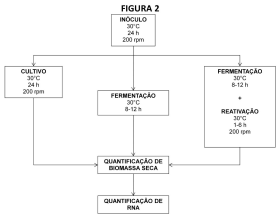
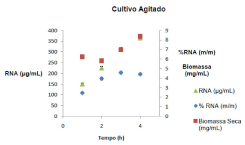


FIGURA 3



RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS, PAREDE CELULAR, MANANAS E B-GLUCANAS

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de processos fermentativos, mais especificamente de processos de obtenção de subprodutos da indústria sucroalcooleira, mais especificamente um processo que possui a finalidade de produzir sequencialmente ribonucleotídeos, parede celular, mananas e ß-glucanas de leveduras para uso na indústria alimentícia a partir de processos fermentativos que utilizam micro-organismos, incluindo leveduras utilizadas na indústria sucroalcooleira.

Histórico da invenção

Produção de etanol

[002] O processo de produção de etanol no Brasil consiste, basicamente, das seguintes etapas: lavagem da cana, extração do caldo, tratamento do caldo para produção de álcool, fermentação, destilação do vinho, retificação e desidratação.

[003] Antes da moagem, a cana é lavada nas mesas alimentadoras para retirar a terra proveniente da lavoura, passando, em seguida, por picadores que trituram os colmos, preparando-a para a moagem. Neste processo, a maior parte das células da cana é aberta sem perda do caldo. Após o preparo, a cana desfibrada é enviada à moenda para extrair o caldo. Este processo é repetido, adicionando-se água numa proporção de 30% (v/v). Esta etapa é denominada “embebição composta”, cuja função é embeber o interior das células da cana, diluindo o açúcar ali existente e com isso aumentando a eficiência da extração.

[004] Em seguida, é realizado o tratamento do caldo, o qual consiste em uma

série de operações: peneiramento, calagem, aquecimento, decantação e filtração. O objetivo do tratamento de caldo é eliminar impurezas, que seriam prejudiciais às outras etapas do processo. Depois do peneiramento, é adicionado cal (CaO) ao caldo de cana. Certos compostos, sob a ação da cal, se tornam insolúveis, sendo eliminados pela filtração. Outros, sob ação combinada da cal e do calor, são decompostos e os produtos de decomposição são eliminados parcialmente. Outra função da cal é neutralizar os ácidos livres presentes, para que não invertam (hidrolisem) a sacarose quando se aplica calor.

[005] Na sequência, é feito o aquecimento do caldo, a 115°C, em trocadores de calor, sendo mandado ao clarificador, com tempo de residência de 3h. Esse tratamento favorece a fermentação posterior por esterilizar o caldo das bactérias e leveduras que concorreriam com a levedura no processo de fermentação, além de ser empregado para concentrar os açúcares presentes no caldo.

[006] Esse caldo clarificado é utilizado na composição do mosto de fermentação, composto também de melaço e água. Ele é resfriado a 30°C em trocadores de calor de placas e enviado às dornas de fermentação.

[007] É na fermentação que ocorre a transformação dos açúcares em etanol. Para tanto, utiliza-se levedura do gênero *Saccharomyces*, a qual realizará essa conversão, resultando em etanol, gás carbônico e calor. Atualmente, existem quatro leveduras comerciais, isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica e identificadas como PE2, CAT1, BG1 e SA1, sendo que as leveduras PE2 e CAT1 foram selecionadas pela empresa Fermentec e as outras duas pela empresa Copersucar na década de 90. Atualmente, PE2 e CAT1 representam 80% das leveduras de origem industrial, comercializadas para as destilarias brasileiras. Estas unidades industriais são responsáveis por cerca de 60% de todo álcool produzido no país (BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. & LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.FEMS Yeast Research, v. 8,

p. 1155–1163, 2008).

[008] A fermentação ocorre entre 28°C e 32°C, durante 7h a 12h. O mosto fermentado é denominado vinho, o qual contém cerca de 9,5% de etanol.

[009] Após a fermentação, a levedura é recuperada pelo processo de centrifugação do vinho. O vinho, já sem a levedura, segue para a destilaria, onde o álcool é separado, concentrado e purificado. Já a levedura, em concentração de 60% (m/v), tem dois destinos: uma parte é enviada para as cubas de tratamento, onde é diluída a 25% (m/v) com adição de água e o pH é regulado em torno de 2,5 adicionando ácido sulfúrico, o qual possui efeito desfloculante e bacteriostático, retornando, em seguida para uma nova fermentação; outra parte é desviada no processo denominado de sangria, cuja função é diminuir a densidade celular inicial da fermentação. A quantidade de levedura obtida na sangria é expressiva, em torno de 20g/L -30g/L de álcool produzido.

[010] O processo de fermentação alcoólica no Brasil, exposto acima, difere bastante quando comparado com outros países, uma vez que as leveduras são intensamente recicladas durante a safra (AMORIM, H.V. & LEÃO, R.M. Fermentação Alcoolica: Ciência e Tecnologia. 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comércio de Livros Ltda., p. 443, 2005). Acima de 90% da biomassa de leveduras é reutilizada de uma fermentação para outra, o que leva à formação de altas densidades celulares no interior das dornas (maior que $1x10^8$células/mL). Isso reduz consideravelmente o tempo de fermentação em comparação com os processos que não reciclam as leveduras. Desta forma, as destilarias brasileiras podem processar um volume maior de mosto em menos tempo e aumentar a produtividade em relação à capacidade instalada.

[011] Nos Estados Unidos, por exemplo, a maioria dos produtores de etanol, especialmente os novos produtores, optou pela “rota seca” para fermentação, ou seja, não é feita a separação dos grãos de milho e do líquido a ser fermentado,

e, ao final do processo de fermentação, separa-se o “vinho” a ser destilado dos grãos úmidos mesclados com a levedura usada na fermentação. Dentro da “rota seca” não é possível fazer a separação dos grãos residuais da fermentação e da levedura. Este resíduo é seco e transforma-se no DDGS – *Dried Distiller’s Grains and Solubles* (AMORIM, H.V. & LOPES, M. L. Tecnologia Sobre Processamento De Leveduras Vivas, Inativas E Seus Derivados: Conceitos BásicosIn: Anais do I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, p. 5-20, 2009). Isso reflete no custo final de produção, enquanto o custo de produção do etanol de cana é de US$ 0,28/L, o de milho, por exemplo, é de US$ 0,45/L, como é possível observar na TABELA 1.

[012] A produção de leveduras inativas secas no Brasil é de cerca de 75.000t/ano, e tem crescido a uma taxa de 4% a.a. O potencial de produção de levedura seca pela indústria de etanol, considerando a tecnologia e produção presente, é de cerca de 500.000t/ano. Ou seja, atualmente aproveitam-se apenas 15% das leveduras disponíveis para processamento (SANTOS, G.D. Perspectivas brasileira e mundial da produção de leveduras. In: Anais do I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, p. 1-4, 2009).

[013] Essa biomassa excedente é empregada em sua maioria na forma de 4 produtos: levedura alimentícia, levedura autolisada, extrato de levedura e parede celular. A levedura alimentícia é obtida por inativação do fermento pelo calor, eliminando a atividade fermentativa, sendo rica em vitaminas do grupo B (B1, B2, PP, B5, B6), além de ferro, zinco e selênio. Ela é usada principalmente como ingrediente alimentar (rica em proteínas, vitaminas e minerais), como base para temperos e alimentos industrializados. A levedura autolisada é obtida por ruptura das células, seja por autodigestão enzimática ou pela adição

de ácidos, sais ou enzimas. O produto consiste de uma mistura de parede celular e conteúdo citoplasmático, sendo empregado para melhorar o aroma de lanches, biscoitos e salgados. A melhora no sabor deve-se ao alto conteúdo de ácido nucléico: os nucleotídeos acentuam os efeitos do ácido glutâmico utilizado para realçar os sabores. Já o extrato de levedura é obtido pela separação dos componentes solúveis das células, obtidos após a autólise, em condições controladas de temperatura e pH. Após concentração e pasteurização, o extrato de leveduras pode ser comercializado na forma líquida (50%-60% de matéria seca), em pasta (70%-80% de matéria seca) ou seco em *spray-dryer*. O extrato de levedura é composto principalmente por aminoácidos, peptídeos, carboidratos e minerais. Sua produção industrial teve início na década de 50. Basicamente, existem duas aplicações principais para o extrato de leveduras. A primeira é o uso como ingrediente em alimentos salgados, reforçando o sabor e o aroma de diversos produtos como sopas, molhos e carnes entre outros. A segunda aplicação é como fonte de nitrogênio, vitaminas e outros fatores de crescimento para meios de cultivo. Por fim, a parede celular é um componente estrutural da levedura, a qual confere características de forma e rigidez à célula, sendo ela a fração insolúvel obtida após a hidrólise das células. Sua maior aplicação é na indústria de rações (EURASYP – European Association for Specialty Yeast Products. Disponível on-line em: http://www.eurasyp.org. Acessado em 20 de setembro de 2010).

[014] A aplicação das leveduras excedentes da destilaria em outros setores mostra o potencial mercado desses produtos. Porém, o produto vendido ainda é de baixo valor agregado, principalmente quando se trata da levedura seca, o que não contribui de maneira significativa para o equilíbrio financeiro das destilarias, pois muitas usinas alegam que a secagem das leveduras inibe a co-

geração de energia. Algumas apontam que deixam de gerar R$750,00 por tonelada de levedura seca em perda de faturamento em energia elétrica (SANTOS, G.D. Perspectivas brasileira e mundial da produção de leveduras. In: Anais do I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, p. 1-4, 2009).

Tabela 1: comparação entre a produção de etanol de milho nos EUA e de cana-de-açúcar no Brasil. Fonte: ANDREOLI, C., SOUZA, S.P. Cana-de-açúcar: a Melhor alternativa para conversão da energia solar e Fóssil em Etanol. Economia & Energia, Ano X, n.59, 2007.

Parâmetro	Unidades	Cana-de-açúcar	Milho
Produção[1]	milhões ton	386,5	282,0
Rendimento	ton/ha	90,0	8,1
Energia Exigida	kcal x 1000	10.509	8.115
Energia entrada:saída	kcal	1: 4,60	1: 3,84
Produção de álcool	litros/ha	8.100	3.000
Produção de álcool	litros/t	90	371
Taxa de Conversão	kg/1000L	11.110	2.690
Gasto de Energia Total	kcal/1000L	1.518.000	6.597.000
Produção Total Atual	bilhões L	15,8	17,2
Balanço de Energia[2]	kcal input:output	1:3,24	1:1,29
Custo de Produção	US$/L	0,28	0,45
Preço de Venda	US$/L	0,42	0,92
Número de Usinas[3]	Unidade	140	101
Subsídio	US$ bilhões/ano	_	$4,1

[1] 50% da produção da cana é destinada para a produção de álcool no Brasil e 20% do milho nos Estados Unidos

[2] O balanço de energia do etanol de cana-de-açúcar é positivo e o de milho é negativo

[3] Novas unidades: 89 no Brasil e 40 nos EUA

Leveduras provenientes da produção de etanol

[015] Também, o crescimento na produção de leveduras tem sido lento até como uma resposta à demanda de mercado: não existe uma demanda clara para as leveduras, visto que o mercado ainda necessita de convicção sobre os benefícios extra-nutricionais que a levedura inativa oferece. O crescimento da utilização de leveduras oriundas da fermentação de etanol de cana dependerá da agregação de valor ao produto, explorando-se novos mercados e fatores, como a alta concentração de β-glucanas e MOS e o seu conteúdo citoplasmático (SANTOS, G.D. Perspectivas brasileira e mundial da produção de leveduras. In: Anais do I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, p. 1-4, 2009). As possíveis utilizações da biomassa de levedura tendem para a obtenção de compostos flavorizantes, β-glucanas, enzimas e para a detoxificação de tintas e metais em efluentes (FERREIRA, I. M. P. L. V. O., PINHO, O., VIEIRA, E., TAVARELA, J. G. Brewer's Saccharomyces yeast biomass characteristics and potential applications. Trends in Food Science & Technology, v. 21, p. 77-84, 2010).

[016] A obtenção desses compostos pode ser realizada de diferentes partes da levedura. Quando hidrolisada e centrifugada, a levedura pode ser separada em duas partes: uma, insolúvel, que se constitui na parede celular, de onde se retiram os polissacarídeos, e outra, solúvel, que corresponde ao conteúdo citoplasmático, onde são encontrados os ácidos nucléicos - DNA e RNA, e proteínas. O QUADRO 1 resume os principais compostos das leveduras.

[017] Estudos da parede celular de *S. cerevisiae* revelam a seguinte composição: glucana (48%-60%) - polímero de unidades de glucose com ligações β-(1→3) e β-(1→6), manoproteínas (20%-23%), quitina (0,6%-2,7%) - polímero composto por β-(1→4) N-acetilglucosamina e uma pequena porção de lipídios (FLEET, G. H.

Composition and structure of yeast cell walls. Current Topics in Medical Mycology, v. 1, n. 1, p. 24-24, 1985; KLIS, F. M. Review: cell wall assembly in yeast. Yeast, v. 10, n. 7, p. 851-869, 1994). Estes componentes estão distribuídos em duas camadas principais, sendo a externa composta de manoproteínas e a interna de glucana e quitina, em uma estrutura interconectada por ligações covalentes (LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. Journal of Bacteriology. v. 180, n.15, p. 3735–3740,1998).

Quadro 1: Principais componentes das células de levedura. Fonte: FELDMANN, H. Yeast molecular biology. Adolf-Butenandt-Institute – Universidade de Munique, 2007.

Classe de Macromoléculas	**Categorias**	**Principais Componentes**
Proteínas	Estrutural	Actinas, tubulina, histonas e proteínas ribossomais
	Hormônios	α e a ferormônios
	Enzimas	Proteases, nucleases, glicosidases
Glicoproteínas	Componentes da parede celular	Manoproteínas
	Enzimas	Enzimas funcionais (invertase)
Polissacarídeos / oligossacarídeos	Componentes da parede celular	Glucana, manana, quitina
	Componentes capsulares	
	Reserva	Glicogênio, trealose
Polifosfatos	Reserva	Polifosfatos no vacuolo
Lipídios	Estrutural	Esteróis livres na membrana
	Reserva	Ésteres de esteróis e Triglicerídeos
	Funcional	Derivados de fosfoglicerídeos, ácidos graxos livres
Ácidos Nucléicos	DNA	DNA genômico (80%) DNA mitocondrial (20%)
	RNA	rRNA (80%), tRNA, mRNA, snRNA

[018] A camada externa de manoproteínas retém as proteínas periplasmáticas, conferindo resistência às células vivas de leveduras e limitando o acesso de enzimas externas, como aquelas elaboradas por outros microrganismos. Em contrapartida, a camada de glucana entrelaçada por fibrilas de quitina, adjacente à

membrana plasmática, mantém a rigidez e a forma da célula (KAPTEYN, J. C.; RAM, A. F.; GROOS, E. M.; KOLLAR, R.; MONTIJN, R. C.; VAN DEN ENDE, H.; LLOBELL, A. A.; CABIB, E.; KLIS, F. M. Altered extent of cross-linking of β-1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β-1,3-glucan content. Journal of Bacteriology, v. 179, n. 20, p. 6279-6284, 1997).

[019] Já as partes solúveis, os extratos de leveduras, representam concentrados de componentes solúveis das células de levedura, principalmente aminoácidos, polissacarídeos e nucleotídeos, obtidos por processos autolíticos, plasmolíticos ou físico-químicos (BÉHALOVÁ, B.; BLÁHOVÁ, M.; SILLINGER, V.; MACHEK, F. Comparison of various ways if extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. Acta Biotecnologica, v. 11, p. 547-552, 1991).

Autólise

[020] Uma das formas de se obter os componentes da levedura é por meio do processo de autólise. Assim que a fermentação é terminada, a viabilidade das leveduras diminui drasticamente e elas começam, então, a sofrer o processo de autólise. A levedura é limitada a retirar nutrientes a partir da sua própria reserva, o glicogênio e as proteínas. Assim, duas fases podem ser percebidas na autólise: a primeira é a utilização do glicogênio e a segunda, a proteólise de suas próprias substâncias protéicas.

[021] As glicogenases da levedura atuam sobre o glicogênio e causam a "autofermentação". Os principais produtos formados nessas condições são: álcool, dióxido de carbono, glicerol e ácido succínico. Ao mesmo tempo, a levedura, por meio das proteases intracelulares, ataca seus próprios materiais protéicos, liberando tirosina, leucina, lisina e outros aminoácidos, como produtos de digestão (GUILLERMOND, A. Yeasts: Culture, Identification & Microbiology. Wexford

College Press, 2003).

[022] A maneira como o processo de autólise acontece depende das enzimas formadas e que atuam na célula quando ela é submetida a uma condição de inanição. A autólise das células de levedura ocorre após elas terem completado o seu ciclo de vida e entrado na fase de morte. Ela é caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana, alteração na porosidade da célula, hidrólise das macromoléculas da célula por enzimas endógenas e subsequente liberação dos produtos de degradação para o ambiente extracelular. Apesar de ser um evento natural, a autólise pode ser induzida pela exposição das leveduras a temperaturas elevadas (40-60°C), solventes orgânicos ou detergentes (ALEXANDRE, H. Autolysis of Yeasts.Comprehensive biotechnology, n. 2, v. 2, p. 641-649, 2011).

RNA e ribonucleotídeos

[023] Ribonucleotídeos são produtos da hidrólise das moléculas de RNA da levedura, os quais apresentam alto valor agregado e diversas aplicações. Derivados de ribonucleotídeos, como nucleosídeos e bases livres, têm sido relatados como compostos com efeitos terapêuticos. Tanto o espectro amplo quanto o específico de atividade anti-RNA viral foram documentados em nucleosídeos de hipoxantina (BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. Food Science and Technology International, v. 3, p. 437-, 1997). A suplementação de extratos de leveduras de cervejaria ricas em RNA promove a proteção contra infecções bacterianas e aumenta as funções imunológicas (BURMEITER, G.; RAINSFORD, K. D. Discriminating effects of a nucleotide-rich yeast extract probioticum, as an immunomodulator contrasted with actions in chronic immuno-inflammatory disease (adjuvant-induced arthritis) in rodents. Inflammopharmacology, v. 1, p. 161-183, 1991). A adição de nu-

cleotídeos em ração animal é responsável por prover células em divisão com moléculas utilizadas na síntese de DNA e RNA, fato com importância relevante na resposta imune, já que as células do sistema imune geralmente não possuem a capacidade de produzir nucleotídeos.

[024] Resultados de experimentos in vivo, adicionando-se nucleotídeos à dieta, mostram melhora na morfologia do intestino e desempenho dos animais, como é possível observar nos trabalhos realizados com leitões (YU, I.T., WU, J.F., YANG, P.C., LIU, C.Y., LEE, D.N AND YEN, H.T. Roles of glutamine and nucleotides in combination on growth, immune responses and FMD antibody titres of weaned pigs. Animal Science, v. 75, p. 379-385, 2002) e frangos (SANTOS, G.D. Perspectivas brasileira e mundial da produção de leveduras. In: Anais do I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, p. 1-4, 2009).

[025] Outra, e majoritária, aplicação dos nucleotídeos é como ingrediente em alguns alimentos, para aumentar a resposta sensorial a eles, relacionada ao sabor umami, o quinto sabor, além do doce, azedo, salgado e amargo (YAMAGOUCHI, S.; NINOMIYA, K. Umami and Food Palatability. The Journal of Nutrition, v. 130, n. 4, p. 921-926, 2000). Porém, não são todos os nucleotídeos que apresentam tal propriedade. Os mais apropriados são aqueles que possuem um núcleo de purina e uma ribose esterificada com ácido fosfórico na posição 5’, como o inosina 5’-monofosfato (IMP) e guanosina 5’-monofosfato (GMP).

[026] Os processos de produção dos nucleotídeos 5'-IMP e 5'-GMP por hidrólise enzimática do RNA de leveduras foram desenvolvidos no Japão em 1959. Esse tipo de produto começou a ser comercializado em 1961 (RÉVILLION, J. P., BRANDELLI, A., AYUB, M. A.Z.; Produção de Extratos de Leveduras de Uso Alimentar a Partir do Soro de Queijo: Abordagem de Elementos Técnicos e Mercadológicos Relevantes. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, n. 2, 2000). Nesse país, a

produção anual de componentes realçadores de sabor em 2003, incluindo aqueles com baixo e alto teor de nucleotídeo, foi de 5300 toneladas, sendo 2400 toneladas destinadas à exportação (AMANO.Nucleic Acid Seasonig, 2003. Disponível em http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/wave_e/vol9/vol9_main.pdf. Acesso em 25 de março de 2010).

[027] Mundialmente, a venda de realçadores de sabor supera o valor de US$ 1,1 bilhão ao ano. Há muitas razões para esse elevado consumo: além de melhorar a qualidade do aroma, os realçadores maximizam a sensação de sabor a um baixo custo (MEROLLI, A. Flavor Enhancement: Taking a Closer Look. Food Product Design, v. 12 p. 31-51, 1997). O desejo do consumidor por alimentos de baixo ou nenhum teor de gordura também incentiva o mercado de realçadores de sabor, pois sabe-se que a gordura aumenta as respostas neurofisiológicas, retendo os componentes voláteis do aroma, consequentemente o uso de realçadores de sabor é recomendado em produtos de baixo teor de gordura (RÉVILLION, J. P., BRANDELLI, A., AYUB, M. A.Z.; Produção de Extratos de Leveduras de Uso Alimentar a Partir do Soro de Queijo: Abordagem de Elementos Técnicos e Mercadológicos Relevantes. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, n. 2, 2000). Tais produtos abrangem embutidos, biscoitos, sopas, snacks, molhos e derivados de tomate.

[028] De acordo com a Ajinomoto, a demanda global por nucleotídeos, em 2009, foi de aproximadamente 23.000 toneladas, sendo ela a empresa responsável pelo fornecimento de 40% do mercado. O crescimento desse mercado acompanha a expansão do mercado de alimentos processados e o aumento da utilização dos realçadores de sabor. Dessa forma, é esperado que ocorra uma expansão de 8% ao ano na demanda desses produtos (FLEXNEWS - Global Demand for MSG and Nucleotides Continues to Grow, Says Ajinomoto. Disponível em

http://www.thefreelibrary.com/Global+Demand+for+MSG+and+Nucleotides+Continuesto+Grow%2c+Says...-a0238767885 Acessado em 20 de março de 2011). Além da Ajinomoto, outras empresas produtoras de nucleotídeos são: CJ Group, DaesangGroup, KirinKyowaFoodsCompany, Limited, Star Lake Bioscience.

Polissacarídeos e MOS

[029] A parede celular das leveduras é composta, predominantemente, de dois polissacarídeos: β-D-glucana e manana. As β-D-glucanas são homopolímeros de glucose, constituintes da parede celular de cereais, fungos e leveduras. São moléculas altamente ordenadas, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de β-D-glucopiranose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for β-glucans. Nature, London, v. 413, n. 1, p. 36-36, 2001).

[030] A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é uma fonte importante desses polissacarídeos, os quais representam até 20% do peso seco da célula. Quase 60% desse montante correspondem a β-glucanas com ligação (1→3) e (1→6) (KLIS, F. M., MOL, P., HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, v. 26, p. 239–256, 2002). Quanto à solubilidade em álcali, duas frações de β-(1→3) glucana são encontradas na parede celular de *S. cerevisiae*, sendo uma solúvel e outra insolúvel. A porção insolúvel contém de 3% a 6% de ramificações unidas em β-(1→6) e representa o maior componente da parede. A porção solúvel, que representa de 15% a 20% das β-glucanas, tem estrutura semelhante à insolúvel, porém com maior número de ramificações β-(1→6) (MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. A.; BJORNDAL, H.; LINDBERG, B. The structure of a β-(1-6)-D-glucan from yeast cell walls. Biochemistry Journal, v. 135, n. 1, p. 31-36, 1973).

A ligação entre os heteropolímeros de glucana β-(1→3)/β-(1→6), alcalino-solúveis em *S. cerevisiae*, e o resíduo terminal redutor da quitina faz com que o polissacarídeo se torne insolúvel (KAPTEYN, J. C.; RAM, A. F.; GROOS, E. M.; KOLLAR, R.; MONTIJN, R. C.; VAN DEN ENDE, H.; LLOBELL, A. A.; CABIB, E.; KLIS, F. M. Altered extent of cross-linking of β-1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β-1,3-glucan content. Journal of Bacteriology, v. 179, n. 20, p. 6279-6284, 1997). As β-(1→3)-glucanas têm tamanho estimado de 1500 resíduos de glucose e as β-(1→6)-glucanas apresentam de 150 a 200 resíduos e, na parede de *S. cerevisiae*, são rearranjadas por ramificações introduzidas por glicosiltransferases (STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. Yeast, v. 10, n. 13, p. 1741-1752, 1994).

[031] A manana de levedura é o segundo polissacarídeo em importância quantitativa na parede celular. Esse polissacarídeo está ligado a proteínas da parede, e ao ser extraído da parede celular de *S. cerevisiae*, a fração de manoproteínas apresenta 5% de glucose, 93% de manose e 2% de N-acetilglucosamina (NGUYEN, T.H.; FLEET, G.H.; ROGERS, P.L. Composition of the cell walls of several yeast species. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, n. 2, p. 206-212, 1998). Quanto à sua estrutura, atualmente existe concordância de que a cadeia principal é formada por unidades de manose ligadas α-(1→6); as cadeias laterais são de manose ligadas à cadeia central com ligação α-(1→2); também há relatos de ligações α-(1→3) na cadeia lateral.

Aplicação biotecnológica dos polissacarídeos

[032] Os polissacarídeos de origem microbiana estão atraindo cada vez mais a atenção do mercado devido às inúmeras aplicações que podem ser atribuídas a esses compostos (FERREIRA, I.M.P.L.V.O., PINHO, O., VIEIRA, E., TAVARELA, J.G.

Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications. Trends in Food Science & Technology, v. 21, p. 77-84, 2010).

[033] A β-glucana pode ser usada como emulsificante, estabilizante, espessante e texturizante, sendo essas aplicações permitidas pela Food and Drug Administration (FDA) em doces e sobremesas congeladas, pastas de queijo e análogos (DZIEZAK, J.A. Yeasts and yeast derivatives: Applications. Food Technology, v. 41, n. 2, p. 104-121, 1987). A β-glucana de levedura encontra também uso como fibra dietética e, na área médica, isolada, como imunoestimulante. Essa substância pertence à classe de drogas conhecidas como moduladores de resposta biológica, com efeito benéfico em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas (ASSIS, M. A. Polissacarídeos de parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico de célula e de processo industrial de autólise. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996).

[034] A manana pode ser utilizada como bioemulsificante, apresentando estabilidade durante o seu congelamento (CAMERON, D. R.; COOPER, D. R.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Applied and Enviromental Microbiology, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988). Além disso, sua maior aplicação está na composição da ração animal, sendo seus benefícios baseados em propriedades que incluem a modificação da flora intestinal, a redução na taxa de turnover da mucosa e a modulação do sistema imune no lúmen intestinal. Trata-se de propriedades cujo potencial é de aumentar a taxa de crescimento, a eficiência de conversão alimentar e a viabilidade em criação de animais (SHANE, S. M. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefits. International Feed Industry Symposium, v. 17, p. 65-77, 2001). Dessa forma, as mananas da parede celular de leveduras, ou

manooligossacarídeos, têm despertado crescente interesse pela indústria de processamento de ração animal, sendo um nicho importante de mercado que tem crescido a cada ano no Brasil.

[035] Portanto, o mercado de polissacarídeos (glucanas e mananas) tem um grande potencial de crescimento, principalmente quando se considera os benefícios que podem ser proporcionados ao setor de ração animal, apesar de estes compostos serem comercializados como ingredientes específicos há apenas 15 anos.

[036] Por exemplo, o sistema gastrointestinal (GI) das aves constitui um ecossistema microbiano complexo composto por mais de cem espécies diferentes de bactérias. A alça intestinal, em particular, é povoada densamente com mais de 10^5 bactérias por grama de conteúdo. Estes organismos e suas atividades metabólicas não são inertes aos animais e podem ter impactos positivos ou negativos na saúde. O equilíbrio deste ecossistema é dinâmico e pode ser alterado adversamente por estresse, dieta, medicamento ou fatores ambientais. A manutenção da população bacteriana que contém predominância de espécies benéficas e baixa putrefação (degradação de proteína) é importante para manter o equilíbrio intestinal com as bactérias patogênicas. Assim, existe o interesse no uso de mananas para reduzir a colonização por patógenos no trato GI (OYOFO, B. A., DROLESKEY, R. E., NORMAN, J. O., MOLLENHAUER, H. H., ZIPRIN, R. L., CORRIER, D. E., DELOACH, J. R. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. Poultry Science, v. 68, p. 1351-1356, 1989). Foi demonstrado que a Salmonella se adere à superfície intestinal através de lectinas manose-específicas, presentes nas fímbrias tipo 1, e que tal adesão poderia ser inibida pela presença de mananas na dieta, reduzindo as taxas de colonização no intestino de frangos de corte. Resultados semelhantes foram demonstrados posteriormente com níveis menores de inclusão de mananas

(SPRING, P., C., WENK, K. A., DAWSON, NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. Poultry Science, v. 79, p. 205-211, 2000), revelando diferenças na capacidade de diversas estruturas à base de manose de bloquear a adesão de patógenos.

[037] Foi observado que a D-manose-6-fosfato ou manana α-(1→4) não adsorvem *E. coli* em níveis significativos (QUADRO 2). Por outro lado, uma fração contendo mananas ramificadas α-(1→3) e α-(1→6) apresentou uma capacidade de adsorção de *E. coli* 37,5 vezes superior à da D-manose (FIRON, N., OFEK, I., SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. Carbohydrate Research, v. 120, p. 235-249, 1983). Esta capacidade de adsorção funcional relativamente superior, aliada à resistência à digestão, faz com que as mananas derivadas da parede celular de levedura sejam ideais para inibir a adesão de patógenos ao trato gastrointestinal.

Quadro 2: Avaliação da aglutinação de E. coli pela ação de diferentes manooligossacarídeos

Tipo de manana	**Aglutinação relativa de *E. Coli***
D-manose	5
D-manose 6-fosfato	abaixo dos limites detectáveis
α-(1→3) MOS	6
α-(1→6) MOS	1
α-(1→3) & α-(1→6) MOS ramificado	187,5
α-(1→4) mano-glucana	Abaixo dos limites detectáveis

[038] Estudos com frangos de corte têm demonstrado também que as mananas reduzem a colonização por Salmonella no ceco, fígado e baço das aves. Em perus, a redução de contaminação por *Clostridium perfringens*, agente causador da enterite necrótica, foi observada em aves jovens após a inclusão de mananas na

dieta. Sabe-se que os clostrídios não expressam fímbrias do tipo 1 e, portanto, teoricamente não seriam aglutinados pelas mananas. No entanto, é possível que essa redução tenha sido causada pela melhora na saúde intestinal geral ou graças aos efeitos das mananas sobre a resposta imunológica (MORAN, C., VEIGA, A., Mananas: a estrutura define sua função e como a glicômica atua na resistência a doenças. In: I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal, CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, 2009).

[039] O trato gastrointestinal possui um eficiente sistema de vigilância para verificação de patógenos. Entre os vilos encontram-se áreas conhecidas como Placas de Peyer. No interior de cada Placa de Peyer encontram-se células especiais conhecidas como Microfold ou Células M. As células M estão constantemente coletando amostras do conteúdo do líquido intestinal à procura de partículas estranhas e preparam as defesas imunológicas para o caso de qualquer problema potencial. Uma teoria totalmente abrangente indica que as mananas podem aumentar a eficácia do trabalho das Células M. Ao aderir os patógenos à superfície, as mananas os tornam mais concentrados, facilitando a amostragem. Ao entrarem em contato com as Células M, as partículas são processadas por macrófagos. Estudos com diversas espécies animais demonstraram que a adição de mananas na dieta aumenta a capacidade de ação dos macrófagos (MORAN, C., VEIGA, A., Mananas: a estrutura define sua função e como a glicômica atua na resistência a doenças. In: I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal, CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, 2009).

[040] O fato de o sistema imunológico ser ativado de diversas maneiras faz com que a avaliação de um aditivo de ração requeira uma compreensão sólida e precisa dos mecanismos envolvidos. Somente esta compreensão permitirá o posicionamento adequado do aditivo em um programa nutricional.

[041] Um mecanismo que ainda deve ser elucidado é a relação entre a estrutura

das mananas e a capacidade de ligação a patógenos. Os efeitos benéficos quando da adição de MOS em ração animal já têm sido bem estudados, porém, só mais recentemente têm sido realizados estudos para avaliar a atividade de ligação dessas bactérias in vitro. Essas pesquisas se mostram importantes tanto para avaliar a capacidade de aglutinação de bactérias patogênicas, quanto para verificar se a adição de MOS não interfere também na colonização do intestino pelas bactérias benéficas ao organismo.

[042] Alguns testes qualitativos dos métodos de aglutinação combinados com a avaliação visual são descritos na literatura para investigar a capacidade de ligação de produtos de levedura a bactérias patogênicas (OYOFO, B. A., DROLESKEY, R. E., NORMAN, J. O., MOLLENHAUER, H. H., ZIPRIN, R. L., CORRIER, D. E., DELOACH, J. R. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. Poultry Science, v. 68, p. 1351-1356, 1989; PENG, X., SUN, J., MICHIELS, C., ISERENTANT, D., VERACHTERT, H., Coflocculation of *Escherichia coli* and *Schizosaccharomyces pombe*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 57, p. 175–181, 2001; SPRING, P., C., WENK, K. A., DAWSON, NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. Poultry Science, v. 79, p. 205-211, 2000). O crescimento de microrganismos aderentes pode ser mensurado por meio da medida da densidade óptica e uma técnica quantitativa correlacionando a densidade óptica e a contagem de colônias (UFC/mL). A capacidade de aglutinação da parede celular de *Trichosporon mycotoxinivorans* frente a diferentes gêneros de bactérias por meio da quantificação de bactérias ligadas também foi avaliada (SOKURENKO, E.V., MCMACKIN, V. A., HASTY, D. L. Bacterial adhesion measured by growth of adherent organisms. Methods in Enzymology, v. 253, p. 519–528, 1995; GANNER, A., STOIBER, C., WIEDER, D., SCHATZMAYR, G. Quantitative in vitro assay to evaluate

the capability of yeast cell wall fractions from *Trichosporon mycotoxinivorans* to selectively bind gram negative pathogens. Journal of Microbiological Methods, v. 83, p. 168–174, 2010; BECKER, P. M., GALLETTI, S., ROUBOS-VAN DEN HIL, P. J., VAN WIKSELAAR, P. G. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. Journal of Applied Microbiology, v. 103, p. 2686-2696, 2007).

[043] Dessa forma, tem-se intensificado os estudos em torno da aplicação de mananas na dieta de animais e, à medida que o uso de antibióticos promotores de crescimento torna-se cada vez mais restrito em todo o mundo, os produtores têm buscado alternativas como o uso de mananas derivadas da parede celular de levedura.

[044] Pesquisas na área da glicômica revelam que algumas particularidades dos carboidratos oferecem uma alternativa nutricional capaz de melhorar a saúde e o desempenho animal, e devem ser continuadas para revelar mecanismos ainda não conhecidos de tais carboidratos (MORAN, C., VEIGA, A., Mananas: a estrutura define sua função e como a glicômica atua na resistência a doenças. In: I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal, CBNA - 17 e 18 de setembro de 2009 – Campinas, SP, 2009).

[045] Em um processo de fermentação alcoólica, tem-se como subproduto em torno de 15g a 30g de biomassa por litro de álcool produzido. Este excedente de levedura é removido do processo por meio de um procedimento denominado de sangria, ou destilado juntamente com o vinho e eliminado na vinhaça.

[046] Hoje, essa biomassa excedente é considerada um subproduto com baixo valor comercial, pois, grosso modo, as usinas repassam-na a poucas empresas que a secam em *spray-dryers* e a vendem como fonte de proteína para ração animal. Esse tipo de produto concorre, porém, com o farelo de soja e outras fontes de proteína utilizadas para a mesma finalidade. Além disso, se a biomassa

não é secada e vendida, ela é uma agravante no fator ambiental da usina, pois necessita de um tratamento adequado antes de ser descartada no meio-ambiente.

[047] Dessa forma, faz-se necessário desenvolver processos para a obtenção de compostos de maior valor agregado, a partir da biomassa de levedura. Dentre os produtos que podem ser obtidos estão os polissacarídeos e ribonucleotídeos. Os polissacarídeos da parede celular das leveduras (mananas e β-glucanas) podem ser aplicados como prebióticos na ração animal, principalmente os manooligossacarídeos (MOS) que, comprovadamente, ligam-se a patógenos impedindo-os de colonizar o intestino dos animais. Já os ribonucleotídeos estão presentes na fração solúvel da célula de levedura e são utilizados como realçadores de sabor na área da indústria alimentícia (MEROLLI, A. Flavor Enhancement: Taking a Closer Look. Food Product Design, v. 12 p. 31-51, 1997).

[048] Para que não se recaia no mesmo problema, gerando um resíduo de levedura, faz-se necessário o aproveitamento máximo das frações da célula, o que não foi encontrado na literatura até o momento. Quando se extraem os polissacarídeos de parede, não se tem a preocupação de manter os ribonucleotídeos intactos para sua posterior purificação, o que também acontece com os polissacarídeos quando o foco é a obtenção dos ribonucleotídeos. Sem esse processo conjunto, em que a extração de um componente da célula não impede a posterior extração de outros componentes, a célula de levedura permanece sub-aproveitada.

[049] Assim, o desenvolvimento de inovação tecnológica, visando o refino da biomassa de leveduras excedentes da fermentação alcoólica para obtenção de alguns componentes, em grau de pureza satisfatório para sua aplicação, é uma necessidade no cenário econômico atual. Dentre esses componentes, os polissacarídeos de parede e os ribonucleotídeos se apresentam como as opções mais

interessantes, pelo fato de os dois produtos estarem presentes em frações distintas da célula, além de suas aplicações se apresentarem como uma necessidade no mercado brasileiro.

[050] O processo de obtenção de ribonucleotídeos ainda é pouco conhecido e sistematizado, tendo como um entrave principal o alto custo de sua análise. Já o processo de obtenção de MOS também pode ser otimizado, mas, principalmente, o produto resultante pode ser avaliado quanto à sua estrutura química e à capacidade de ligação a microrganismos patogênicos.

[051] Essa inovação tem como finalidade, portanto, criar opções de maximizar o uso da biomassa de leveduras excedente da indústria sucroalcooleira por meio de um processo em que tanto polissacarídeos quanto ribonucleotídeos são obtidos a partir do mesmo material inicial, incluindo novos produtos ao portfólio das usinas de etanol.

Análise do estado da técnica

[052] Atualmente, dois processos de produção de 5'-GMP estão disponíveis industrialmente: a síntese química a partir de 5-amino-4-imidazolcarbosamida ribose e por fermentação direta de glicose utilizando *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamicus* e *Escherichia coli*. O 5'-IMP pode ser produzido por vários processos biotecnológicos: hidrólise enzimática do ácido nucléico de *S. cerevisae* e *Candida utilis*, fermentação direta para 5'-IMP por mutantes de *Brevibacterium ammoniagenes*, por produção microbiana de inosina por *B. subtilis*, *Br. Ammoniagenes* ou Micobacterium seguida pela fosforilação química para 5'-IMP; e pela hidrólise química do RNA (BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. Food Science and Technology International, v. 3, p.437-, 1997).

[053] O processo de obtenção de ribonucleotídeos ainda tem muito a ser desenvolvido, de forma que existem poucos trabalhos na literatura, os quais tratam de

condições iniciais de autólise e diferença do conteúdo entre espécies de microrganismos.

[054] Os processos mais recentes se apresentam já na forma de patentes e priorizam a separação do RNA pouco degradado para posterior tratamento enzimático. Em US2006/0078972 A1 patenteia-se um produto com, no mínimo, 55% m/m de 5'-ribonucleotídeos e o processo de produção desse produto. O processo se iniciou pela recuperação das células, seguida pela inativação das enzimas, a 80°C-97°C durante 5min-10min e posterior tratamento das células para a liberação do RNA. Tal tratamento pode ser realizado por homogeneização, tratamento químico (sal, base, ácido), sendo o último o menos preferido, porque degrada o RNA. Com o RNA no meio, foi realizada a parada da lise celular por neutralização ou tratamento térmico e em seguida o RNA solúvel foi separado e hidrolisado em 5'-ribonucleotídeos com as enzimas fosfodiesterase e deaminase. Com esse método foram obtidos 97kg de GMP e 97kg de IMP seco por 7280kg de levedura seca. Ainda há processos que utilizam uma protease para a liberação dos ribonucleotídeos, como é realizado na patente US2006/0078972 A1.

[055] Como já exposto, em alguns processos, uma das etapas na obtenção de 5'-nucleotídeos é o tratamento enzimático com 5'-fosfodiesterase e adenildeaminase. A primeira enzima é responsável por quebrar a molécula de RNA em 5'-ribonucleotideos, enquanto a segunda transforma 5'-AMP, que não apresenta nenhum efeito realçador de sabor, em 5'-IMP. As condições de utilização dessas enzimas, como concentração, temperatura e pH, também variam dependendo da fonte de obtenção e do extrato onde ela será aplicada. Porém, a maior parte dos trabalhos aponta para a aplicação em concentração de 0,3%-1%, pH entre 5,0 e 6,0, temperatura entre 45°C-60°C, e tempo entre 2h a 16h.

[056] Para obter os polissacarídeos de parede celular, são necessárias algumas

etapas de separação dos outros componentes da levedura. O método padrão de obtenção de glucanas é lavar com ácido e base em que foram otimizados a concentração molar de hidróxido de sódio, a temperatura e o tempo de cozimento. O melhor resultado é obtido com NaOH 1M, aquecimento a 90°C durante 1 hora, seguido de centrifugação e lavagem do resíduo (SUPHANTHARIKA, M., KHUNRAE, P., THANARDKIT, P., VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast β-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, Penaeusmonodon. Bioresource Technology, v. 88, p. 55-60, 2003).

[057] Tais métodos, que empregam tratamentos com ácido, fazem com que se tenham baixos rendimentos dos polissacarídeos devido à hidrólise das cadeias (ASSIS, M.A. Polissacarídeos de parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico de célula e de processo industrial de autólise. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996). Para melhorar o rendimento, já foram propostos alguns métodos: água quente e hidrólise enzimática; homogeneizadores de alta pressão. A extração de polissacarídeos da casca de levedura também pode ser realizada com aquecimento e adição de proteases. A casca de levedura é misturada a água e aquecida a 125°C durante 5 horas. Após o resfriamento a 45°C e diluição com água, a massa é centrifugada resultando em duas partes: sobrenadante e resíduo insolúvel. O sobrenadante é lavado com uma mistura de etanol/água para a liberação das manoproteínas. O resíduo insolúvel é separado e lavado. O pH é ajustado para 10,5 para a adição da Savinase, uma protease que libera as β- glucanas (FREIMUND, S., SAUTERA, M., KAPPELIB, O., DUTLERA, H. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers, v. 54, p. 159-171, 2003). Com base neste processo, foi proposto um processo semelhante para a extração dos polissacarídeos, em que foi realizado o seguinte

procedimento: extração com água quente para remover manoproteínas, seguida de sonicação para quebrar a célula, extração prévia dos lipídios, seguida de proteólise da parede celular (MAGNANI, M., CALLIARI, C. M., MACEDO, F. C., MORI, M. P., CÓLUS, I. M. S., CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. Carbohydrate Polymers, v. 78, p. 658-665, 2009).

[058] Outro processo, proposto no pedido de patente US20060263415, sugere a autólise das células de levedura a pH 5, 50°C durante 30h. Em seguida, a suspensão é centrifugada e a parte insolúvel (parede celular) é tratada com uma protease. Após uma nova centrifugação, o extrato, rico em mananas, é filtrado e seco, enquanto que o precipitado, rico em glucanas, é seco.

[059] A levedura excedente do processo de produção de etanol (30g/L) praticamente não é aproveitada comercialmente, sendo a secagem o único beneficiamento aplicado. Uma alternativa para a utilização dessa biomassa seria a obtenção de compostos com maior valor agregado, como 5'-ribonucleotídeos, manooligossacarídeos (MOS) e β-glucanas.

[060] Não existem processos para a obtenção desses compostos a partir de leveduras utilizadas na indústria sucroalcooleira, assim como para a co-produção de 5'-ribonucleotídeos, manooligossacarídeos e β-glucanas, a partir deste ou de outros microrganismos. Destaca-se ainda que, para a obtenção de 5'-ribonucleotídeos, não existem estudos sistematizados sobre a influência das condições de autólise (temperatura, pH, tempo, osmolaridade, concentração de sólidos e outros fatores) na qualidade e quantidade de ribonucleotídeos produzidos. Em relação à produção de MOS, ainda não se tem conhecimento se a quantidade de MOS liberada na autólise é significativa. Além disso, não há relatos na literatura

sobre quais componentes desse produto apresentam maior capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas. Este conhecimento é importante para o direcionamento da produção do componente bioativo.

Citação das figuras

[061] As figuras referenciadas na presente descrição estão abaixo relacionadas:

[062] Figura 1 – Fluxograma para o processo de produção de ribonucleotídeos, mananas e ß-glucanas apartir de leveduras excedentes da indústria sucroalcooleira.

[063] Figura 2 - Fluxograma simplificado do processo de avaliação da quantidade de rna em diferentes formas e tempos de cultivo.

[064] Figura 3 - Quantidade de rna e biomassa em cultivo agitado.

[065] Figura 4 - Avaliação da quantidade de rna durante a reativação do fermento.

[066] Figura 5 - Fluxograma simplificado do procedimento realizado para a análise do processo de autólise.

[067] Figura 6 - Fluxograma simplificado do processo de caracterização do mos comercial.

[068] Figura 7 – Teor de RNA na casca e na parte solúvel em diferentes tempos de autólise.

[069] Figura 8 – Teor de carboidratos totais na casca e na parte solúvel do autolisado.

[070] Figura 9 – Teor de proteínas na casca e na parte solúvel do autolisado.

[071] Figura 10 – Perfis eletroforéticos das frações solúveis das linhagens em diferentes tempos de autólise.

[072] Figura 11 – Análise de RMN de C13 da fração solúvel de PE-1 em 36 h de autólise.

[073] Figura 12 – Eletroferograma mostrando a separação entre os Padrões 5’-

amp, 5’-imp e 5’-gmp.

[074] Figura 13 – Eletroferograma mostrando os padrões de 5’-amp e 5’-imp juntamente com o padrão interno (salicilato de sódio) e o marcador de fluxo (acetona).

[075] Figura 14 – Eletroferograma da amostra juntamente com o padrão interno (salicilato de sódio) e o marcador de fluxo eletroosmótico (acetona).

[076] Figura 15 – Eletroferograma da amostra onde não há separação dos ribonucleotídeos.

[077] Figura 16 – Eletroferogramas do produto de reação da fosfodiesterase com o RNA.

[078] Figura 17 – Eletroferograma da reação da adenil deaminase com 5’- amp padrão. Nota: as setas indicam os 5’-ribonucleotídeos envolvidos na reação.

[079] Figura 18 – Eletroferogramas do modo de aplicação da 5’- fosfodiesterase, com e sem centrifugação prévia.

[080] Figura 19 – Resultados do experimento de adição de fosfodiesterase: diferentes concentrações e tempo de reação (seção 5.10.3.), para 5’- amp, 5’-gmp e 5’-imp.

[081] Figura 20 – Eletroferograma da reação de adenil deaminase com o material resultante da ação da fosfodiesterase.

[082] Figura 21 - Reação da adenil-deaminase com o material resultante da ação da 5’-fosfodiesterase.

[083] Figura 22 – CCD da amostra de MOS comercial. Nota: 1-padrão manose, 2-padrão manobiose, 3-padrão manotriose, 4- MOS-s, 5- MOS-pet, 6-MOS-set.

[084] Figura 23 – RMN de 13C da fração solúvel do MOS comercial.

[085] Figura 24 - RMN de 13C do precipitado etanólico do MOS comercial.

[086] Figura 25 – RMN de 13C do sobrenadante etanólico do MOS comercial.

[087] Figura 26 – RMN de 13C da fração resultante da extração da parte insolúvel do MOS comercial com NaOF 0, 5 M.

[088] Figura 27 - RMN de 13C da fração resultante da extração da parte insolúvel do MOS comercial com NaOH 1 M.

[089] Figura 28 – RMN de 13C da fração resultante da extração da parte insolúvel do MOS comercial com NaOH 1 M a 50°C.

[090] Figura 29 - Perfil cromatografico de HPSEC-MALLS-RID para o precipitado etanólico do MOS comercial.

[091] Figura 30 - Perfil cromatográfico HPSEC-MALLS-RID para o sobrenadante etanólico do MOS comercial.

[092] Figura 31 - Regressão linear da correlação entre log (ufc/ml) e tempo de detecção, para Salmonella typhimurium.

[093] Figura 32 - Capacidade de ligação relativa dos extratos alcalinos

[094] Figura 33 - Capacidade de ligação relativa dos extratos aquosos.

[095] Figura 34 - Perfil cromatográfico por HPSEC-MALLS-RID-UV da amostra 25°C-2h.

[096] Figura 35 - Perfil cromatográfico por HPSEC-MALLS-RID-UV da amostra pH 5, 5-1h.

[097] Figura 36 – RMN de 13C da fração solúvel de 25°C - 2h. Nota: * = padrão interno de acetona, 30,2 ppm

[098] Figura 37 – RMN de 13C (dept) da fração solúvel de pH 5, 5-1h.

[099] Figura 38 – RMN de 13C da fração insolúvel de 25°c-2h.

[100] Figura 39 – RMN de 13C da fração insolúvel de pH5, 5-1h.

[101] Figura 40 – Composição das rações experimentais utilizadas no experimento.

[102] Figura 41 – Marcadores moleculares e populações obtidas em citometria de fluxo.

[103] Figura 42 – Dados semanais de CR (consumo de ração), GP (ganho de peso) e ICA (índice de conversão alimentar) dos frangos suplementados com LIS, CW, MOS, BG e RN.

[104] Figura 43 – Linfócitos t cd4 gerais.

[105] Figura 44 – Linfócitos t cd8 de mucosa.

[106] Figura 45 – Linfócitos t cd8 não ativados.

[107] Figura 46 – Linfócitos t cd8 ativados.

[108] Figura 47 – Linfócitos t cd4 não ativados.

[109] Figura 48 – Monócitos/macrófagos fagocíticos.

[110] Figura 49 – Células apresentadoras de antígenos não monócitos.

[111] Figura 50 – Macrófagos supressores.

Descrição detalhada da invenção

[112] Trata a presente invenção de um processo para a produção de 5'-ribonucleotídeos, parede celular, manooligossacarídeos (MOS) e β-glucanas, que inclui um processo fermentativo que utiliza leveduras, incluindo as da espécie *Saccharomyces cerevisiae,* e que podem ter sido usadas em destilarias e demais usinas que façam uso de fermentação alcoólica. Este processo compreende, fundamentalmente, as seguintes etapas:

a) Cultivo das leveduras;
b) Reativação das leveduras cultivadas;
c) Centrifugação das leveduras ativas;
d) Autólise da biomassa obtida no material precipitado pela centrifugação;
e) Centrifugação da biomassa autolisada;
f) Do sobrenadante, tem-se material rico em RNA que passa por um novo processo, que compreende as seguintes etapas:
    i) O material é submetido a reações enzimáticas específicas que degradam o RNA em diferentes tipos de ribonucleotídeos;

ii) Purificação dos ribonucleotídeos obtidos.

g) Do precipitado, tem-se um material rico em manooligossacarídeos (MOS) e β-glucanas, que chamamos de “casca ou parede celular”:

i) A casca da levedura é obtida da biomassa autolisada, e os MOS e β-glucanas são obtidos por meio de um processo que compreende as seguintes etapas:

- centrifugação do autolisado;
- liofilização da casca;
- diluição em meio básico, seguida de aquecimento;
- diluição em solução tampão, seguida de aquecimento;
- neutralização dos extratos;
- centrifugação dos extratos;
- da centrifugação, obtém-se uma fase solúvel (rica em mananas) e outra insolúvel (rica em β-glucanas);
- liofilização de ambas fases do centrifugado (precipitado e sobrenadante).

[113] As leveduras excedentes geradas na usina de etanol passam por uma reativação de forma que o conteúdo de RNA das células fosse elevado. Em seguida, essas células sofrem o processo de autólise. Na figura 1 está proposta uma condição de autólise o qual se mostra adequado tanto para a produção de 5’-AMP e 5’GMP. Porém outras condições poderiam ser utilizadas, as que favorecem mais a produção de 5’-GMP ou as que favorecem mais a produção de 5’-AMP, dependendo da especificação do produto final desejado. Essa especificação, no caso de flavorizantes, deve ser determinada por meio de uma análise sensorial nos produtos aplicados.

[114] Após a centrifugação do material autolisado, tem-se uma fração rica em

ribonucleotídeos (sobrenadante). Essa fração poderia ainda passar por um tratamento enzimático (fosfodiesterase e adenildeaminase), de forma que se possa obter maior quantidade de 5'-GMP ou 5'-IMP. A otimização das condições de autólise seguida de tratamento enzimático não foi estudada neste trabalho, bem como a purificação dos ribonucleotídeos.

[115] A outra fração resultante da centrifugação do material autolisado é a casca ou parede celular da levedura (precipitado). Essa casca passaria por uma extração aquosa (pH 5,5, 121°C, 1 h), de forma que um produto rico em mananas e β-glucanas e com alta capacidade de ligação a patógenos in vitro possa ser obtido. Esse produto poderia ainda passar por etapas de purificação, as quais não foram estudadas neste trabalho. Outras extrações poderiam ser realizadas, dependendo da característica desejada no produto: maior quantidade de proteínas solúveis, maior quantidade de RNA solúvel, maior quantidade de carboidratos solúveis.

[116] Tendo como exemplo uma usina de etanol com produção de 200m³/dia, o excedente de leveduras seria em torno de 6t/dia. Dessa forma, com o processo proposto, seria necessário manter um tanque agitado para a reativação e autólise (em torno de 160m³), uma centrífuga e um tanque para a extração da casca (em torno de 36m³). Seria possível obter em torno de 3600kg do produto rico em mananas e glucanas, 18 kg de 5'-AMP e 4,2 kg de 5'- GMP por dia. Assim, os investimentos em equipamentos não seriam onerosos para usina.

Cultivo das leveduras

[117] Para iniciar o processo, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae,* provenientes de processos fermentativos em indústrias sucroalcooleiras, são cultivadas em um meio de cultura, que compreende como constituinte melaço de cana-de-açúcar, com 3°BRIX a 10°BRIX. O pré-inóculo, contendo as leveduras

e o meio de cultura, deve ser mantido em um ambiente de fermentação, incluindo agitador orbital e biorreator, por 12h a 36h em uma temperatura controlada, que não deve ser superior a 38°C nem inferior a 25°C, e sob uma agitação de 100rpm a 500rpm. Após tal período, o inóculo é submetido a um processo de gravitação forçada, que pode ser por centrifugação de 500.g a 2000.g, por 2min a 8min. Do centrifugado, parte das células é transferida para um novo meio de cultura, contendo melaço de cana com 10°BRIX a 20°BRIX, de forma que a quantidade de inóculo seja de 5 a 20 vezes menor que a de meio de cultura. O inóculo com este meio é mantido em um ambiente de fermentação, incluindo agitador orbital e qualquer tipo de biorreator, por 2h a 20h, em uma temperatura entre 25°C e 28°C, sob uma agitação entre 150rpm e 400rpm. Com isto a reativação das leveduras é executada.

Autólise

[118] Após nova etapa de centrifugação, as leveduras cultivadas, conforme descrito anteriormente, passam por um processo de autólise. Este processo é iniciado com a lavagem das células com solução salina, incluindo NaCl, sendo o volume utilizado de 1,5 a 3 vezes maior que a massa de células úmidas. Após a lavagem, a mistura é centrifugada e o pH ajustado para um valor entre 4 e 7. Tal solução é novamente incubada em ambiente de fermentação, incluindo biorreator e agitador orbital, a uma temperatura que pode variar de 35°C a 60°C, com uma agitação entre 100rpm e 300rpm por 8h a 48h. Após este período, a autólise é interrompida com aquecimento a 70°C a 90°C por 10min a 30min. O material resultante é, então, centrifugado a 3000.g por 15min, resultando em dois produtos: a parede celular da levedura (retirada do precipitado) e uma fração solúvel (retirada do sobrenadante).

Reações enzimáticas para obtenção dos ribonucleotídeos

[119] Com a finalidade de se obter ribonucleotídeos, como 5’-ribonucleotídeos

e 5’-IMP, o material obtido após a autólise é submetido a reações enzimáticas com pelo menos uma das enzimas, fosfodiesterase (obtenção de 5’-ribonucleotídeos) e adenildeaminase (obtenção de 5’-IMP).

[120] A reação com fosfodiesterase é realizada após a autólise da levedura, com a adição de 0,3% a 1,5% (m/v) de enzima ao material. A reação deve durar de 2h a 10h a uma temperatura entre 35°C e 60°C, sendo terminada por aquecimento – temperatura de 60°C a 95°C por 10min a 20min. Terminada esta reação, o material é centrifugado (10000.g, por 5min a 15min) e submetido à reação com 0,3% a 1% (m/v) de adenildeaminase por 2h a 10h, a uma temperatura entre 35°C e 60°C. A reação é terminada por aquecimento – temperatura de 60°C a 95°C por 10min a 20min.

[121] Após as reações enzimáticas, obtêm-se os ribonucleotídeos, que podem ainda sofrer nova etapa de purificação.

Extração dos manooligossacarídeos (MOS)

[122] Por meio da centrifugação do autolisado, a casca da levedura foi obtida e passada por um processo de secagem, como liofilização. Após isso, o liofilizado pode passar por qualquer um dos dois processos extrativos descritos a seguir:

a) diluição em solução básica, incluindo solução de KOH, de 1% a 5%, seguida de aquecimento de 25°C a 100°C, por 2h a 10h;
b) diluição em solução tampão, incluindo fosfato de sódio de 20mM a 80mM, em um pH de 3 a 8,5, sob uma temperatura de 90°C a 140°C por 1h a 4h.

[123] Depois desta etapa, o material deve ser neutralizado e centrifugado. Da centrifugação, obtém-se uma fase solúvel (rica em mananas) e outra insolúvel (rica em ß-glucanas). Ambas fases podem ser secas, por meio de liofilização, por exemplo, para ganho de tempo de prateleira.

Exemplos

EXEMPLO 1: Avaliação do cultivo de leveduras e quantificação de RNA, Proteínas, Carboidratos e composição monossacarídica

[124] O esquema representado na figura 2 resume as etapas necessárias para avaliar o teor de RNA nas leveduras, em diferentes fases e formas de cultivo. Basicamente, partiu-se do inóculo para obter biomassa suficiente para iniciar o cultivo. Após o cultivo, a biomassa seca foi quantificada. De posse desse valor, um volume definido de meio de cultivo com biomassa foi centrifugado, tal volume deveria conter 20µg a 60µg de células secas – valores abrangidos pela técnica do orcinol. Esse material foi utilizado para quantificar o RNA presente nas leveduras.

[125] A levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, a qual apresenta grande utilização comercial no Brasil na indústria sucroalcooleira. Ela foi mantida em placa de Petri contendo meio YPD, em geladeira, e transferida para um novo meio a cada 4 meses.

[126] Para o preparo do inóculo, uma pequena porção de células da placa foi transferida, com o auxílio de um palito de madeira, para um erlenmeyer contendo 150ml do meio de cultivo esterilizado, o qual consistiu de melaço de cana a 6°BRIX. Após a transferência, o erlenmeyer foi incubado em agitador orbital, por 24h, a 30°C com agitação de 200rpm.

[127] Para o experimento em cultivo agitado, o inóculo foi centrifugado a 10000.g durante 5min. Uma parte do sobrenadante foi descartada, de forma que as células ficassem em suspensão numa razão 1:1 (volume de células:volume de meio), e uma quantidade suficiente de células foi transferida para um novo meio (melaço de cana 15°BRIX, esterilizado), para que o inóculo ficasse em 10% (volume inóculo/volume meio 15°BRIX). O cultivo foi realizado em agitador

orbital a 30°C, 200rpm, durante o tempo necessário para avaliação da quantidade de RNA, a qual foi realizada a cada hora de cultivo, durante 4 horas.

[128] Para avaliar a quantidade de RNA após o processo fermentativo, o protocolo utilizado foi de acordo com o descrito por HERBERT, D., PHIPPS, D. J., STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology (Norris. J. R. and Ribbons, D. W. eds.) Academic Press, London, p. 209-344, 1971, o qual emprega o orcinol para a determinação espectrofotométrica da ribose.

[129] Para iniciar a dosagem, as células foram lavadas com $HClO_4$ 0,25M (5ml para 20µg de células secas), durante 30min a 4°C. A suspensão de células foi centrifugada a 6000.g, durante 10min e ao material precipitado foram adicionados 4ml de $HClO_4$ 0,5M, permanecendo, após agitação, sob incubação a 37°C, por 90min. O material foi novamente centrifugado, sendo o precipitado descartado. Na solução sobrenadante (0,5mL) foi realizada a dosagem de RNA, adicionando 1,5mL do reagente de orcinol e incubando os tubos em banho-maria a 100°C, durante 20min. Após esse tempo, os tubos foram resfriados e então foi adicionado 5,5mL de n-butanol. Para preparar o branco, foi utilizado 0,5mL de $HClO_4$ 0,5M, em vez da amostra, sendo realizada a leitura a 672nm. Também foi realizado em cultivo estático, em estufa a 30°C, durante 8h a 12h. Para o ensaio de reativação, foram realizadas as seguintes etapas: inóculo, seguido de fermentação. Após 12h de fermentação, as células foram centrifugadas e transferidas para um novo meio (melaço de cana esterilizado, 15°BRIX) e cultivadas em agitador orbital a 30°C, 200rpm, durante 6h. A avaliação da quantidade de RNA foi realizada a cada hora de cultivo.

[130] A curva-padrão foi construída utilizando ribose (20µg/mL a 100µg/mL em ácido perclórico 0,5N), sendo a conversão para RNA feita pela multiplicação do valor obtido da concentração de ribose por 2, de acordo com a equação 1 e 2 (HERBERT, D., PHIPPS, D. J., STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial

cells. In: Methods in Microbiology (Norris. J. R. and Ribbons, D. W. eds.) Academic Press, London, p. 209-344, 1971).

RNA = ribose x 2 *(equação 1)*

Ribose = ABS/A *(equação 2)*

[131] Onde: RNA = Concentração de RNA (µg/mL); Ribose = Concentração de ribose (µg/mL); ABS = Absorbância obtida na leitura da amostra; A = Coeficiente da equação da curva-padrão

[132] A quantificação da biomassa seca foi realizada de acordo com a metodologia apresentada em OLSSON, L., NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. TIBTECH 15, p. 517–522, 1997.

[133] Assim, a primeira avaliação da quantidade de RNA na célula de levedura foi realizada para o cultivo agitado e foram determinadas a concentração da biomassa no meio de cultivo (mg/mL), a concentração de RNA no meio de cultivo (µg/mL) e a porcentagem de RNA em relação à biomassa seca. Estes resultados estão apresentados na figura 3.

[134] O conteúdo de RNA na biomassa seca apresenta maior aumento nas duas primeiras horas de cultivo, permanecendo constante em 3h e 4h (4,5%). Nas duas últimas horas do estudo, ocorrem o aumento da quantidade de RNA (µg/mL de meio) e o aumento da biomassa seca (mg/mL), porém o acréscimo da quantidade de RNA formado não supera o crescimento da biomassa, o que faz com que a porcentagem de RNA permaneça a mesma.

[135] A adaptação do microrganismo a uma nova condição (meio com menor quantidade de açúcares para um meio com maior quantidade de açúcares) pode explicar o aumento do conteúdo de RNA já nas primeiras horas do cultivo, pois a levedura direciona o seu metabolismo para produzir novas organelas, enzimas e compostos, os quais serão necessários para a sua sobrevivência

em um novo meio. Assim, como o fenômeno de tradução de proteínas é dependente de moléculas de RNA para ser realizado, a quantidade de RNA na célula aumenta.

[136] Também foi avaliada a quantidade de RNA formado durante a fermentação etanólica, tendo por objetivo aproximar o processo executado no laboratório daquele que é realizado na indústria. Os resultados obtidos para as 4 últimas horas da fermentação estão apresentados na TABELA 2, para a linhagem PE-1.

Tabela 2: Resultados da avaliação do RNA formado durante as últimas horas da fermentação, linhagem PE-1

Tempo (h)	Biomassa seca (mg/mL)	% RNA (m/m)[4]
8	6,54	1,89±0,09
10	8,65	1,91±0,05
12	9,12	2,26±0,07

[137] Como exposto na tabela 2, as quantidades de RNA (%) e de biomassa seca aumentam de 8h a 12h de fermentação, aumentando a quantidade de RNA por mL de meio. Esse aumento do conteúdo de RNA da biomassa no final da fermentação pode ser devido à síntese enzimática de compostos resultantes do estresse osmótico sofrido pela levedura, como glicerol e trealose. Ao final da fermentação há o aumento da concentração de etanol e ácidos orgânicos, dessa forma, a geração de glicerol é aumentada, pois ele é o mais efetivo osmorregulador de *S. cerevisiae* (HAJNY, G. J.; HENDERSHOT, W. F.; PETERSON, W. H. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. Applied Microbiology, New York, v. 8, p. 5-11, 1960; TOKUOKA, K. A. A Review: sugar and salt – tolerant yeast. Journal of Applied Bacteriology, v. 74, p. 101-110, 1993). Também é formada a trealose (WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology. New York:

[4] % RNA = (Concentração de RNA/Concentração de Biomassa)*100%

John Wiley, 1998), que é o sacarídeo que atua na estabilização da membrana plasmática quando a levedura é submetida a um estresse osmótico, reduzindo possíveis danos em sua estrutura (MANSURE, J. J.; SOUZA, R. C.; PANEK, A. D. Trehalose metabolism in Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation. Biotechnology Letters, v. 19, n. 12, p. 1201-1203, 1997).

[138] Comparando esses dados com os obtidos para o cultivo agitado, observa-se que o conteúdo de RNA na biomassa formado durante a fermentação é praticamente a metade do que é formado durante o cultivo agitado (2,3% na fermentação e 4,5% no cultivo agitado). Esse fator influenciaria muito no custo de um processo industrial, visto que é obtida menor quantidade de produto por quantidade de matéria prima (produto mais diluído), o que demandaria maior energia, maior quantidade adjuntos no processo e etapa de purificação mais lenta. Como o objetivo é criar um processo para utilizar leveduras residuais de destilaria, foi testada também a reativação das leveduras oriundas da fermentação, em que a quantidade de RNA é baixa, com o objetivo de aumentar o teor do composto de interesse, tornando o processo mais viável. O resultado desse experimento está apresentado na figura 4.

[139] Com o processo de reativação, o conteúdo de RNA aumentou significativamente em apenas duas horas de cultivo. Os valores praticamente triplicaram, de 2,3% de RNA no final da fermentação para 7,0%, ultrapassando, ainda, o valor obtido quando as células foram cultivadas apenas sob agitação (4,6%).

[140] Esse comportamento pode ser explicado pela mudança de meio de cultivo. No processo fermentativo, o microrganismo está num meio em que as concentrações de etanol, ácidos orgânicos e outros componentes estão muito altas, enquanto as dos nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo podem estar, em geral, muito baixas. Ao ser transferido para um meio novo,

a condição osmótica do meio muda, forçando uma mudança na maquinaria celular para utilizar os novos nutrientes. Assim, várias enzimas devem ser sintetizadas rapidamente, como a invertase, que hidrolisa a sacarose, aumentando o nível de RNA na célula (RNA mensageiro, RNA ribossomal) para que o microrganismo possa se adaptar à nova condição. Por exemplo, normalmente o gene SUC2, que codifica para a produção da invertase, está reprimido e a produção de invertase é baixa. Se a levedura é crescida em meio contendo sacarose a transcrição do gene SUC2 é desreprimida e observa-se alta produção de invertase (GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998). Essa é uma possível explicação para o fato de que a concentração de RNA apresenta um pico logo no início do cultivo de reativação (figura 4).

[141] A quantificação de proteínas insolúveis foi realizada pelo método de Folin (LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951), adaptado para células de levedura, descrito por STEWARD, P. R. Analytical Methods for Yeast. In: Methods in Cell Biology. Editor: David M. Presciot, v. 12 (Yeast Cell), p. 112, 1975. Os reagentes utilizados para essa análise foram:

i) KOH 1M;
ii) Na_2CO_3 2% (m/v);
iii) $CuSO_4.5H_2O$ 0,125% (m/v) em solução de tartarato de sódio e potássio 0,25% (m/v);
iv) mistura das soluções (ii) e (iii) na proporção de 50:4 (preparada no dia da análise);
v) reagente de Folin-Ciocalteu, disponível comercialmente;
vi) padrão de proteína (albumina soro bovina), em diluições de 0,05mg/mL

a 0,6mg/mL.

[142] Foi adicionado 0,5mL de KOH 1M a 0,5mL da suspensão celular (ou da parede celular de levedura) sendo os tubos aquecidos a 100°C durante 15min. Após o resfriamento, foram adicionados 2mL do reagente (iv), seguido de incubação a temperatura ambiente por 10min. Após rápida agitação, foi adicionado 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu. A absorbância foi lida a 750nm após 30min à temperatura ambiente. O branco foi confeccionado utilizando água deionizada no lugar da amostra e a conversão do valor de absorbância foi realizada utilizando a curva padrão de proteína (albumina soro bovina).

[143] As proteínas prontamente solúveis foram analisadas pelo método de BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248, 1976, pela facilidade que o método apresenta quando há proteínas solúveis e em grande quantidade.

[144] A quantidade de proteínas na parte solúvel é drasticamente diminuída com o progresso da autólise: de 0,344mg/mL para 0,079mg/mL. Comparando com a quantidade de proteínas quantificadas na casca, não é possível observar uma correlação direta. Possivelmente, a queda na quantidade de proteínas na parte solúvel se deve à degradação das proteínas da célula em aminoácidos no decorrer da autólise - apesar do método de Lowry detectar aminoácidos, a absorção de energia destes compostos no método é muito baixa se comparada à de proteínas. Outra possibilidade é a mudança da maquinaria celular que mantém somente as proteases que agirão na casca da levedura, em detrimento dos componentes protéicos da parte solúvel. Isso explicaria, também, o leve aumento e conseqüente estabilização da quantidade de proteínas na casca, pois as proteínas que são responsáveis pela modificação da parede celular estão ativas e permanecem na parede, enquanto que as proteínas do extrato

não apresentam utilidade nessa etapa e são degradadas (ALEXANDRE, H. Autolysis of Yeasts.Comprehensive biotechnology, n. 2, v. 2, p. 641-649, 2011).

[145] Os polissacarídeos insolúveis da parede celular de *S. cerevisiae* ou das partes insolúveis dos extratos da casca de levedura foram submetidos à hidrólise ácida de acordo com a metodologia descrita por DALLIES, N.; FRANCOIS, J.; PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall: Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v. 14, n. 14, p. 1297-1306, 1998, com algumas adaptações. Amostras de 1mg de parede celular em duplicata foram tratadas com 75µL de ácido sulfúrico 72% (p/p) e deixadas à temperatura ambiente por 3h. Após este intervalo de tempo, foi acrescentada água deionizada até o volume final de 1mL, de forma que a concentração final de ácido sulfúrico foi de 1M. Seguiu-se o tratamento térmico em ebulição por 4h. Após o resfriamento e a conservação em banho de gelo, o hidrolisado foi diluído com 9mL de água deionizada. O material foi utilizado como solução de monossacarídeos para as análises de quantificação utilizando-se a metodologia do fenol-sulfúrico proposta por DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350, 1956. O extrato ácido diluído (0,5mL) foi adicionado de 0,5mL de fenol 5% (m/v). Após repouso à temperatura ambiente por 40min, foram adicionados 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado e após resfriamento a temperatura ambiente foi feita a leitura a 485nm. A conversão de absorbância e concentração de açúcar foi realizada utilizando uma curva-padrão de glucose (10µg/mL a 100µg/mL).

[146] O teor de carboidratos não apresentou uma correlação clara entre casca e parte solúvel. Houve um aumento da quantidade de carboidratos na parte solúvel do autolisado no decorrer do tempo, provavelmente devido à liberação

de manoproteínas inicialmente presentes na casca. Na casca, em 12h, houve diminuição na quantidade de carboidratos ao longo do tempo, aumentando em 24h e diminuindo novamente em 48h. Uma possível explicação para esse pico é a utilização inicial do glicogênio para manter as funções celulares e posterior formação da trealose, e imobilização desta na casca para a manutenção da viabilidade celular da levedura.

[147] Para determinação da composição monossacarídica os materiais sofreram hidrólise ácida total. Para os materiais solúveis em água a hidrólise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por FREIMUND, S., SAUTERA, M., KAPPELIB, O., DUTLERA, H. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers, v. 54, p. 159-171, 2003, onde 5mg da amostra foram solubilizados em 0,6mL de Ácido Trifluoracético (TFA) 75% (m/v) e mantidos a 90°C durante 2,5h. Para as amostras insolúveis, foi realizada a hidrólise de Seaman (SEAMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. Tappi, v. 37, p. 336-343, 1954), em que 5mg do material foram ressuspendidos em H_2SO_4 72% (m/v) durante 1h, em seguida, o ácido foi diluído a 7,2% e a amostra foi mantida a 100°C durante 6h. Ao final da hidrólise, o ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante foi removido por filtração. Na sequência, o hidrolisado foi seco em fluxo de nitrogênio e as amostras ressolubilizadas em 0,5mL de água destilada. Os monossacarídeos foram então reduzidos com $NaBH_4$ por 12h e, na sequência, neutralizados com ácido acético diluído até pH 5. O material seco em fluxo de nitrogênio foi submetido a co-destilação em metanol (3 a 4 vezes). Os alditóis foram acetilados com 0,5mL de anidrido acético por 1h a 120°C em estufa e os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por GLC.

[148] O resultado da composição monossacarídica, apresentado na tabela 3, revela que, para os dois tratamentos, houve primeiramente a liberação das mananas, de forma que elas aparecem em maior porcentagem nas frações solúveis. A glucose, mais presente nas frações insolúveis, é proveniente das β-glucanas, que são mais resistentes ao tratamento químico. Os tratamentos realizados, apesar de condições diferentes, resultaram em produtos semelhantes e semelhantes ao que foi obtido por NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, n. 2, p. 206- 212, 1998, em que a fração de manoproteínas continha 5% de glucose e 93% de manose, após extração com KOH a 4°C e saturação com sulfato de amônio.

Tabela 3: Composição monossacarídica para os extratos 25°C-2h e ph 5,5-1h

	Manose (%)	Glucose (%)
25°C-2h – Fr. solúvel	89	10
25°C-2h – Fr. Insolúvel	58	41
pH 5,5-1h – Fr. Solúvel	94	5
pH 5,5-1h – Fr. Insolúvel	56	42

[149] Os resultados apresentados anteriormente estão representados nas figuras 7, 8 e 9.

EXEMPLO 2: Análises cromatográficas, eletroféticas e por RMN

Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

[150] A análise em CCD das frações do MOS Comercial foi realizada utilizando como fase móvel uma solução de acetato de etila:propanol:ácido acético:água na proporção de 4:2:2:1 em placas de sílica e utilizando como padrões manose, manobiose e manotriose. As placas foram reveladas com a solução reveladora - orcinol 0, 4% (m/v) em ácido sulfúrico concentrado e etanol (1:19) - a 100°C por 10 minutos.

Cromatografia de Exclusão de Alta Pressão (HPSEC)

[151] Para as análises de homogeneidade, feitas por HPSEC, as amostras foram solubilizadas (1 mg/mL) em uma solução de nitrito de sódio ($NaNO_2$) contendo azida (NaN_3) e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm. Então, foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) equipado com detector de índice de refração diferencial (RID) e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS). Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação com limites de exclusão de 1×10^6, 4×10^5, 8×10^4 e 5×10^3.

Cromatografia Líquido-Gasosa (GLC)

[152] As análises por cromatografia líquido-gasosa foram realizadas em cromatógrafo equipado com detector de ionização de chama, sendo utilizado nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0mL/min) e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i.), revestida internamente com DB-225 (0,25µm). As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220°C, com o injetor a 250°C e detector de ionização de chama a 300°C.

RMN C^{13}

[153] As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de C^{13} foram realizadas a 50°C, utilizando D_2O como solvente da amostra. Para as frações insolúveis, foi aplicada a seguinte metodologia: os materiais foram dissolvidos em NaOH (8%)/ tiouréia (6, 5%)/uréia (8%)/D_2O e mantidos sob agitação durante 3h à temperatura ambiente. Em seguida, a temperatura foi elevada para 50°C e , a qual foi mantida por 2h. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi analisado.

Métodos eletroforéticos

[154] Análises de eletroforese capilar (EC). Os perfis na eletroforese capilar foram obtidos por meio da análise de 200µL da amostra, após filtragem em membrana de 0,22µm. Foi utilizada um capilar de sílica fundida de 50µm de

diâmetro interno e 67cm de comprimento e tampão tetraborato de sódio 20mM a 45°C e 15kV. A rotina de análise consistiu de lavagem por 2min com NaOH, seguida de lavagem por 2min com o tampão e injeção por 3s. A detecção foi realizada em 214nm.

EXEMPLO 3: Avaliação do processo de autólise

[155] O resumo do procedimento utilizado para avaliar o processo de autólise está apresentado na figura 5, onde o inóculo e o cultivo agitado foram realizados de acordo com o descrito no Exemplo 1, porém com tempo determinado, sendo o inóculo de 24h e o cultivo de 4h.

[156] Foi determinada a biomassa seca e, a partir desta, uma quantidade de cultivo suficiente foi centrifugada, de forma que a autólise pudesse ser conduzida com 15% de sólido seco (m/v).

Autólise

[157] Após a centrifugação do cultivo, as células foram lavadas com NaCl 0,9% (m/v) na proporção de 1:2, massa de células úmidas:volume de NaCl, e centrifugadas, sendo o procedimento repetido duas vezes. O pH foi ajustado para 5,0 e o volume foi completado para 10mL com água deionizada. Seguiu-se a incubação a 50°C em agitador orbital, com agitação de 100rpm, por 8h-48h, retirando amostras em três tempos diferentes.

[158] A autólise foi interrompida com aquecimento (85°C por 15min). Então, o material foi centrifugado a 3000.g durante 15min, resultando em dois produtos: a parede celular da levedura (precipitado) e uma fração solúvel.

Análise parede celular da levedura

[159] A parede celular da levedura foi analisada em relação à quantidade de proteína, RNA e carboidratos totais (Exemplo 1).

Análise da fração solúvel do autolisado

[160] A fração solúvel do autolisado foi analisada em relação a proteínas, RNA

e carboidratos totais, além do perfil em eletroforese capilar e análise em RMN. O RNA foi analisado por metodologia já descrita no Exemplo 1, porém com a diferença de não ter sido necessária a extração com ácido perclórico.

[161] Os carboidratos totais foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico, também já descrito anteriormente (Exemplo 1), porém sem a necessidade do pré-tratamento com ácido sulfúrico. As proteínas foram analisadas pelo método de Bradford (conforme Exemplo 1).

[162] Também foi obtido o perfil em eletroforese capilar e em RMN (conforme Exemplo 2).

[163] Os resultados desta avaliação estão apresentados parcialmente no exemplo 1 (Proteínas, RNA, carboidratos e composição monossacarídica) e a seguir foram analisados os perfis em eletroforese capilar nos 3 diferentes tempos. Esses perfis estão na figura 10.

[164] É possível observar a maior complexidade de picos com o passar da autólise, devido à liberação de diferentes compostos com capacidade de absorver luz ultra-violeta a 214nm, mostrando que a qualidade e a quantidade dos compostos produzidos variam em relação ao tempo de autólise.

[165] Uma preocupação do projeto foi saber se durante a autólise ocorria perda significativa de mananas para a parte solúvel. Isso porque o objetivo do projeto é a obtenção de três produtos a partir do mesmo material inicial: o MOS e β-Glucanas (da casca) e os 5'-ribonucleotídeos (do extrato solúvel). Assim, o sobrenadante da autólise da levedura em tempo de 36 h, foi submetido à análise de RMN (figura 11).

[166] Foi possível observar muitos sinais de hexoses (110ppm-60ppm) e carbono ligado a nitrogênio (55ppm-50ppm), característico de aminoácido e material nucléico. Já o sinal de manose apresenta-se pouco intenso, indicando

que ela aparece em pequena quantidade no extrato solúvel. É apenas uma indicação, pois a análise de RMN de C^{13} não permite correlacionar intensidade de sinal com concentração do componente de forma quantitativa.

[167] A partir desse experimento, é possível trabalhar com os dois processos: produção de ribonucleotídeos e MOS, paralelamente, sem que um dependa inteiramente do outro. Mesmo havendo diferenças no conteúdo e talvez composição dos polissacarídeos de parede da levedura durante a autólise, pode-se testar vários processos de obtenção de MOS e sua capacidade de ligação a patógenos sem que o processo de autólise seja inteiramente otimizado para 5'-ribonucleotídeos, apenas verificando e ajustando os dois processos no final dos estudos.

EXEMPLO 4: Análise de 5'-Ribonucleotídeos

Padrão Interno

[168] As condições iniciais de eletroforese capilar para a análise de 5'-AMP, 5'-IMP e 5'-GMP foram: tampão de tetraborato de sódio 20mM, pH 9, 24,15kV e 45°C.

[169] Primeiramente, foi feita uma lavagem com água durante 5min, em seguida, uma lavagem com NaOH 0,1M durante 5min. O processo da corrida foi iniciado com lavagem do capilar com NaOH 0,1M durante 2min, seguido da lavagem com o tampão borato 20mM, durante 2min. A injeção da amostra foi realizada de forma pneumática durante 3s, iniciando a corrida. A detecção dos ribonucleotídeos foi realizada a 214nm.

[170] Foram testados, para a escolha do padrão interno, compostos com características químicas semelhantes às dos compostos de interesse: ampicilina, cloranfenicol, streptomicina, ácido sórbico, piruvato, ninidrina, salicilato de sódio, em concentração de 100µg/mL. Para as análises seguintes foi utilizado o padrão interno escolhido na concentração de 35µg/mL.

[171] Todas as soluções utilizadas foram filtradas em membranas de 0,22µm de poro.

Marcador de Fluxo Eletroosmótico (FEO)

[172] O marcador do FEO deve absorver a luz UV no comprimento de onda estudado além de não apresentar carga significativa no pH do tampão de corrida, para indicar o início efetivo do tempo de análise.

[173] Foram testados, como marcadores do FEO, os compostos metanol, acetona e uréia.

Otimização da análise de eletroforese capilar (EC)

[174] Para melhorar as condições de análise em EC, foram testados três tampões diferentes, já utilizados para a análise de ribonucleotídeos na literatura: tetraborato de sódio pH 9,2, fosfato de amônio pH 9,0 e carbonato de sódio pH 10,0, na concentração de 50mM em três temperaturas 45°C, 35°C e 25°C, com uma voltagem de 20kV. Em seguida, foi otimizada a voltagem utilizada para o tampão e temperatura escolhidos, de forma que o tempo de análise fosse diminuído.

[175] As otimizações foram baseadas no aumento da resolução entre os compostos (equação 4).

$$R = \frac{2\times(ta-tb)}{Wa-Wb} \quad \text{(equação 4)}$$

[176] Onde: R = resolução entre os compostos a e b; ta, tb = tempo de eluição dos compostos a e b, respectivamente (min); Wa, Wb = largura da base do pico do composto a e do composto b, respectivamente (min).

[177] A seguir, serão apresentados os resultados relacionados ao desenvolvimento de um método de eletroforese capilar para a quantificação de 5'-ribonucleotídeos a partir de autolisados de levedura. O estabelecimento desse método foi de fundamental importância para a continuidade dessa pesquisa, já que não

existe na literatura uma metodologia de EC para quantificação de 5’-ribonucleotídeos a partir de autolisados de levedura.

[178] Primeiramente, foi testada a separação dos padrões 5’-AMP, 5’-GMP e 5’- IMP por meio das condições iniciais de eletroforese capilar que foram descritas anteriormente (figura 12). Houve separação dos três ribonucleotídeos em menos de 15 minutos de análise, com boa resolução.

[179] Assim como acontece nos métodos cromatográficos (cromatografia líquida e gasosa), na EC também é recomendada a adição de um padrão interno. Este padrão pode ser utilizado no cálculo dos tempos relativos de eluição e na padronização das áreas. A molécula escolhida como padrão interno deve apresentar um comportamento eletroforético semelhante ao dos analitos, mas com tempo de eluição diferente dos padrões, assim como de todos os componentes presentes na amostra pesquisada.

[180] Dentre os compostos testados, o ânion salicilato se mostrou mais adequado, pois elui próximo aos analitos e em tempos diferentes dos outros componentes da amostra, como mostrado nas figuras 13 e 14, onde também já está representado o marcador de fluxo escolhido, a acetona. O metanol também poderia ser um bom marcador de fluxo, porém a linha de base não fica tão estável quanto àquela da acetona, além do metanol ser um composto altamente tóxico.

[181] Apesar de em alguns experimentos parecer que há separação completa dos compostos, isso não ocorre para todas as condições de autólise (44 h, 60°C, pH 5,3, 5% de NaCl, 6% de etanol e 10% de sólidos secos), como mostrado na figura 15.

[182] Dessa forma, foram melhoradas as condições de análise para que fosse possível analisar os compostos de interesse obtidos a partir de qualquer condição de autólise.

EXEMPLO 5: Caracterização das reações enzimáticas

[183] Durante a execução do planejamento experimental, uma das etapas envolveu o tratamento com as enzimas fosfodiesterase (que converte o RNA em 5'- ribonucleotídeos) e adenildeaminase (que converte 5'-AMP em 5'-IMP).

[184] As enzimas utilizadas foram RP-1 G (fosfodiesterase) e Deamizyme 50000 G (adenildeaminase).

Caracterização com substratos-padrão

[185] Para conhecer o funcionamento das enzimas e testar sua viabilidade, foram realizados ensaios com os respectivos substratos-padrão.

[186] Para a RP-1 (fosfodiesterase), foi preparada uma solução em tampão fosfato pH 5,5 de RNA de levedura 1mg/mL e adicionada a enzima na concentração final de 1% (m/v). A reação ocorreu a 60°C, durante 6h.

[187] Para a enzima Deamizyme 50000 G, a solução do substrato foi preparada a partir de 5'-AMP (1mg/mL) em tampão fosfato pH 5,5 e, então, adicionada a enzima na concentração final de 1% (m/v). A reação ocorreu a 50°C, durante 6h.

[188] As reações foram interrompidas por aquecimento a 85°C durante 15 min. As análises foram realizadas por eletroforese capilar como descrito anteriormente.

Modo de aplicação no material autolisado

[189] Como na literatura não havia clareza quanto ao modo de aplicação da enzima fosfodiesterase, se antes da centrifugação (material ainda com a parede celular) ou após centrifugação (material sem a parede celular), nem quanto a diluição do material para a aplicação, foram feitos ensaios para determinar o modo de aplicação da enzima.

[190] Foram adotadas duas estratégias: na primeira, o material sofreu autólise, sendo, em seguida, o material centrifugado a 10000.g durante 10min. A

seguir, a parte solúvel foi diluída 2 e 4 vezes com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,5. Na sequência, foi adicionada a fosfodiesterase na concentração de 1% (m/v). A reação ocorreu a 60°C durante 6h e foi terminada por aquecimento a 85°C durante 15min.

[191] Na segunda estratégia, a autólise foi realizada da mesma maneira, em seguida, o material foi diluído 2 e 4 vezes com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 5,5. A fosfodiesterase foi adicionada na concentração de 1% (m/v). A reação ocorreu durante 6h a 60°C e foi interrompida pelo aquecimento do material a 85°C durante 15 min, seguido de centrifugação a 10000.g durante 10min.

[192] Após filtragem em membrana com poros de 0,22µm, as amostras foram analisadas como descrito no exemplo 3.

Determinação da concentração da enzima e tempo de reação

[193] Após a determinação do modo de aplicação da enzima, foram realizados ensaios para determinar a concentração e o tempo de aplicação da fosfodiesterase e da adenildeaminase. Esse experimento foi válido também para conhecer o comportamento da enzima perante o substrato complexo utilizado, o autolisado. Para tal, procedeu-se à autólise da levedura. Em seguida foi adicionada a fosfodiesterase ao autolisado, nas seguintes concentrações: 0,3%, 0,65% e 1% (m/v). A reação ocorreu por 2h, 4h, 6h e 8h e foi terminada por aquecimento a 85°C durante 15 min. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm de poro e analisadas por EC, utilizando 20µL de acetona como marcador de fluxo e 20µL de salicilato de sódio 350µg/mL em 180µL de amostra. A área resultante dos picos foi comparada a uma curva-padrão de 5'-AMP, 5'-GMP e 5'-IMP, confeccionada nas condições de EC do exemplo 2, pois, nesse momento, ainda não havia sido realizada a otimização do método.

[194] Após a determinação da concentração e do tempo de aplicação da fosfodiesterase, foram testadas diferentes concentrações de adenildeaminase. Após a reação com a fosfodiesterase, na sua melhor condição, a reação foi terminada por aquecimento a 85°C durante 15min, seguida de centrifugação a 10000.g por 10min. Ao sobrenadante foi adicionada a enzima adenildeaminase nas concentrações de 0,3%, 0,65% e 1%, incubando o sistema por 2h, 4h, 6h e 8h a 50°C. A reação foi terminada por aquecimento a 85°C durante 15min. Os produtos dos tratamentos enzimáticos foram analisados por eletroforese capilar como descrito anteriormente (conforme exemplo 2).

[195] A produção de 5'-GMP e 5'-IMP é corriqueiramente feita por meio da autólise das leveduras e, ocasionalmente, são adicionadas duas enzimas ao processo: a fosfodiesterase e a adenildeaminase. A fosfodiesterase é responsável por hidrolisar a molécula de RNA, liberando 5'-ribonucleotídeos, já a adenildeaminase transforma 5'-AMP em 5'-IMP (nucleotídeo com propriedades aromáticas). Essas enzimas fizeram parte dos estudos do planejamento experimental, e, como na literatura não existem muitos dados em relação aos seus modos de aplicação em autolisados de levedura, foram realizados experimentos para determinar o modo de aplicação, concentração e tempo de reação dessas enzimas, de forma que elas fossem utilizadas corretamente no planejamento experimental.

[196] O primeiro ensaio realizado teve como objetivo testar o funcionamento das enzimas fosfodiesterase e adenildeaminase.

[197] Os eletroferogramas da reação da fosfodiesterase com RNA padrão estão apresentados na figura 16. Em 0h de reação enzimática, existe apenas um pico, largo, correspondente à molécula de RNA. Já no tempo 5h de reação, existem vários picos, resultantes da degradação do RNA em 5'-ribonucleotídeos. A reação de teste da adenildeaminase com 5'-AMP padrão está representada na

figura 17. Observa-se que, após 6h de reação, a conversão de 5'-AMP em 5'-IMP ainda é baixa.

[198] Quando foram realizados ensaios de aplicação da fosfodiesterase no autolisado, observou-se que a melhor maneira de aplicação, das que foram testadas, foi a diluição de 4 vezes, sem centrifugação prévia (figura 18). Apenas pela análise qualitativa dos eletroferogramas, percebe-se que, quando amostra é centrifugada, não são gerados 5'-ribonucleotídeos em quantidade suficiente para serem detectados.

[199] Em relação à diluição, pode-se comparar qual seria a melhor diluição por meio do resultado das áreas resultantes da análise dos ribonucleotídeos em EC (vide Tabela 4).

Tabela 4: Áreas dos ribonucleotídeos em EC em diferentes diluições do material autolisado para tratamento em 5'-fosfodiesterase

Tratamento (5h de reação)	**5'-AMP (Área do pico)**	**5'-GMP (Área do pico)**	**5'-IMP (Área do pico)**
Diluição 2 vezes	4575	4617	5212
Diluição 4 vezes	7187	7766	7825

[200] Também foram testadas diferentes concentrações das enzimas e tempos de reação. Os resultados para a fosfodiesterase estão apresentados na figura 19. Foi escolhido como tempo de reação o tempo de 8h e concentração de fosfodiesterase de 0,3%. Interessante observar que a ação da enzima aumentou consideravelmente a quantidade de ribonucleotídeos, pois no tempo 0 de reação as quantidades eram de 20µg/mL de 5'-AMP, 3µg/mL de 5'-GMP e 2µg/mL de 5'- IMP.

[201] Quanto à aplicação da adenildeaminase no material resultante da ação da fosfodiesterase, observou-se diminuição na concentração de 5'-AMP e 5'-GMP, com pequeno aumento na quantidade de 5'-IMP (de 16,6µg/mL para 23,1µg/mL) como mostrado na figura 20.

[202] O ensaio teve duas reações controle. Um controle foi a reação da adenildeaminase com 5'-AMP nas condições do ensaio, onde houve conversão após 6h (figura 17). Com isso, foi possível verificar que a enzima está ativa e é capaz de transformar 5'-AMP e 5'-IMP. No outro controle, o experimento foi realizado sem a adição da adenildeaminase ao material obtido da reação da 5'-fosfodiesterase. Assim, o produto obtido da ação da fosfodiesterase (com 5'-ribonucleotídeos) foi mantido no pH, tempo e temperatura do ensaio. Com isso, foi possível verificar que não houve degradação do material nas condições de reação a adenildeaminase.

[203] Dessa forma, pode-se descartar esses dois fatores para explicar a ineficiência da reação. O que pode explicar o fato das concentrações de 5'-AMP e 5'-GMP diminuírem é que a Deamizyme 50000G pode conter outras enzimas além da adenildeaminase. Assim, quando se utilizaram substratos complexos, como é o caso do material autolisado, pode ser que essas enzimas tenham maior ação do que propriamente a adenildeaminase, degradando os nucleotídeos. Essa ineficiência na reação do preparado que contém adenildeaminase já foi descrita em trabalhos como os de BELEM, M.A.F.; GIBBS, B.F.; LEE, B.H. Enzymatic Production of Ribonucleotides from Autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on Whey. Journal of Food Science, v.62, n. 4, p. 851-857, 1997 e KIM, J.H.; LEE, B.H.; LEE, J.S. Production of ribonucleotides by autolysis of *Hansenula anomalagrown* on Korean ginseng steaming effluent. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.93, n.3, p.318-321, 2002, onde não houve aumento significativo na concentração de 5'-IMP, enquanto que 5'-AMP e 5'-GMP tiveram suas concentrações diminuídas.

[204] Para o planejamento experimental, foi escolhido o tempo de reação de 6 horas, com a enzima em concentração de 0, 65% (figura 21).

EXEMPLO 6: Caracterização do MOS comercial

[205] Para conhecer o material que foi utilizado como controle da atividade de ligação, foi feita a caracterização dos polissacarídeos de uma amostra de MOS comercial.

[206] Primeiramente, 2g de MOS comercial foram solubilizados em água (0,4g/mL), sob agitação magnética durante 1h. Em seguida o material foi centrifugado (10min a 10000.g), permitindo a separação do MOS comercial em uma fração insolúvel (MOS-I) e uma solúvel (MOS-S). O MOS-I foi liofilizado. Ao MOS-S foram adicionados 3 volumes de etanol, seguido de precipitação a 4°C durante 12h. Após nova centrifugação, obtiveram-se dois materiais, o sobrenadante etanólico (MOS-Set) e o precipitado etanólico (MOS-Pet).

[207] As diferentes frações do MOS solúvel (MOS-S, MOS-Set, MOS-Pet) foram submetidas à análise de CCD, HPSEC e RMN.

[208] A fração insolúvel do MOS (MOS-I) foi submetida a extrações seqüenciais em meio alcalino (200mg/ 3 mL de NaOH 0,5M) sob agitação magnética por 1h a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi diluído em D_2O pura para análise por RMN e o precipitado foi ressuspendido em 2mL de NaOH 1M. Após agitação (1h) e nova centrifugação, o sobrenadante foi diluído em D_2O pura e o precipitado sofreu nova extração. O material foi diluído em NaOH 1M e permaneceu sob agitação a 50°C durante 1h. Após nova centrifugação, obtiveram-se dois materiais: o sobrenadante, que sofreu o mesmo procedimento que os outros, e o precipitado. O fluxograma esquemático da análise do MOS comercial está na figura 6.

Extrações de MOS da casca de levedura

[209] Diferentes condições de extração de MOS foram testadas, com base no que já foi verificado na literatura. A casca foi obtida pela centrifugação do autolisado, o qual foi obtido a partir do seguinte processo: pH 5,5 a 50°C, 15% de

sólidos por 24h. Após liofilização, a casca sofreu dois processos extrativos diferentes:

a) diluição em solução de KOH 2%, seguido de aquecimento a 100°C, 75°C, 50°C e 25°C durante 2h, 4h e 6 h (combinações tempo e temperatura);
b) diluição da casca em tampão fosfato de sódio 50mM em quatro diferentes pH (8,5, 7,0, 5,5 e 3,0) e aquecimento a 121°C durante 1h, 2h e 4h (combinações de pH e temperatura).

[210] Cada um dos extratos foi neutralizado, centrifugado, e o sobrenadante e o precipitado liofilizados e pesados, para que a solubilidade do material pudesse ser determinada.

[211] Todos os produtos obtidos desses processos foram testados quanto à capacidade de ligação a patógenos e caracterização em relação à quantidade de proteínas, RNA e carboidratos totais, de acordo com as metodologias descritas no exemplo 1.

[212] O MOS comercial foi utilizado como controle nos testes de capacidade de ligação a bactérias (ver item 5.14.). Para poder comparar as estruturas químicas presentes no MOS comercial com o MOS produzido nas diferentes condições utilizadas no presente trabalho, primeiramente o MOS comercial foi caracterizado. Para isto o MOS comercial foi submetido a um fracionamento por solubilidade em água e análise das frações por CCD, HPSEC e RMN.

[213] O fracionamento consistiu em diluição do MOS comercial em água, seguida de centrifugação, gerando duas frações (MOS-I, insolúvel, e MOS-S, solúvel). O MOS- S foi submetido à precipitação etanólica, gerando MOS-Pet e MOS-Set. O MOS-I foi submetido a extrações alcalinas sucessivas, gerando as frações MOS-0, 5, MOS-1 e MOS-50 (figura 6).

[214] As frações obtidas a partir do MOS comercial foram primeiramente submetidas a uma análise de CCD (figura 22).

[215] O intuito da CCD foi descobrir se o MOS disponível comercialmente continha estruturas oligossacarídicas. Como é possível observar, as frações MOS-S e MOS-Set apresentaram uma estrutura de baixa massa molecular, que ficou entre a manose e a manobiose na CCD, porém, principalmente, o produto apresenta componentes de elevada massa molecular, que não apresentam mobilidade na CCD. Dessa forma, pela CCD não foi possível afirmar se havia ou não oligossacarídeos na amostra. Para tal, foi realizada uma análise de RMN de ^{13}C para a fração MOS-S do MOS (figura 23).

[216] Na figura 23 é possível observar sinais entre 55ppm e 10ppm que podem ser atribuídos a peptídeos, e sinais na região de carboidratos (110ppm-60ppm) que indicam a presença de α-manana e do dissacarídeo não-redutor trealose. Não foi observado sinal de carbono redutor (93,5ppm) no espectro, de forma que o MOS não possui estruturas oligossacarídicas detectáveis por RMN de C^{13}.

[217] A figura 24 mostra que os sinais de manose permaneceram no precipitado após tratamento com etanol, indicando que se trata de um polissacarídeo, juntamente com outros polissacarídeos presentes na amostra. É importante observar que os sinais de ligação carbono-nitrogênio diminuíram de forma expressiva, ou seja, tais sinais indicavam a presença de peptídeos na amostra, os quais, pela sua baixa massa molecular, não precipitaram no processo com etanol.

[218] No sobrenadante etanólico (figura 25), a trealose fica evidente, podendo ser totalmente assinalada de acordo com o trabalho de MARTIN, F., CANET, D., MARCHAL, J-P.^{13}C nuclear magnetic resonance study of mannitol cycle and trehalose synthesis during glucose utilization by the ectomycorrhizalascomycete *Cenococcum geophilum*. Plant Physiology, v.77, p.499–502, 1985 e o RMN realizado com um padrão de trealose (figura 25). Isso justifica o *spot* presente na CCD (figura 22, linhas 4 e 6), que ficou entre a manose e a manobiose, pois a

trealose é um dissacarídeo de glucose, α-α-(1-1), tendo comportamento cromatográfico diferente da manobiose. Também é possível observar no sobrenadante etanólico a presença dos sinais de nitrogênio (entre 55ppm e 10ppm), indicando, novamente, que se trata de peptídeos e não de proteínas.

[219] Os espectros de RMN dos extratos obtidos com NaOH a partir da fração insolúvel estão apresentados nas Figuras 26, 27 e 28.

[220] Por meio dessas extrações alcalinas, observa-se que o produto é composto, basicamente, de mananas e glucanas, representadas pelos sinais de C1, 102,5 ppm e 103,5 ppm, respectivamente. Os outros sinais não assinalados no espectro são referentes aos outros carbonos das mananas e das glucanas. Na extração mais branda, com NaOH 0, 5M, o sinal de manana é mais intenso, e, à medida que a extração fica mais severa, o sinal de glucana aumenta.

[221] Para conhecer o perfil do produto, o precipitado e o sobrenadante etanólico foram analisados em HPSEC-MALLS-RID, de acordo com a metodologia descrita no exemplo 2.

[222] O precipitado etanólico (figura 29) da fração comercial apresenta compostos de alta massa molecular (sinal de MALLS em 40 min) em baixa concentração (sinal de RID em 40min) e compostos de menor massa molecular (sinal de MALLS acima de 50min) em alta concentração (sinal de RID acima de 50min). Estes compostos correspondem às mananas da levedura com elevado grau de polidispersão.

[223] O sobrenadante etanólico (figura 30) apresenta predominantemente compostos de baixa massa molecular, em altas concentrações (mostrado pelo detector de Índice de Refração) que correspondem aos peptídeos e à trealose.

[224] Os resultados demonstram que o MOS comercial é um produto complexo e heterogêneo, constituído principalmente por carboidratos e peptídeos. Den-

tre os carboidratos foi possível detectar polissacarídeos do tipo α-mananas polidispersas e β-glucanas e o dissacarídeo trealose.

EXEMPLO 8: Ensaios de capacidade de ligação do MOS a patógenos

[225] Os ensaios de capacidade de ligação do MOS a patógenos foram realizados segundo a metodologia proposta por GANNER, A., STOIBER, C., WIEDER, D., SCHATZMAYR, G. Quantitative in vitro assay to evaluate the capability of yeast cell wall fractions from *Trichosporon mycotoxinivorans* to selectively bind gram negative pathogens. Journal of Microbiological Methods, v.83, p.168–174, 2010. Esta é uma metodologia que correlaciona a curva de crescimento do microrganismo à quantidade de células que ficou ligada ao produto testado. O microorganismo testado foi a bactéria enteropatogênica *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028.

[226] A primeira etapa do protocolo consistiu em construir um gráfico log UFC (unidades formadoras de colônias) x tempo de detecção. O tempo de detecção corresponde ao tempo necessário para o cultivo de bactérias alcançar a densidade óptica de 0,1. Para tal, as bactérias foram crescidas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) durante 24h, a 37°C. A densidade óptica dessa suspensão bacteriana foi medida e ajustada para 0,1. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições sucessivas em PBS (tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 0,15M, pH 7,0). De cada diluição, 0,1mL foi utilizado para plaqueamento em meio sólido e 0,1mL para a leitura da densidade óptica em microplacas. O plaqueamento foi realizado em TSB-Ágar por profundidade, seguido de incubação a 37°C e posterior contagem das unidades formadoras de colônias. Para a leitura da densidade óptica (690 nm), as microplacas foram bloqueadas com BSA 1%, a 4°C, durante 1h. Em seguida, as diferentes diluições (0,1mL) foram colocadas na placa, em quintuplicata, e adicionadas de meio TSB (0,1mL). Os brancos da leitura foram realizados por meio da adição de 0,1mL de PBS e

0,1mL de TSB. A microplaca foi incubada a 37°C no leitor de microplacas, onde foram realizadas leituras da absorbância a cada 15min durante 8h.

[227] Com a contagem de UFC para cada diluição e o tempo que cada diluição levou para alcançar a absorbância de 0,1 na microplaca, foi possível construir um gráfico relacionando esses dois parâmetros. Por meio da reta desse gráfico, foi possível saber, através do tempo que o tratamento levou para alcançar a absorbância de 0,1 na microplaca, a quantidade de bactérias que estava presente naquele micropoço.

[228] De posse dessa reta, foi possível realizar os testes de ligação. Para isso as frações a serem testadas foram diluídas em PBS na concentração de 1%. Em seguida, 300µL dessa suspensão foram transferidos aos poços da placa de poliestireno de alta aderência. Após incubação a 4°C durante 16h-18h, a placa foi lavada 3 vezes com 300µL de tampão PBS por poço. O bloqueio dos lugares não ocupados pelo produto (MOS comercial ou extrações da casca) foi feito com 300µL de albumina soro-bovina 1% a 4°C, durante 1h (para que não houvesse ligações inespecíficas), seguida de lavagem com tampão PBS por 3 vezes. Após crescimento por 24h a 37°C em meio TSB e ajuste para densidade óptica de 0,1, foram adicionados a cada poço 300µL da suspensão bacteriana, seguindo-se incubação durante 60min a 37°C para permitir sua ligação ao produto testado. Após lavagem por 6 vezes com tampão PBS, para retirar as bactérias não ligadas ao produto, foram adicionados 200µL de meio de cultivo, TSB, e uma gota de óleo de parafina, para que não houvesse evaporação do meio. Assim, a placa foi incubada em leitor de microplacas, a 37°C com leituras a cada 15min a 690nm, durante 16h.

[229] A comparação entre os produtos foi realizada por meio da razão da quantidade inicial de bactérias ligadas tanto para os extratos obtidos, quanto para o produto comercial, de acordo com a equação 5.

$$Capacidade\ de\ Liga\tilde{c}ão\ Relativa = \frac{UFC\ produto}{UFC\ MOS} \times 100\%$$ (equação 5)

[230] Onde: UFC produto = Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) resultante da aderência do patógeno no produto testado; UFC MOS = unidades formadoras de colônias (UFC/mL) resultante da aderência do patógeno no MOS Comercial.

[231] Os MOS obtidos nas diferentes condições de extração foram analisados em relação às suas capacidades de ligação a patógenos e comparados com os resultados do MOS comercial.

[232] Na figura 31 é apresentada a reta que correlaciona o tempo necessário para a densidade óptica chegar em 0,1 e o número inicial de UFC.

[233] Utilizando essa reta, foi possível transformar o tempo que cada extrato, submetido ao teste de capacidade de ligação, levou para alcançar a densidade óptica de 0,1, e assim estimar a quantidade de bactérias, em forma de UFC, que foram capazes de permanecer ligadas nos extratos.

[234] Para padronizar os resultados do ensaio de capacidade de ligação, todos os extratos, tanto os alcalinos (figura 32) quanto os aquosos (figura 33), foram comparados ao MOS comercial (considerado como 100%).

[235] Os extratos alcalinos obtidos a 50°C e 100°C e os extratos aquosos obtidos a pH 7,0 e 8,5 apresentaram capacidade de ligação relativa muito abaixo do MOS comercial. Já o extrato alcalino a obtido 75°C, os extratos aquosos obtidos a 121°C a pH 3,0 durante 1h e durante 4h e a pH 5, 5 durante 4h, apresentaram capacidade de ligação próxima do MOS comercial. Os extratos que apresentaram melhor resultado (atividade superior ao MOS comercial) foram os da extração alcalina a 25°C e os extratos aquosos pH 3,0-2h, pH 5,5-1h e pH 5,5-2h.

Análise dos extratos aquosos e alcalinos

[236] Todos os extratos foram analisados em relação à capacidade de ligação,

solubilidade, proteínas, RNA e carboidratos totais. As porcentagens apresentadas (solubilidade, ligação, proteínas e RNA) são em relação ao produto total (somatório da parte solúvel e insolúvel). Foi possível observar as diferenças na solubilidade dos extratos. Nas extrações alcalinas, ela foi aumentando com o aumento do tempo de extração e com o aumento da temperatura, começando com 50% (25°C - 2h) e atingindo 93% (100°C - 6h). Processo semelhante aconteceu com os extratos aquosos, sendo a menor solubilidade verificada em pH 3-1h (17%) e a maior verificada em pH 8,5-2h e 4h (52%-50%). Relacionando os valores de solubilidade com a capacidade de ligação, pode-se perceber que os produtos com menor solubilidade, aproximando-se da casca, apresentam, em geral, maior capacidade de ligação a patógenos, sugerindo que a estrutura deve ser preservada para que a ligação a patógenos seja eficiente.

[237] Com relação à quantidade de proteínas, RNA e carboidratos totais, é importante fazer uma consideração. Como a extração é fechada (teoricamente não há perda de material, a não ser por degradação), a soma de proteínas solúveis e insolúveis para cada extrato deveria corresponder à quantidade de proteína da casca, e assim para todos os componentes. Pode-se observar que, nas extrações alcalinas, as somatórias das frações solúveis e insolúveis de cada componente analisado são menores que o total presente na casca. Isso pode ser explicado pelo fato de que grande quantidade de sal é formada durante a neutralização do extrato, se tornando componente do produto final. Isso pode ser comprovado pela diferença entre os componentes totais da amostra 50°C-2h e 50°C-4h, sendo a segunda dialisada, o sal formando durante a neutralização saiu na diálise, ficando apenas o produto. O mesmo acontece com a amostra 100°C-4h, quando se analisa carboidratos totais, já em relação a proteínas, a diminuição é devido à perceptível degradação delas a essa temperatura.

[238] Apesar da influência do sal na composição dos produtos, é possível fazer

uma relação entre eles. Em relação à quantidade de proteínas, os extratos com maior capacidade de ligação são aqueles com maior quantidade de proteínas insolúveis (25°C-2h, 25°C-4h, 25°C-6h, pH 3,0-2h, pH 5,5-1h e pH 5,5-2h). Isso mais uma vez evidencia que quanto mais intacta a estrutura da parede celular, maior a capacidade de ligação. É possível observar que para as extrações alcalinas, com o aumento da temperatura e do tempo em cada temperatura, a quantidade de proteínas na parte insolúvel do produto diminui, o que acompanha a diminuição da capacidade de ligação. Em temperaturas maiores, 75°C e 100°C, a soma da quantidade de proteínas diminui, sugerindo que pode estar ocorrendo degradação dessas proteínas em aminoácidos, que não são detectados pelo método de análise. Nas extrações aquosas, em pH mais básicos (pH 8,5), a quantidade de proteínas na parte insolúvel também diminuiu. Isso ocorre pela maior solubilização das proteínas em pH alcalino.

[239] Em relação à quantidade de RNA, não há evidências da relação da quantidade de RNA no produto com a capacidade de ligação. Nas extrações alcalinas a 25°C, há grande quantidade de RNA na fração solúvel, o que não ocorre em outras temperaturas, onde não há grande quantidade de RNA, nem na parte solúvel nem na insolúvel. Isso aponta para a degradação dos ribonucleotídeos em temperaturas mais elevadas. No processo de extração aquosa, houve solubilização dos ribonucleotídeos.

[240] A quantidade de carboidratos totais (insolúveis e solúveis) permaneceu praticamente constante para todos os extratos, já considerando a diferença dos extratos alcalinos devido à formação de sal. Há maior liberação de carboidratos para a parte solúvel com o aumento da temperatura e do tempo, nos extratos alcalinos, e do pH e do tempo, nos extratos aquosos. Esse aumento na solubilidade dos carboidratos acompanha o aumento da quantidade de proteí-

nas na parte solúvel, indicando que os carboidratos liberados são, predominantemente, manoproteínas.

[241] A partir desse estudo podem ser obtidos diferentes produtos: com maior capacidade de ligação (casca, 25°C-2h e pH 5,5-1h), com capacidade de ligação mediana e maior quantidade de proteínas solúveis (75°C-2h, pH 7,0-1h e 2h), maior quantidade de proteínas solúveis apenas (pH 8,5-2h), maior quantidade de RNA solúvel (25°C-2h e extrações aquosas), e maior quantidade de carboidratos solúveis (100°C-2 h e ph 8,5-4h). Esses produtos apesar de, em muitos casos, não apresentarem capacidades de ligação tão altas quanto a da casca, poderiam ser testados em uma segunda etapa, em testes *in vivo*. Isso porque tais produtos podem apresentar maior biodisponibilidade dos outros compostos (Proteínas, RNA, Carboidratos), o que pode ser benéfico ao organismo do animal, e no sistema, agir melhor do que a própria casca.

Caracterização estrutural dos produtos que apresentaram maior capacidade de ligação

[242] Os extratos que apresentaram melhor capacidade de ligação relativa (25°C-2h e pH 5, 5-1h) foram submetidos a uma caracterização mais detalhada: HPSEC e RMN de ^{13}C.

Cromatografia de exclusão (HPSEC)

[243] Os cromatogramas resultantes da análise de HPSEC para as duas amostras estão apresentados nas figuras 34 e 35. É importante destacar que esta técnica fornece o perfil cromatográfico das moléculas solúveis no produto.

[244] Os dois extratos apresentaram perfis com algumas semelhanças: picos correspondentes a moléculas de alta massa, porém em pequenas quantidades (picos entre 35min-45min) e a maior parte das moléculas que absorvem em UV (proteínas, peptídeos e/ou RNA) apresentam baixa massa (pico entre 50min-60min).

[245] Em 25°C-2h, há maior concentração de moléculas de elevada massa molecular (pico em 45min-50min), quando comparado com o perfil de pH 5,5-1h, que apresenta o pico mais intenso no RID em 60min (compostos de baixa massa).

[246] Os perfis dos extratos também são semelhantes ao perfil em HPSEC do MOS comercial, com moléculas de alta massa, em baixas concentrações e moléculas de baixa massa e em altas concentrações, sendo que as moléculas de elevada massa molecular eluem em 40 min de análise. Também há grande quantidade de proteínas eluindo juntamente aos compostos de baixa massa.

RMN de ^{13}C

[247] Em relação à análise de RMN, as frações solúveis dos dois tratamentos, 25°C-2h e pH 5,5-1h, apresentaram espectros semelhantes (figuras 36 e 37).

[248] Os dois tratamentos resultaram em maior quantidade de mananas na fraçãosolúvel, quando comparados ao MOS comercial. As principais ressonâncias dessas frações estão assinaladas nas Figuras 36 e 37 de acordo com GORIN, P.A.J. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v.38, p. 13-104, 1981.

[249] A principal diferença em relação ao espectro da fração solúvel do MOS Comercial (figura 23) está na ausência de sinais relativos a proteínas, o que está de acordo com os resultados da já apresentados (0,3% e 0,9% de proteína, para 25°C-2h e pH 5,5-1h, respectivamente).

[250] Em relação às frações insolúveis, é possível observar no tratamento 25°C-2h, além dos sinais das mananas, sinais de β-glucanas (figura 38), sendo que estes últimos não aparecem em pH5, 5-1h (figura 39).

[251] Nas frações solúveis de 25°C-2h e pH 5,5-1h, as mananas aparecem quase purificadas, e, comparando com a figura 23 - que mostra o experimento de RMN para a fração solúvel do MOS comercial, podemos perceber que não há

sinais de trealose, nem de peptídeos, nas frações obtidas no presente trabalho.

[252] Em relação à ausência de trealose, a explicação para sua inexistência nos extratos desse trabalho pode estar no fato das células de levedura estar em outra fase do ciclo de vida, antes dos tratamentos para obtenção dos extratos. É possível que as células utilizadas para a obtenção do MOS comercial sejam aquelas do final da fermentação, que ficaram armazenadas até o início do processo de obtenção do MOS comercial, acumulando trealose para a proteção da célula. Assim, tais células não sofreriam o processo de reativação para o aumento da quantidade de RNA, nem o processo de autólise controlada, para liberação de proteínas e RNA no meio. Isso também justificaria, em parte, a quantidade de sinais de proteínas e ácidos nucléicos presentes na fração solúvel do MOS comercial, e ausentes nos extratos obtidos nesse trabalho.

[253] Essa seria parte da justificativa, pois os materiais insolúveis também são diferentes, entre os extratos 25°C-2h e pH 5,5-1h e o MOS comercial. Nos extratos, há grande quantidade de proteínas nas frações insolúveis (figuras 38 e 39) – 10ppm a 55ppm), já no MOS comercial, esses sinais de proteínas não aparecem tão intensos (a maior parte passou para a fração solúvel) (figura 23). Isso pode ser reflexo do tratamento para a obtenção do MOS comercial, o qual pode ser mais severo que os que foram selecionados para esse trabalho.

[254] Dessa forma, como observado nos ensaios de capacidade de ligação, a estrutura do MOS comercial poderia estar mais modificada, resultando em uma menor capacidade para ligar a patógenos.

[255] Esta baixa atividade também foi levantada pelos criadores de animais, que utilizam o produto comercial (Barga, 2011, comunicação pessoal). Porém, ainda é importante lembrar que o modo de secagem também pode influenciar na eficiência dos produtos, enquanto o MOS comercial passou por uma secagem

em secadores industriais, os extratos desse trabalho foram secados por liofilização, a forma de secagem que mais conserva o produto. Dessa forma, todos esses produtos deveriam ser testados *in vivo*, para uma avaliação dos seus efeitos, mais amplamente, nos animais.

EXEMPLO 9: Visão geral do processo

[256] As leveduras excedentes geradas na usina de etanol passariam por uma reativação de forma que o conteúdo de RNA das células fosse elevado. Em seguida, essas células sofreriam o processo de autólise. Na figura 1 está proposta uma condição de autólise o qual se mostra adequado tanto para a produção de 5'-AMP e 5'GMP. Porém outras condições poderiam ser utilizadas, as que favorecem mais a produção de 5'-GMP ou as que favorecem mais a produção de 5'-AMP, dependendo da especificação do produto final desejado. Essa especificação, no caso de flavorizantes, deve ser determinada por meio de uma análise sensorial nos produtos aplicados.

[257] Após a centrifugação do material autolisado, tem-se uma fração rica em ribonucleotídeos (sobrenadante). Essa fração poderia ainda passar por um tratamento enzimático (fosfodiesterase e adenildeaminase), de forma que se possa obter maior quantidade de 5'-GMP ou 5'-IMP. A otimização das condições de autólise seguida de tratamento enzimático não foi estudada neste trabalho, bem como a purificação dos ribonucleotídeos.

[258] A outra fração resultante da centrifugação do material autolisado é a casca ou parede celular da levedura (precipitado). Essa casca passaria por uma extração aquosa (pH 5,5, 121°C, 1h), de forma que um produto rico em mananas e β-glucanas e com alta capacidade de ligação a patógenos *in vitro* possa ser obtido. Esse produto poderia ainda passar por etapas de purificação, as quais não foram estudadas neste trabalho. Outras extrações poderiam ser

realizadas, dependendo da característica desejada no produto: maior quantidade de proteínas solúveis, maior quantidade de RNA solúvel, maior quantidade de carboidratos solúveis.

[259] Tendo como exemplo uma usina de etanol com produção de 200 m³/dia, o excedente de leveduras seria em torno de 6 ton/dia. Dessa forma, com o processo proposto, seria necessário manter um tanque agitado para a reativação e autólise (em torno de 160m³), uma centrífuga e um tanque para a extração da casca (em torno de 36m³). Seria possível obter em torno de 3600 kg do produto rico em mananas e glucanas, 18 kg de 5'-AMP e 4, 2 kg de 5'- GMP por dia. Assim, os investimentos em equipamentos não seriam onerosos para usina.

EXEMPLO 10: Avaliação atividade imunomoduladora dos derivados de levedura

[260] As leveduras excedentes industriais foram processadas de acordo com o processo descrito na figura 1. Estes produtos foram desidratados e posteriormente aplicados a 0,2% sobre a ração, conforme figura 40, na dieta de frangos. Foram utilizados 311 pintinhos fêmeas matrizes de linhagem comercial pré-vacinados contra doença de Marek. Os animais foram alojados com 1 dia de idade.

[261] Coletou-se sangue de 11 destes animais, considerando como tempo zero ou inicial de experimento para posteriores comparações. Os outros 300 pintinhos foram todos pesados e distribuídos aleatoriamente em 6 baias, num total de 50 por grupo. Os animais ficaram assim distribuídos: o grupo 1 foi o grupo controle, onde não foi adicionado nenhum promotor de crescimento. O grupo 2, o grupo onde foi ministrado a levedura inativa seca (LIS), considerado como controle negativo, por tratar-se da levedura seca, sem processamento. Ao grupo 3 foi adicionada a fração parede celular (CW). Ao grupo 4 foi adicionada a fração manooligossacarídeos (MOS), ao grupo 5 foi ministrado β-glucana (BG) e ao grupo 6 foi adicionada o extrato rico em ribonucleotídeos (RN). Todas as frações

foram dosadas a 0,2% sobre a ração, com exceção do grupo controle (C). Abrangendo 6 grupos com 6 repetições de coletas (7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias e 42 dias de experimento) de 8 animais cada, totalizando 48 animais a cada coleta. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum* através de todo o experimento. As camas foram compostas por cepilhos não autoclavados, visando desafiar os animais. O que, além da questão do cepilho reutilizado, há também o espaço fornecido aos animais. Algumas horas antes do alojamento dos animais, acionamos o aquecimento à gas no ambiente, para assegurar um ambiente com conforto térmico aos animais. Aplicaram-se também os protocolos de criação de aves de corte comerciais para lotação por baia (14 aves/m^2 ao final do experimento). A coleta de sangue dos frangos foi realizada com agulhas e seringas estéreis de duas formas: em animais mais jovens (até os 15 dias), a coleta foi feita através de punção cardíaca ou em animais maiores, através de punção das veias jugular ou ulnar cutânea, utilizando-se dos protocolos-padrão de contenção dos animais e assepsia de acordo com FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. A basic laboratory manual for the small scale production and testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine. FAO, 2002. Após a coleta, o sangue era então colocado em tubos já contendo anticoagulante.

[262] Para a análise em citometria de fluxo, seguiu-se a metodologia de FAIR, J.M., TAYLOR-MCCABE, K.J., SHOU, Y., MARRONE, B.L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.125, p.268-273, 2008, porém modificou-se a etapa de separação de mononucleares, sendo substituída pela marcação com CD45- FitC, marcador de leucócitos de frangos, conforme DE BOEVER, S., CROUBELS, S., DEMEYERE, K., LAMBRECHT, B., DE BACKER, P., MEYER, E. Flow cytometric differentiation of avian leukocytes and analysis of their intracellular cytokine expression. Avian Pathology, v.39, p.41-46, 2010.

Deu-se sequência à utilização de anticorpos na marcação de linfócitos T, monócitos e linfócitos B, conforme FIGURA 41.

[263] Para identificar as moléculas em superfície dos leucócitos os seguintes anticorpos foram utilizados: camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8α (clone CT-8, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha MHC classe II (clone 2G11, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha TCRαβ/Vβ1 (clone TCR-2, IgG1, conjugado a RPE); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha Kul-01 (clone KUL01, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha Bu-1a (clone 21-1A4, IgG1, conjugado a R-PE). Considerando: FITC – Fluoresceína isotiocianato e R-PE – Ficoeritrina.

[264] As fluorescências dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, e FL2 (nm 585/42) para PE. Foram analisados 10.000 eventos na seleção de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). Em relação à análise estatística destes dados, foi utilizado teste de ANOVA de duas vias, análise de correlação de Pearson e teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$).

[265] Em relação ao ganho de peso dos animais, não houve diferenças significativas, o comparar-se a média de peso ganho dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 com o grupo controle (1), dados estes encontrados na figura 42.

[266] Em relação aos linfócitos T CD4 gerais (classificados conforme FIGURA 41), aos 28 dias de idade os grupos que receberam CW (*p<0,05), MOS (*p<0,05), BG (****p<0, 0001) e RN (****p<0, 0001) apresentaram quantidade significativamente maior de linfócitos T CD4 em comparação ao grupo controle (C), com valores de p igual a respectivamente 0,0121, 0,0380, <0,0001 e <0,0001 conforme a figura 43- A, B, C e D.

[267] Aos 28 dias de idade, o grupo que recebeu RN (*p<0,05) apresentou uma

quantidade significativamente maior de linfócitos T CD8 de mucosa em comparação ao grupo controle (C), com p= 0, 0122, conforme figura 44.

[268] Aos 28 dias de idade os grupos que receberam BG (*p<0,05) e RN (**p<0,001) apresentaram quantidade significativamente maior de linfócitos T CD8 não ativados com p = 0,0332 e p = 0,0042 respectivamente, em comparação ao grupo controle (C) com α=0, 05, conforme figura 45 A e B.

[269] Aos 28 dias de idade, os grupos que receberam BG (*p<0,05) e RN (**p<0,05) apresentou uma quantidade significativamente maior de linfócitos T CD8 ativados em comparação ao grupo controle (C), com p= 0,0143 e p=0,0014 respectivamente, conforme figura 46 A e B.

[270] Aos 7 dias de idade, os grupos que receberam BG (**p<0,001) e RN (*p<0,05) apresentaram quantidade significativamente maior de linfócitos T CD4 não ativados em comparação ao grupo controle (C) com α=0,05, com valor de p igual a 0,0010 e 0,0219 respectivamente. Já aos 28 dias, os grupos tratados com BG (*p<0,05) e RN (**p<0,01), cujos valores de p foram iguais a 0,0495 e 0,0073 respectivamente, conforme figura 47 A e B.

[271] Aos 14 dias de idade o grupo que recebeu MOS (****p<0,0001) apresentou uma quantidade significativamente maior de monócitos fagocíticos em comparação ao grupo controle (C) com α=0, 05, com valor de p igual a 0,0001. Já aos 28 dias, o grupo tratado com BG (**p<0,01), cujos valores de p foram iguais a 0,0042, conforme figura 48 A e B.

[272] Aos 28 dias de idade, o grupo que recebeu BG (****p<0,0001) e RN (****p<0,0001) e aos 35 dias o grupo tratado com CW (*p<0,05), apresentaram uma quantidade significativamente maior de APCs não monócitos circulantes em comparação ao grupo controle (C) com α=0,05, com valor de p igual respectivamente ≤ 0,0001, ≤0,0001 e 0,0378, conforme figura 49 A, B e C.

[273] Não houve, durante os 42 dias de experimento, nenhuma diferença significativa em relação ao aumento destas células em relação ao padrão. A única diferença significativa foi em relação ao grupo tratado com BG (** p <0,01) com α=0, 05. O valor de p foi de 0,0055, conforme figura 50.

[274] Todos os derivados de leveduras, em algum momento dos 42 dias de experimento com as aves, influenciaram na imunomodulação. A exceção ocorreu com a levedura inativa seca (LIS), cujo grupo tratado não mostrou nenhuma atividade com diferenças significativas em relação ao padrão. Isto já era aguardado, pois por tratar-se da biomassa de leveduras intactas inativadas e desidratadas, esta foi utilizada no experimento como controle negativo.

[275] Os imunomoduladores testados influenciaram na imunomodulação de frangos de corte e as populações celulares variaram em intensidade e tipo de resposta. Diferentes tipos celulares respondendo a um mesmo tratamento puderam ser notados, principalmente com a fração BG e RN. Isto indica que a ação dos imunomoduladores mesmo sendo forte a um tipo específico de célula, o sistema imunológico como um todo acaba sendo afetado visto que as células de defesa se comunicam e se influenciam mutuamente.

[276] Vale a pena salientar que, mesmo que os animais não tenham sido submetidos a um desafio específico, as disparidades individuais tendem a apresentar uma variável importante na avaliação dos resultados obtidos pela citometria de fluxo. Para facilitar o entendimento e a particularidade de cada tratamento, a discussão dos resultados foi classificada individualmente por produto utilizado neste tratamento.

[277] Houve um aumento de linfócitos T CD4 gerais em relação ao grupo controle em dois momentos: uma aos 7 dias de vida (marginalmente significativo) e outro aos 28 dias de idade. Ocorreu também um aumento de células T CD8 não ativados (28 dias), T CD8 ativados (28 dias) o qual indica uma resposta citotóxica.

[278] Ocorreu também um aumento de linfócitos T CD4 não ativados, os quais são conhecidos como virgens ou “naïve”, células estas de reserva. Esta ativação ocorreu em dois momentos, aos 7 dias e aos 28 dias de idade. Considerando que uma resposta ativada aos 7 dias de vida dos pintinhos, pode ser bastante importante se considerarmos este um período crítico na vida do animal.

[279] As respostas do tratamento desta fração RN em relação ao grupo controle (C) foram bem semelhantes às respostas encontradas pelo grupo BG. Mas as similaridades terminam ao constatarmos que no grupo RN em relação ao controle (C), houve também um aumento da quantidade de linfócitos T CD8 de mucosa, aos 28 dias de idade. Esta preparação de mucosa, na sua maioria intestinal ocorreu mesmo sem a exposição do animal a desafios específicos.

[280] A adição desta fração RN à ração, assim como a fração BG, gerou uma resposta celular mais completa envolvendo um aumento da quantidade de células estoque (virgens), monócitos fagocíticos, APCs não monócitos e linfócitos T CD4 e CD8, bem como como uma preparação da mucosa intestinal a prováveis infecções, mostrando assim, uma maior capacitação de resposta, principalmente entre os 7 e 28 dias de idade dos animais.

[281] Esta inovação não se limita às representações aqui comentadas ou ilustradas, devendo ser compreendida em seu amplo escopo. Muitas modificações e outras representações do invento virão à mente daquele versado na técnica à qual essa inovação pertence, tendo o benefício do ensinamento apresentado nas descrições anteriores e desenhos anexos. Além disso, é para ser entendido que o invento não está limitado à forma específica revelada, e que modificações e outras formas são entendidas como inclusas dentro do escopo das reivindicações anexas. Embora termos específicos sejam empregados aqui, eles são usados somente de forma genérica e descritiva e não como propósito de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1) Processo para a obtenção de ribonucleotídeos, parede celular, mananas e β-glucanas **caracterizado por** ser um processo fermentativo que utiliza leveduras, incluindo as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, dito processo compreendendo as seguintes etapas:
   a) cultivo das leveduras;
   b) reativação das leveduras;
   c) centrifugação das leveduras ativadas em b;
   d) autólise da biomassa obtida em c;
   e) centrifugação da biomassa autolisada, obtida em d, resultando em dois materiais, precipitado e sobrenadante, sendo que:
      i) o sobrenadante é submetido a reações enzimáticas específicas, para obtenção de diferentes tipos de ribonucleotídeos e a subsequente purificação dos ribonucleotídeos.
      ii) o precipitado, também denominado “casca ou parede celular”, é submetido a um processo de beneficiamento que compreende:
         (1) centrifugação do autolisado;
         (2) liofilização da “casca”;
         (3) diluição do liofilizado obtido em 2 em meio básico, seguida de uma etapa de aquecimento;
         (4) nova diluição em solução tampão, seguida de uma etapa de aquecimento;
         (5) neutralização dos extratos obtidos em uma das etapas compreendidas entre ii.3 e ii.4;
         (6) centrifugação dos extratos obtidos em uma das etapas compreendidas entre ii.3 e ii.5;
         (7) secagem das fases obtidas em 6.

Onde as ditas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* foram previamente utilizadas em processos de fermentação alcoólica.

2) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as leveduras utilizadas crescem em um meio de cultura constituído de uma fonte de carbono de origem industrial, como o melaço de cana-de-açúcar.
3) Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a fonte de carbono do meio de cultura deve possuir de 3°BRIX a 10°BRIX de concentração de açúcares.
4) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o cultivo das leveduras dura de 12h a 36h e acontece em temperatura controlada, não superior a 38°C nem inferior a 25°C, sob uma agitação de 100rpm a 500rpm.
5) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que, após o cultivo das leveduras, as mesmas podem ser submetidas a um processo de separação, preferencialmente a gravitação forçada, que inclui centrifugação a 500.g – 2.000.g, por 2min a 8min, não excluindo outros processos com o mesmo fim, como decantação e filtração.
6) Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que as células cultivadas são re-ativadas quando levadas a um novo meio de cultura, contendo de 10°BRIX a 20°BRIX de açúcares, constituído de melaço de cana-de-açúcar.
7) Processo, de acordo com as reivindicações 2 e 8, **caracterizado pelo** fato de que as leveduras cultivadas serem re-ativadas por um processo fermentativo que dura de 2h a 20h, em uma temperatura que pode variar de 25°C a 28°C, sob uma agitação de 150rpm a 400rpm.
8) Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de a autólise das leveduras compreender as seguintes etapas:

a) lavagem das células com solução salina, incluindo NaCl, usando um volume de 1,5 a 3 vezes superior à massa de células;

b) centrifugação da massa celular e ajuste do pH para um valor entre 4,0 e 7,0;

c) incubação da solução obtida em 8.b em ambiente de fermentação, a uma temperatura que pode variar de 35°C a 60°C, com uma agitação entre 100rpm e 300rpm, por 8h a 48h;

d) interrupção da autólise por um processo que interrompa a incubação, incluindo aquecimento em 70°C a 90°C, por 10min a 30min;

e) centrifugação do material obtido em 8.d a 300.g por 5min a 25min.

9) Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que obtém-se da etapa 8.e material contendo a parede celular da levedura (precipitado) e uma fração solúvel (sobrenadante).

10) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de o sobrenadante obtido em 8.e ser submetido a reações enzimáticas com qualquer combinação das enzimas fosfodiesterase e adenildeaminase.

11) Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de a reação com fosfodiesterase ser realizada após a autólise da levedura, sendo adicionada à reação de 0,3% a 1,5% (m/v) de enzima.

12) Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** fato de a reação enzimática durar de 2h a 10h, a uma temperatura entre 35°C e 60°C.

13) Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que o material resultante da reação com fosfodiesterase é centrifugado e submetido a nova reação com adenildeaminase.

14) Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que a reação com adenildeaminase dura de 2h a 10h, a uma temperatura entre 35°C e 60°C.

15) Produto, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado por** ser rico em ribonucleotídeos (5'-ribonucleotídeos e 5'-IMP).

16) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a "casca" da levedura passa por um processo de secagem, incluindo liofilização.

17) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o material seco, obtido em 1.e.ii.7, passa por qualquer combinação dos dois processos seguintes:

a) diluição em solução básica, incluindo KOH, de 1% a 5%, seguida de aquecimento, a uma temperatura que pode variar de 25°C a 100°C, por 2h a 10h;

b) diluição em solução tampão, incluindo fosfato de sódio, de 20mM a 80mM, em um pH de 3 a 8,5, sob uma temperatura de 90°C a 140°C, por um período de tempo de 1h a 4h.

18) Processo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que o material é neutralizado e centrifugado.

19) Produto, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que o material obtido (fase solúvel) na etapa 1.e.ii.6 descrita na reivindicação 1 ser rico em mananas.

20) Produto, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que o material obtido (fase insolúvel) na etapa 1.e.ii.6 descrita na reivindicação 1 ser rico em ß-glucanas.

FIGURA 2

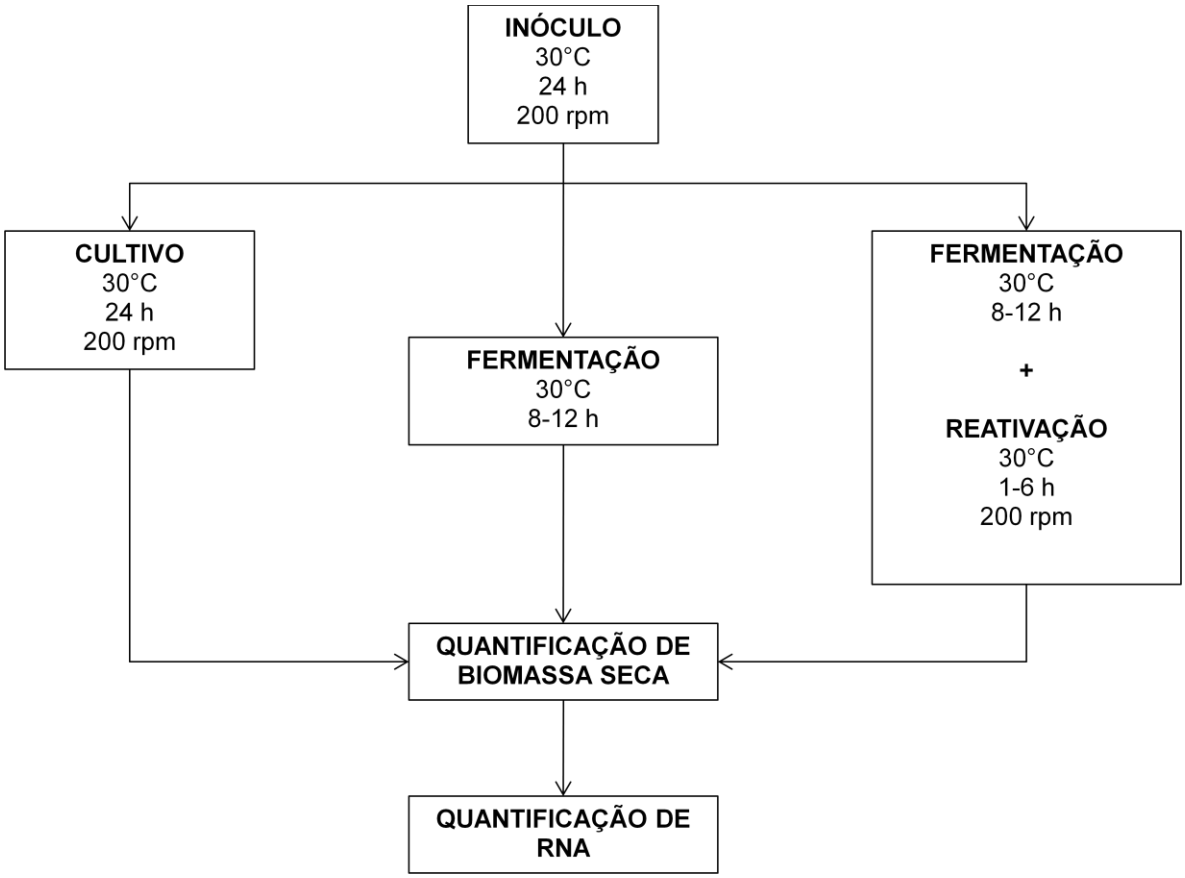


FIGURA 3

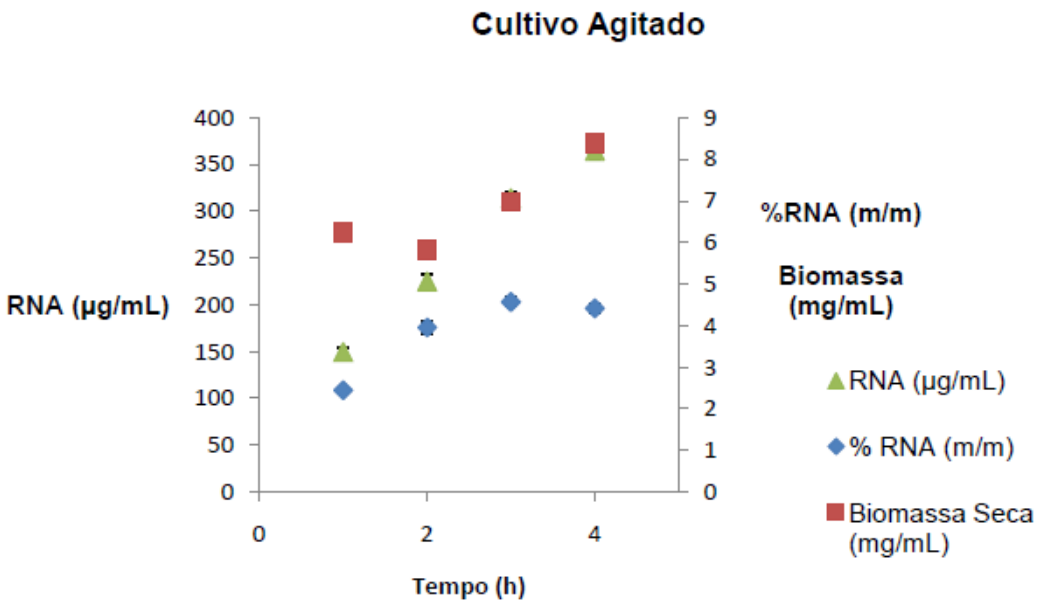


FIGURA 4

REATIVAÇÃO: Fermentação + Cultivo Agitado

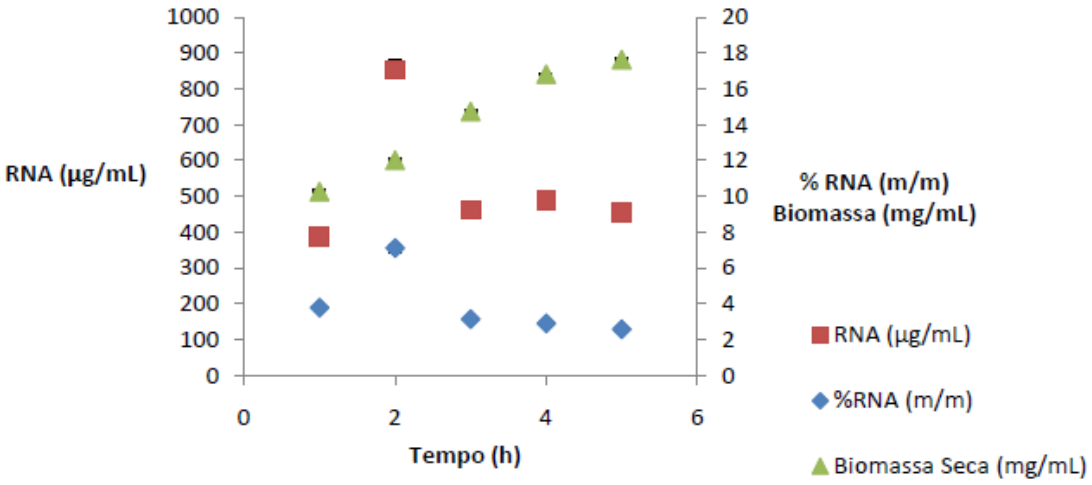


FIGURA 5

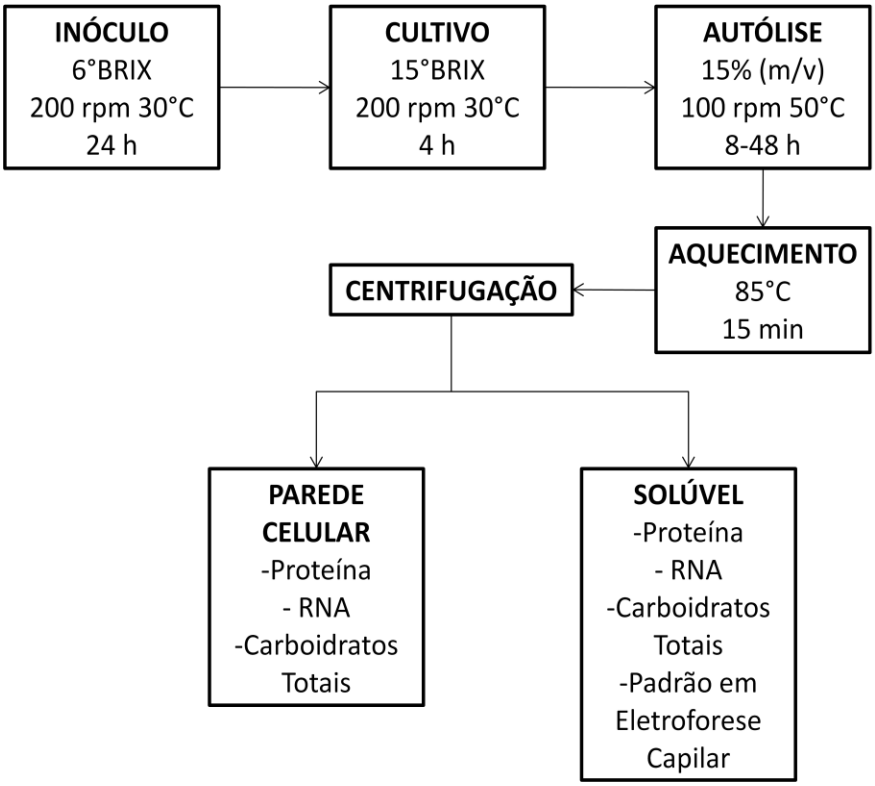


FIGURA 6

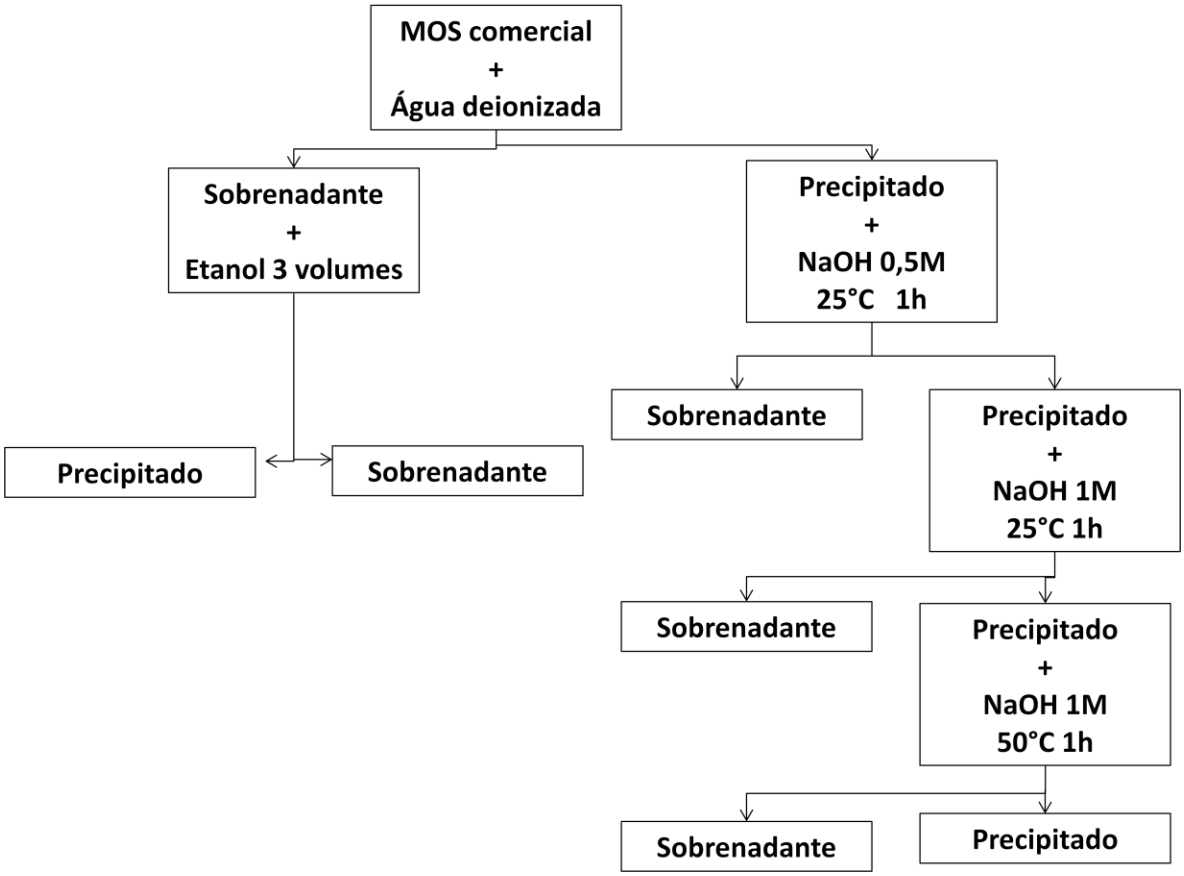


FIGURA 7

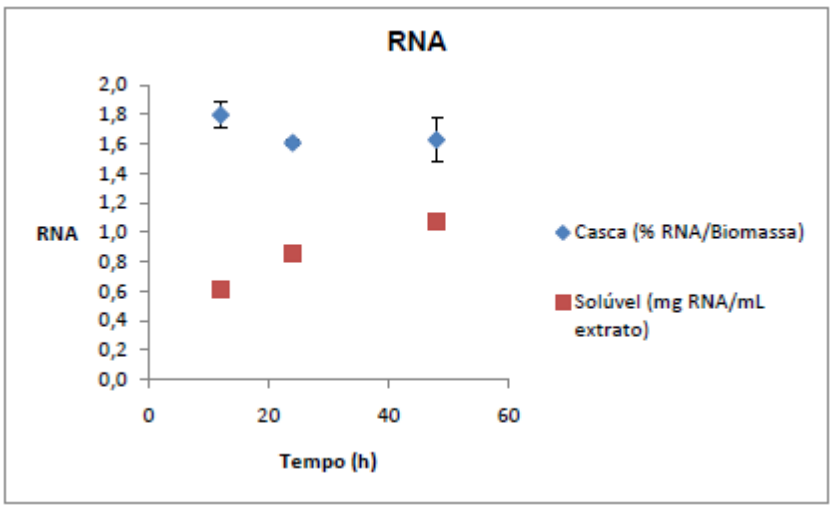


FIGURA 1

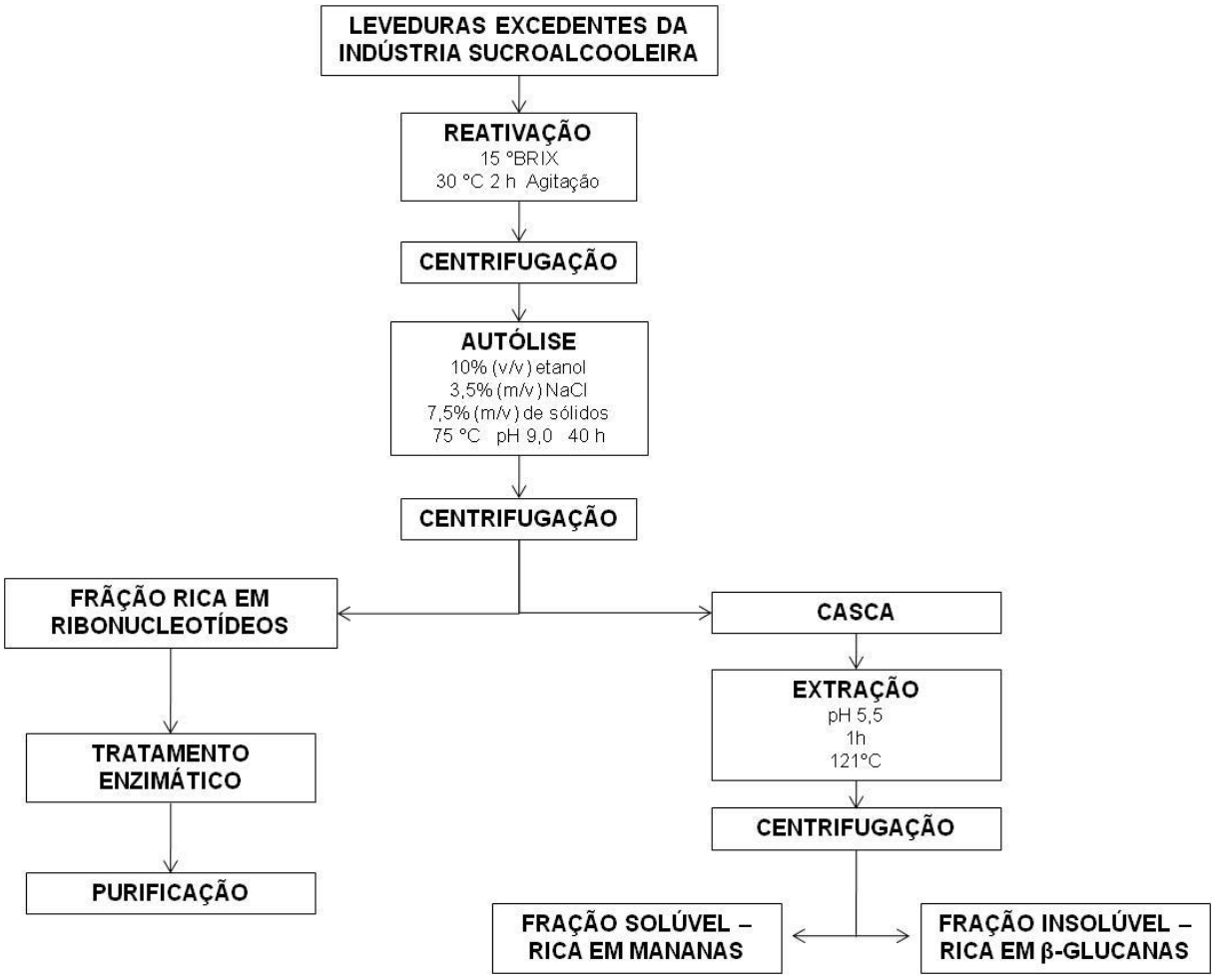

LEVEDURAS EXCEDENTES DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA
REATIVAÇÃO
15 °BRIX
30 °C 2 h Agitação
CENTRIFUGAÇÃO
AUTÓLISE
10% (v/v) etanol
3,5% (m/v) NaCl
7,5% (m/v) de sólidos
75 °C pH 9,0 40 h
CENTRIFUGAÇÃO
FRÃÇÃO RICA EM RIBONUCLEOTÍDEOS
CASCA
TRATAMENTO ENZIMÁTICO
EXTRAÇÃO
pH 5,5
1h
121°C
PURIFICAÇÃO
CENTRIFUGAÇÃO
FRAÇÃO SOLÚVEL – RICA EM MANANAS
FRAÇÃO INSOLÚVEL – RICA EM β-GLUCANAS

FIGURA 8

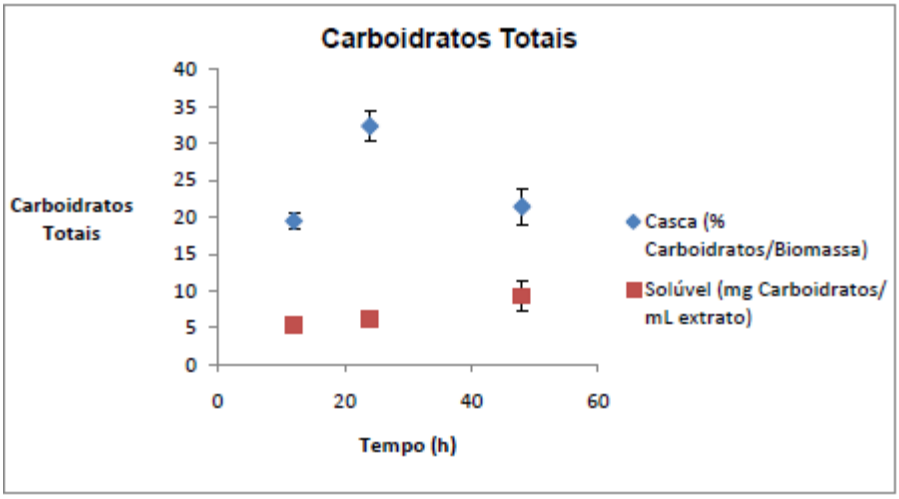


FIGURA 9

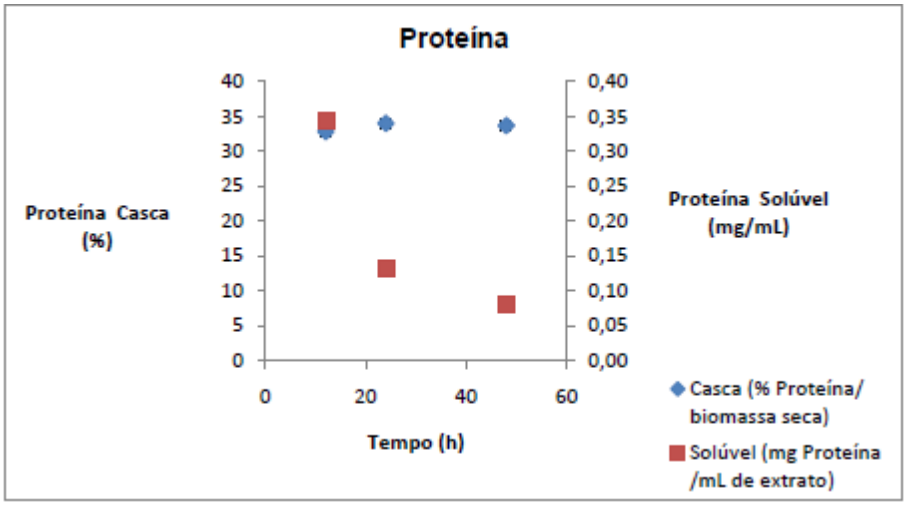


FIGURA 23

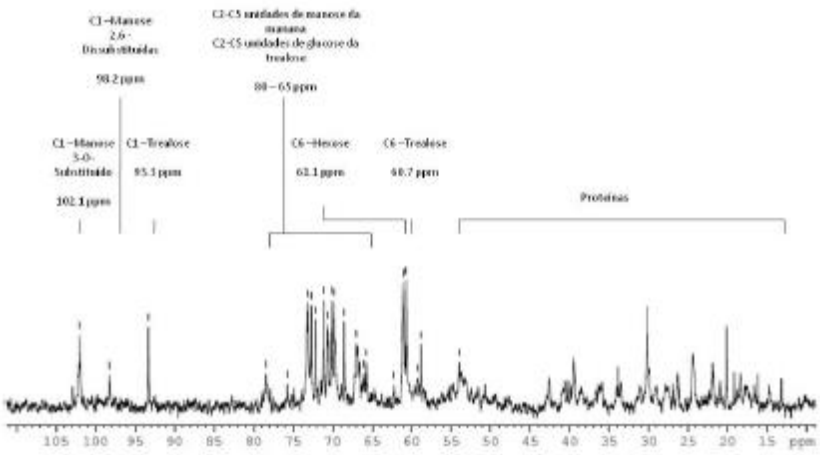


FIGURA 24

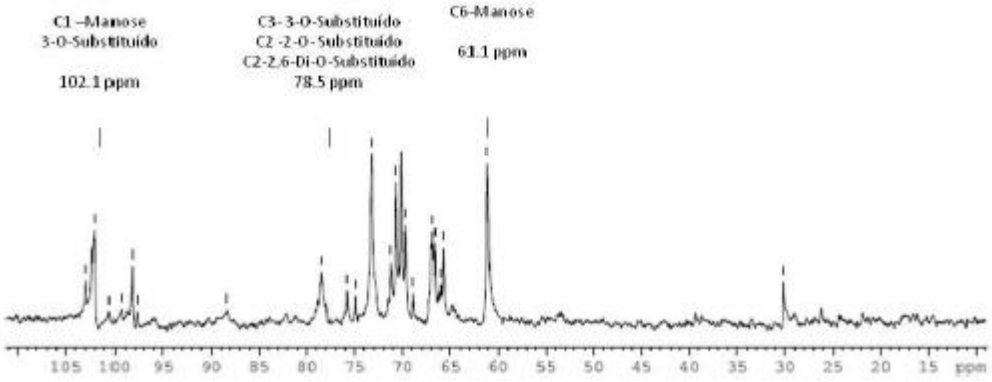


FIGURA 25

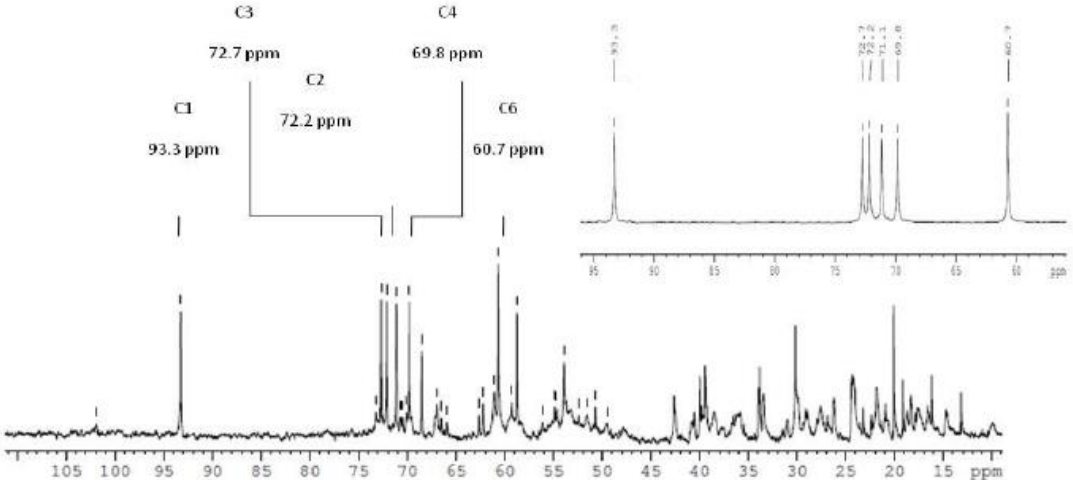


FIGURA 10

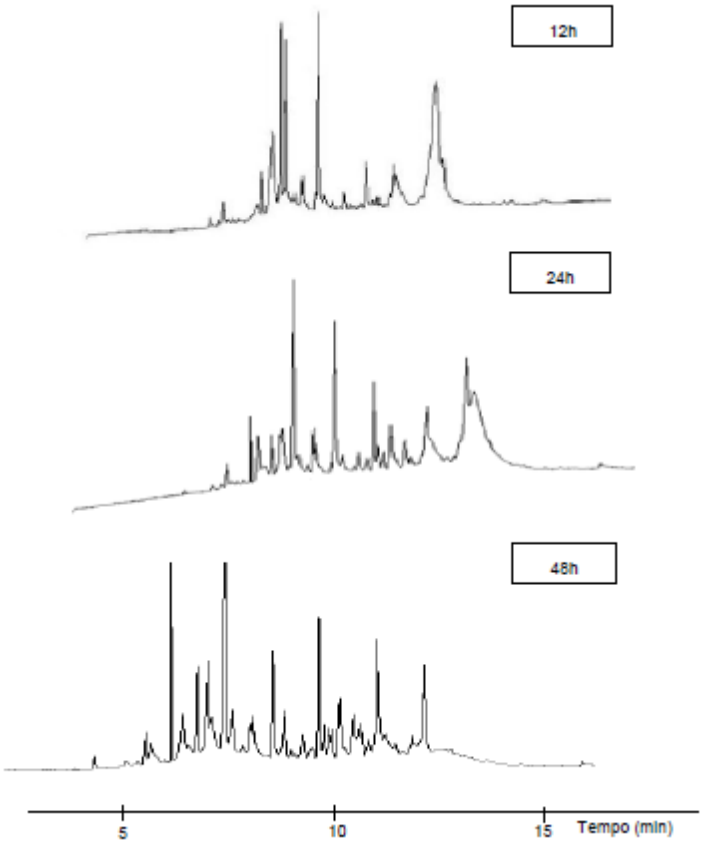


FIGURA 11

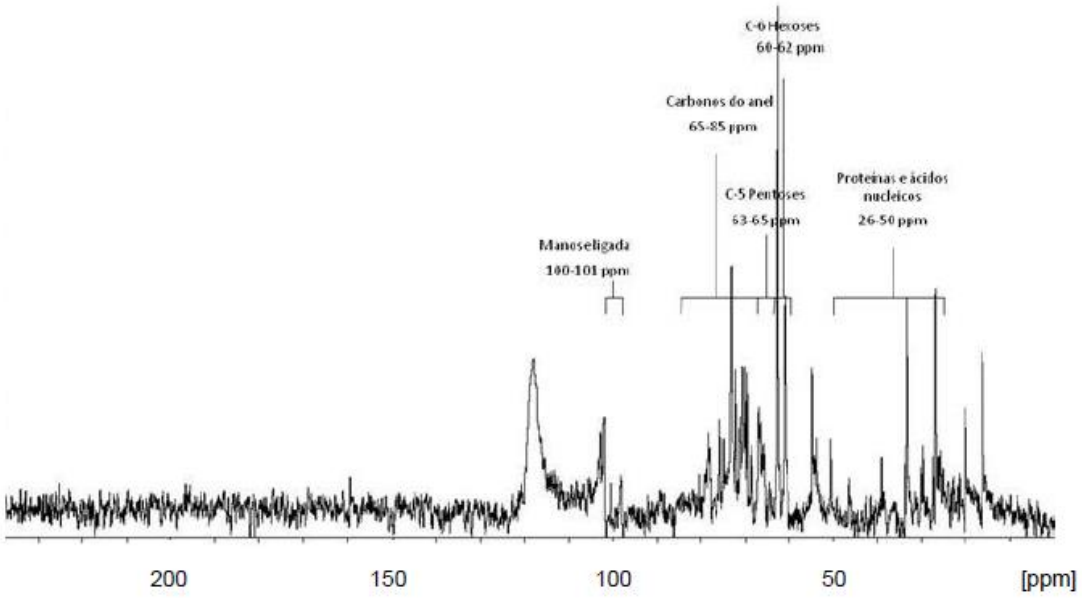


FIGURA 12

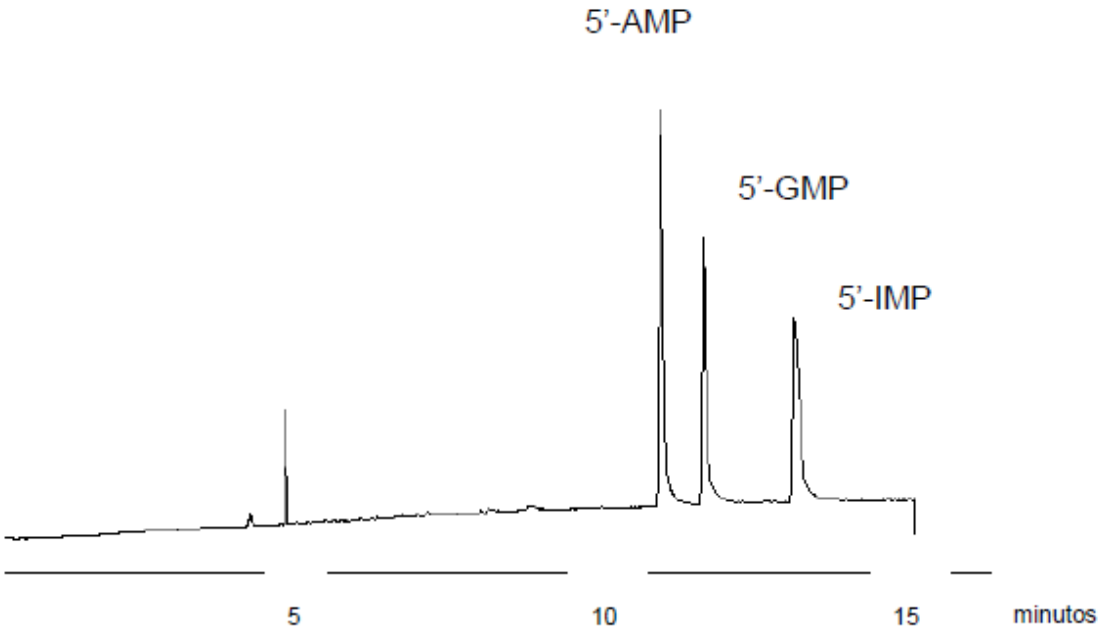


FIGURA 13

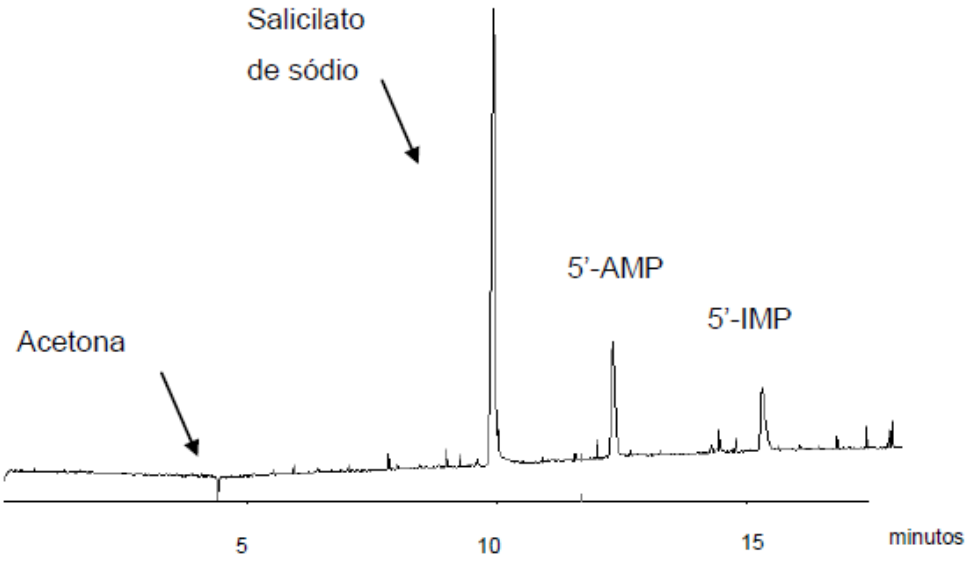


FIGURA 14

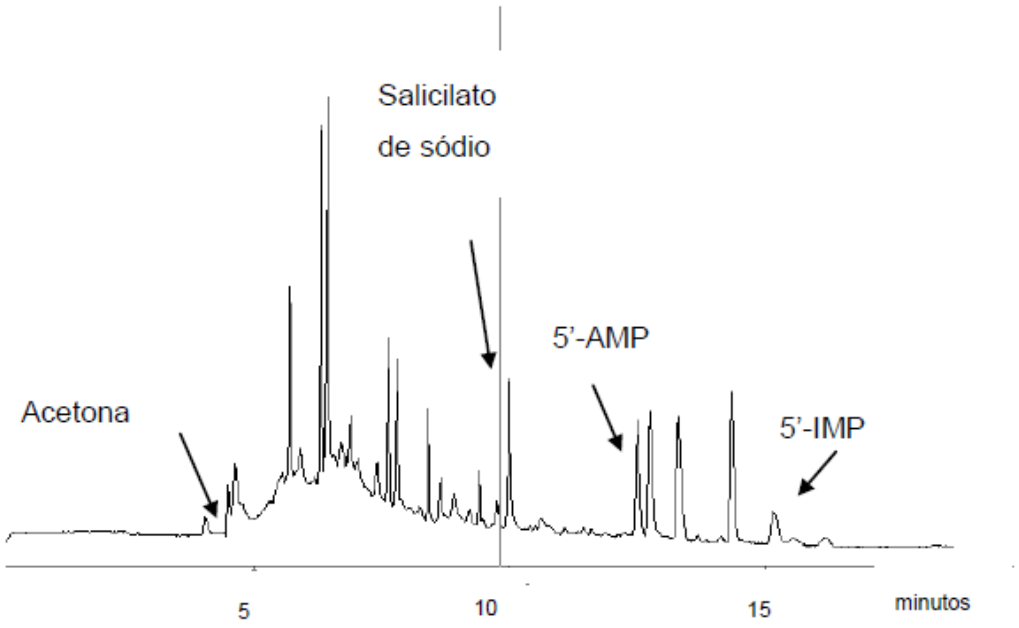


FIGURA 15

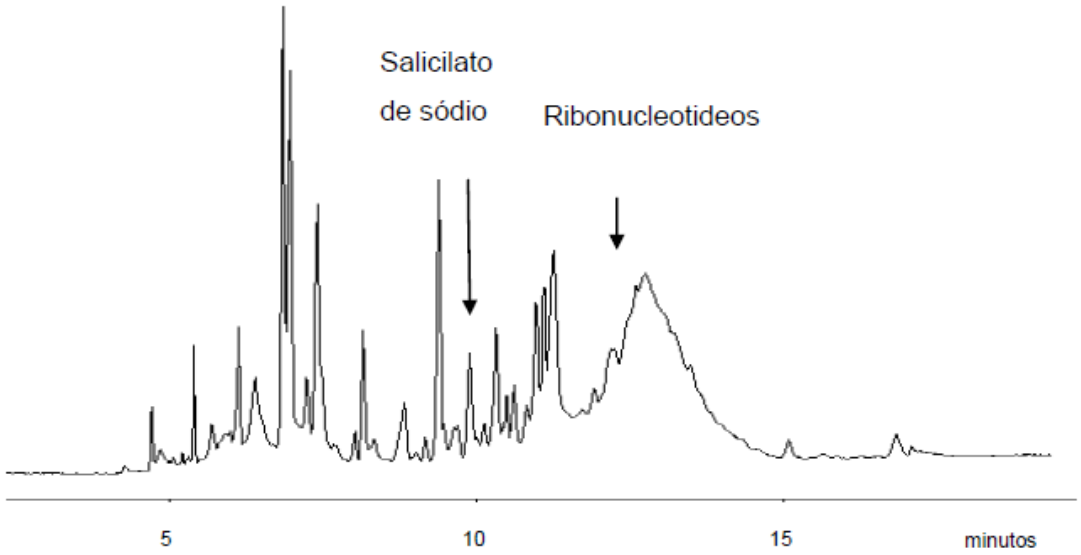


FIGURA 16

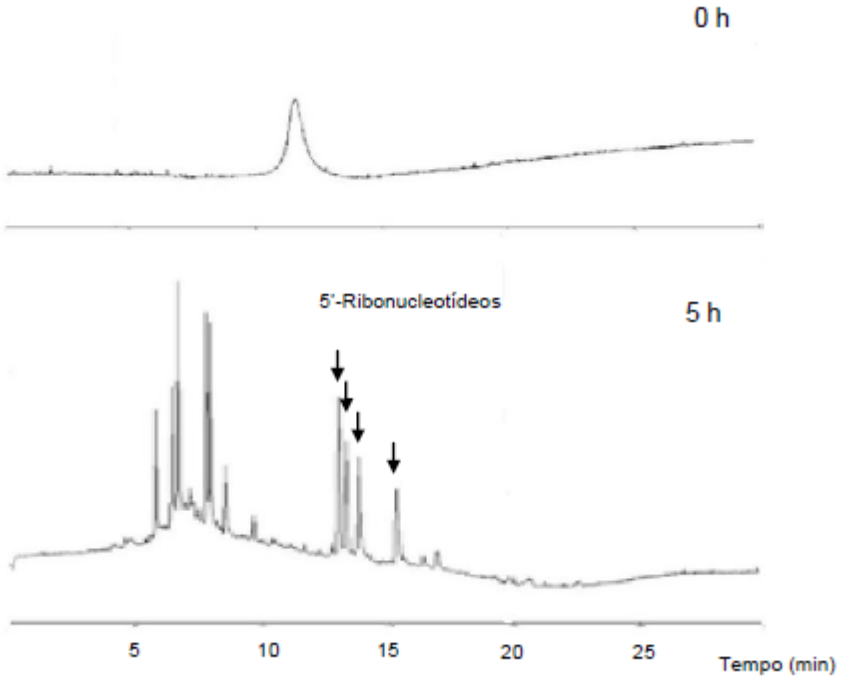


FIGURA 17

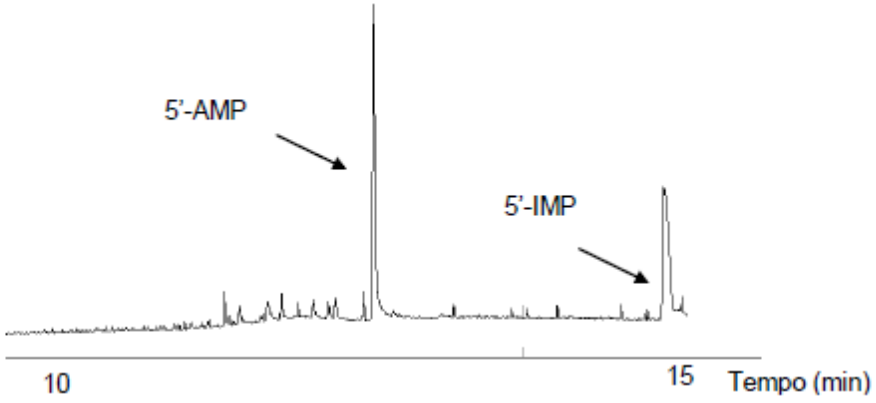


FIGURA 18

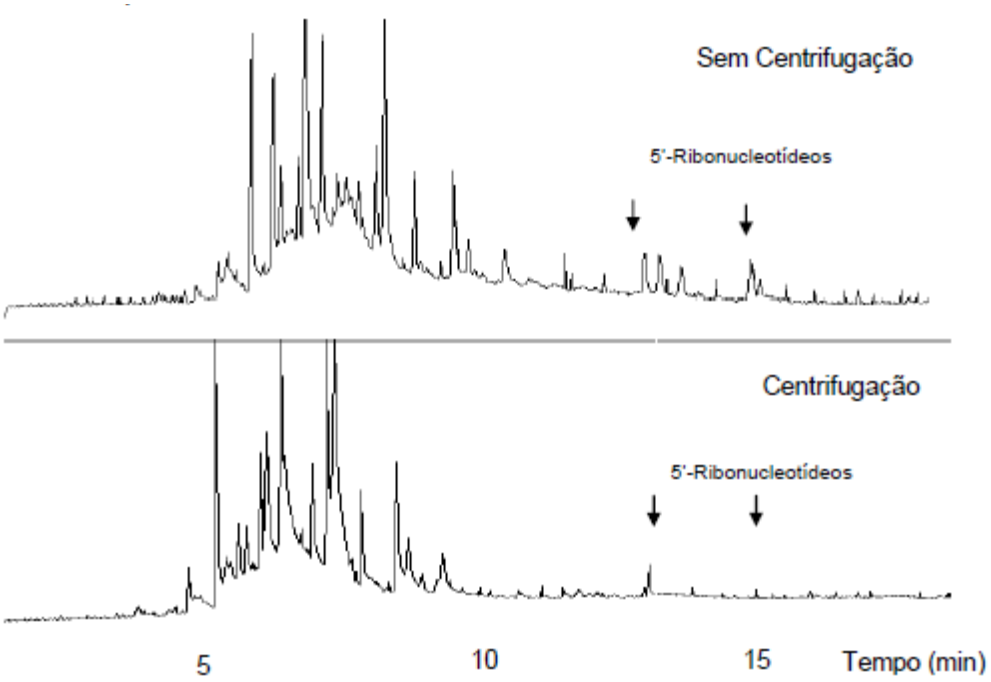
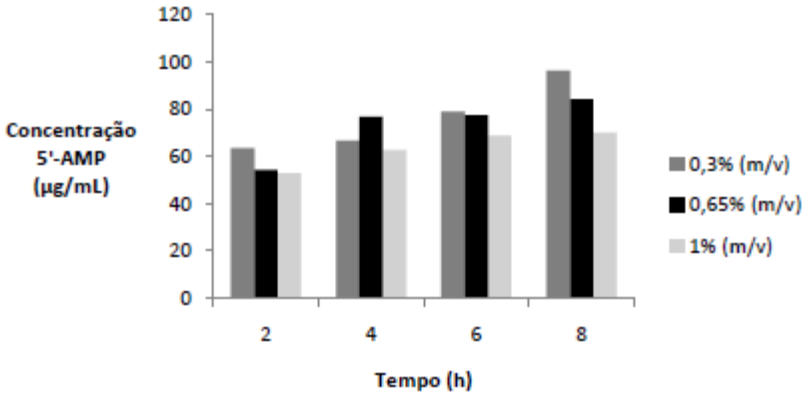
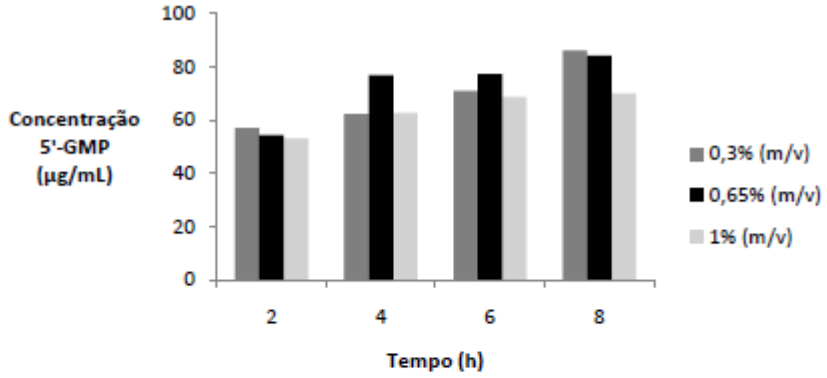

Sem Centrifugação
5'-Ribonucleotídeos
Centrifugação
5'-Ribonucleotídeos
5
10
15
Tempo (min)

FIGURA 19


Concentração 5'-AMP (µg/mL)
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
Tempo (h)
0,3% (m/v)
0,65% (m/v)
1% (m/v)


Concentração 5'-GMP (µg/mL)
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
Tempo (h)
0,3% (m/v)
0,65% (m/v)
1% (m/v)

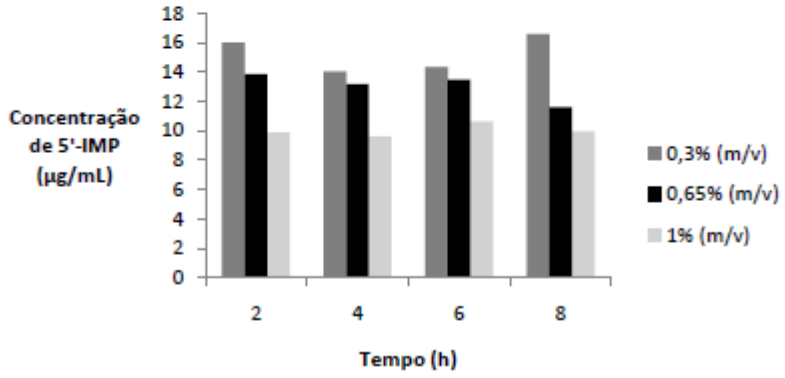

Concentração de 5'-IMP (µg/mL)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2
4
6
8
Tempo (h)
0,3% (m/v)
0,65% (m/v)
1% (m/v)

FIGURA 20

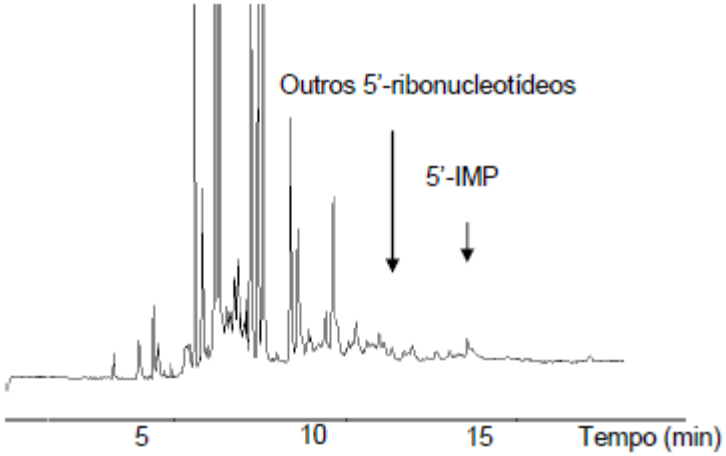


FIGURA 21

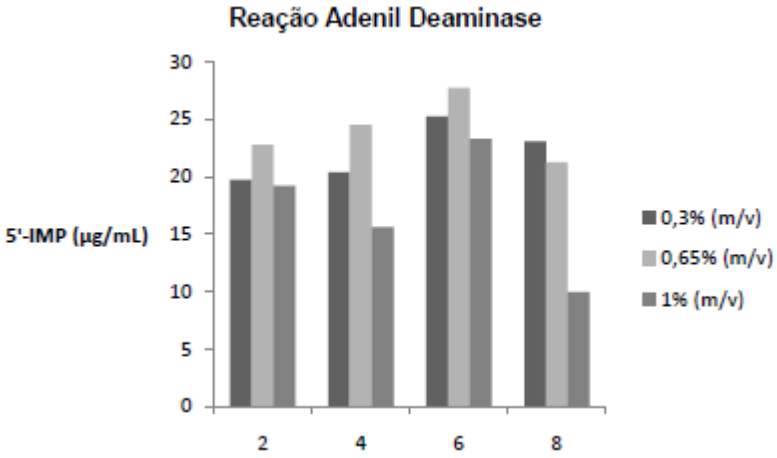


FIGURA 22

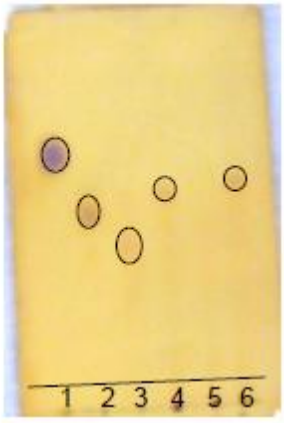


FIGURA 29

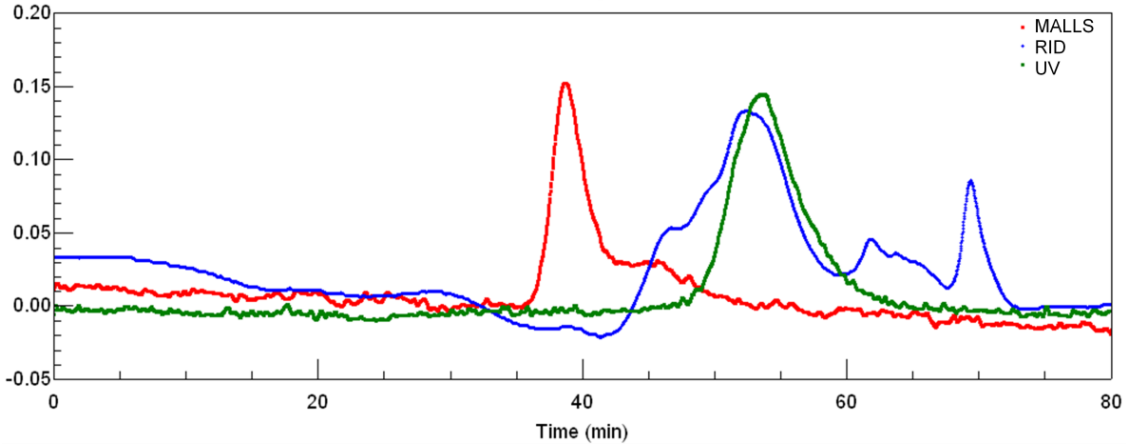


FIGURA 30

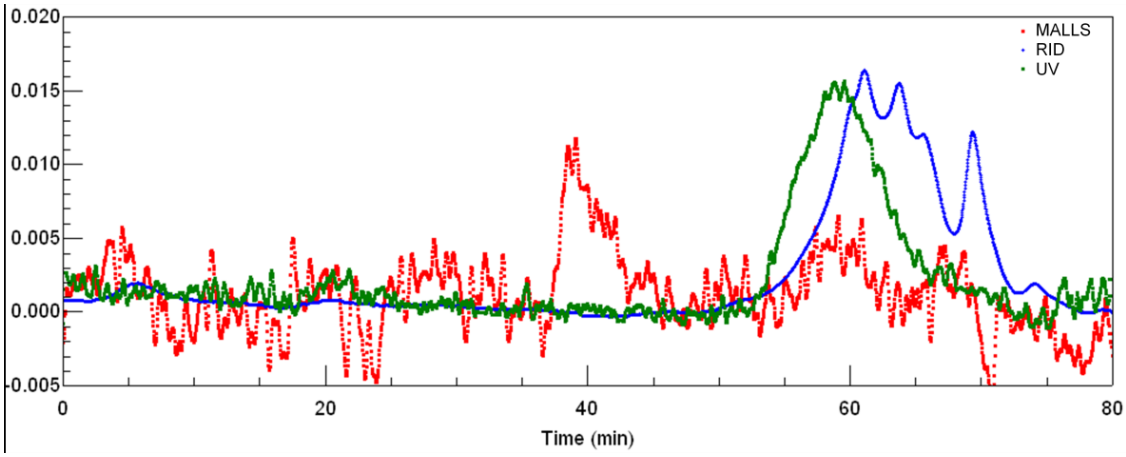


FIGURA 31

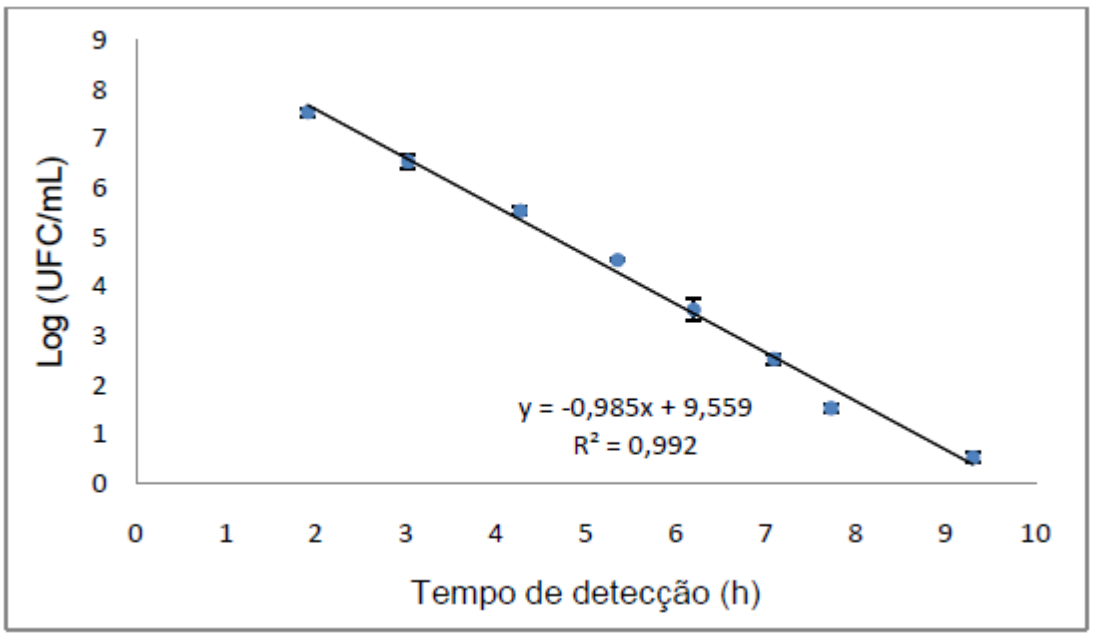


FIGURA 32

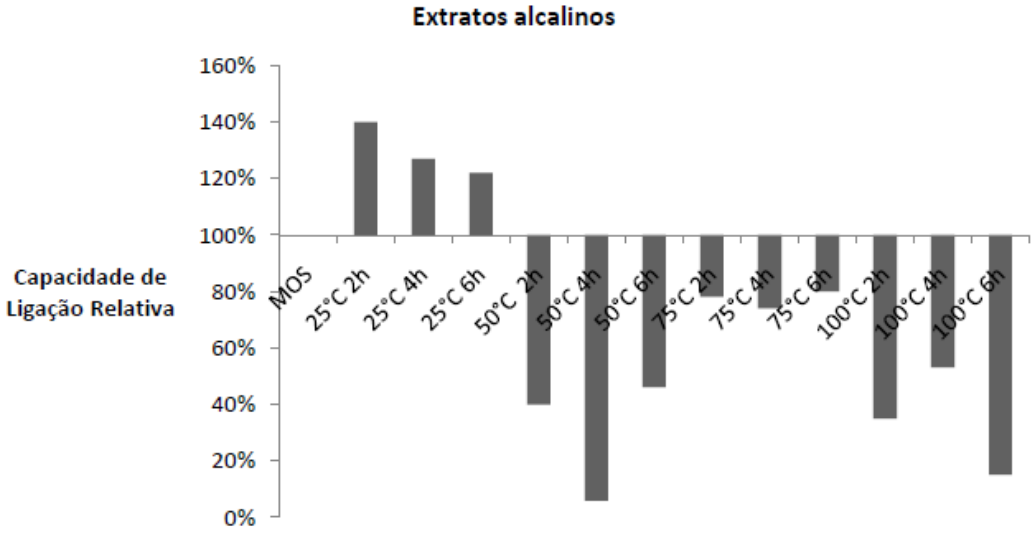


FIGURA 33

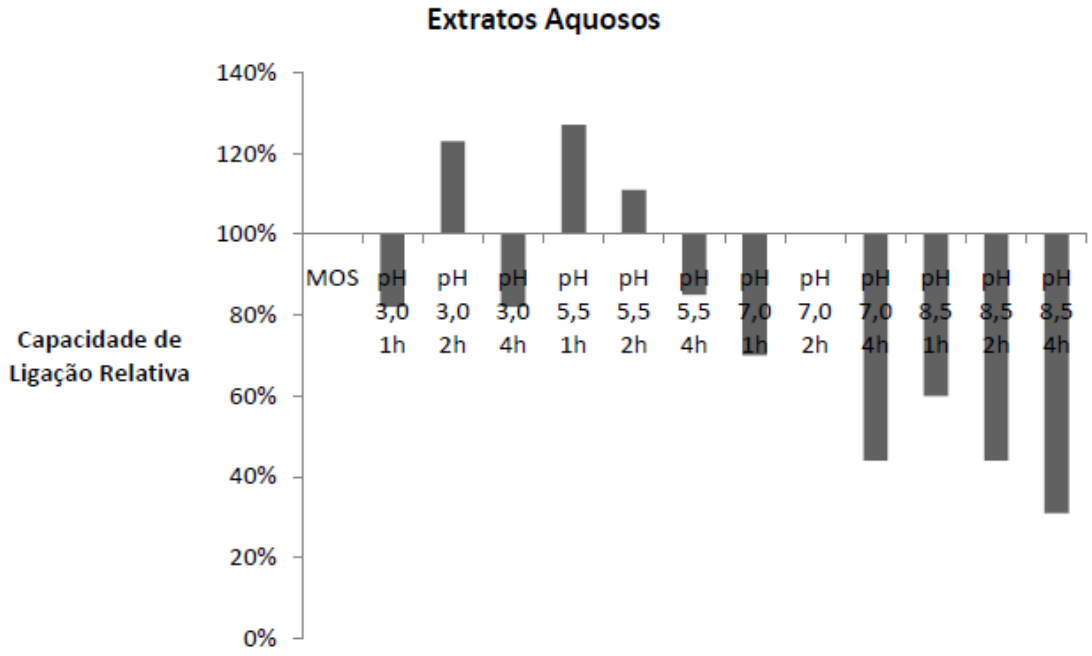


FIGURA 34

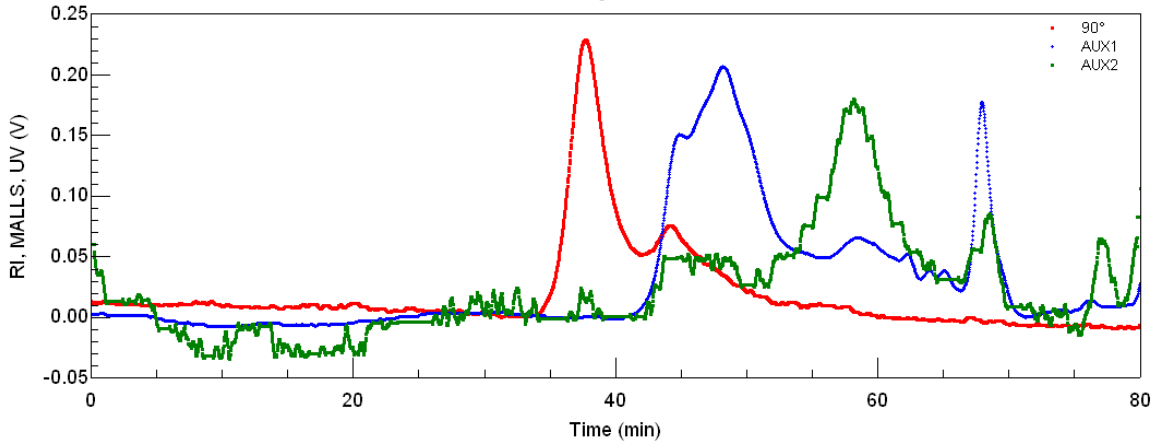


FIGURA 35

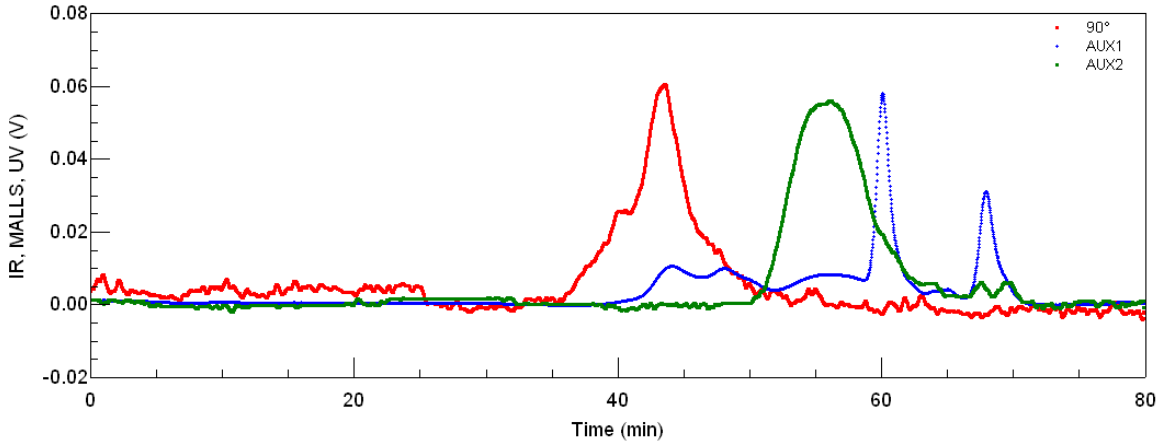


FIGURA 36

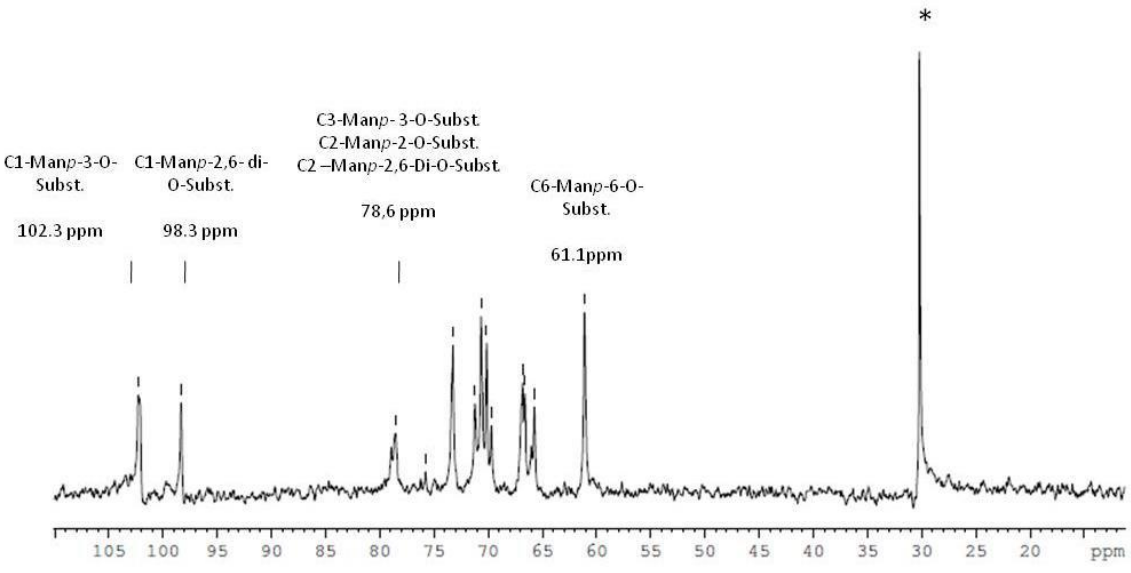


FIGURA 37

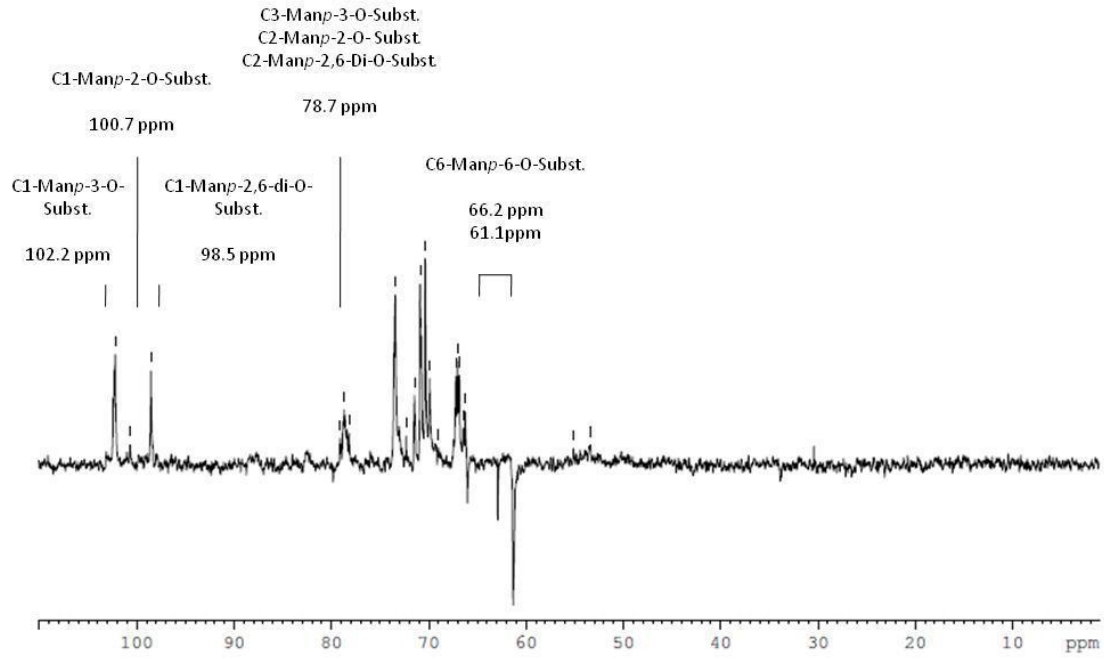


FIGURA 38

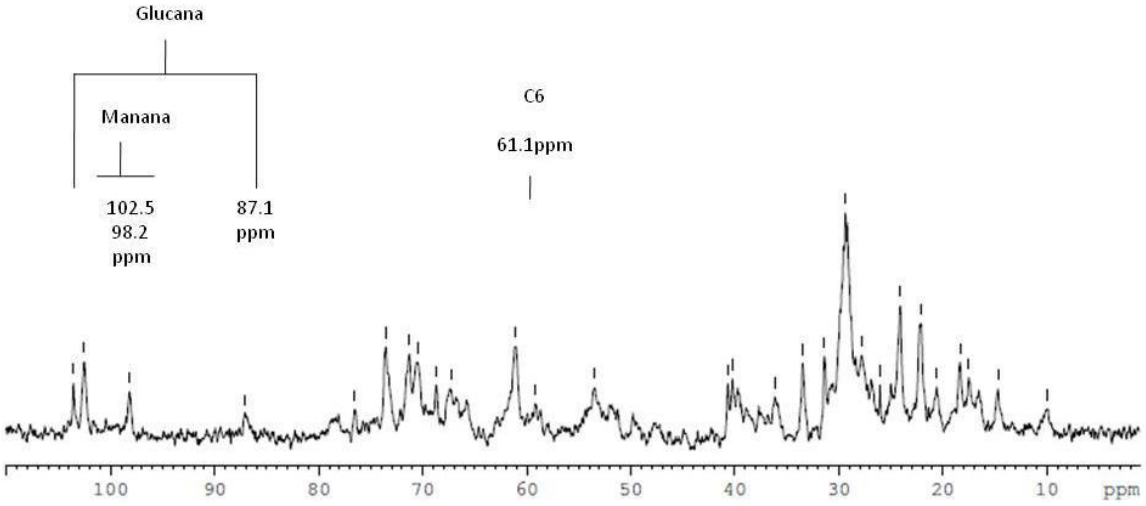


FIGURA 39

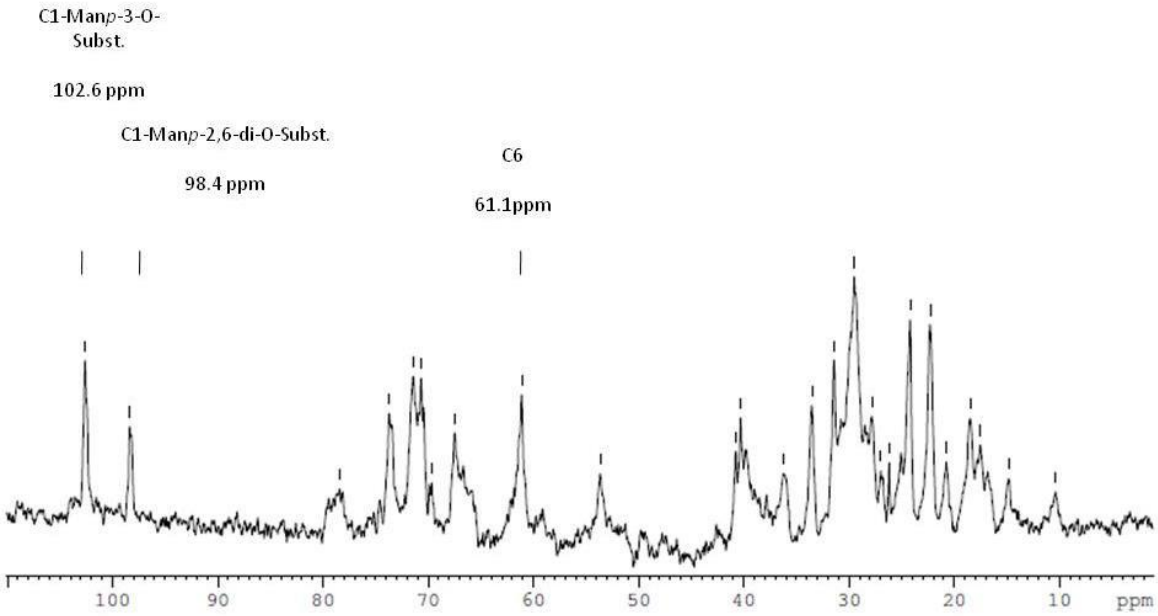


FIGURA 40

INGREDIENTES	INICIAL % (1 a 14 dias)	CRESCIMENTO % (a 34 dias)	FINALIZAÇÃO % (de 35 a 42 dias)
Milho	54,00	59,00	65,50
Farelo de soja	37,00	32,00	26,00
Óleo de soja	4,20	4,60	4,40
Fosfato bicálcico	2,00	1,80	1,70
Calcário	0,90	0,80	0,80
Sal	0,40	0,40	0,40
D-L Metionina	0,20	0,20	0,20
Lisina	0,20	0,10	0,20
Vitaminas (Premix)	0,45	0,45	0,45
Minerais	0,20	0,20	0,20
Material Inerte	0,30	0,25	0,45
Levedura inativa Seca (LIS) *	0,20	0,20	0,20
Parede Celular (CW) *	0,20	0,20	0,20
Monooligossacarídeos (MOS)*	0,20	0,20	0,20
Beta glucanas (BG) *	0,20	0,20	0,20
Extrato de Levedura (RN) *	0,20	0,20	0,20
* foram adicionados de acordo com o grupo de tratamento			

FIGURA 26

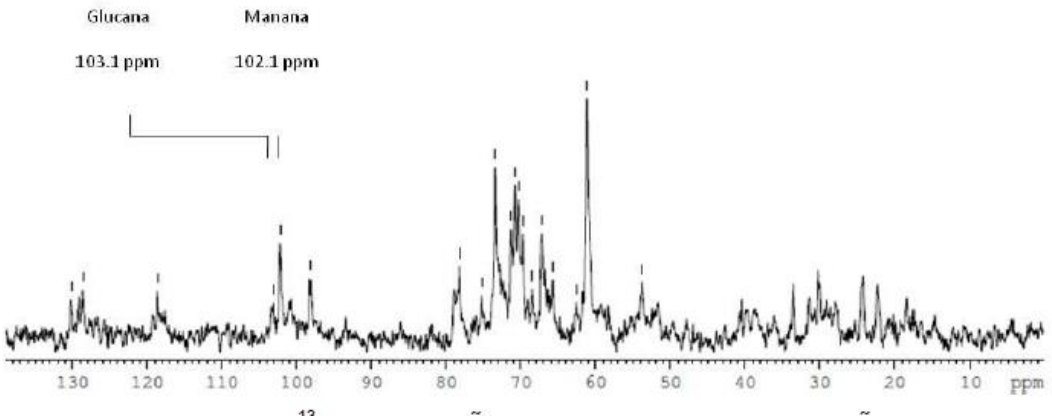


FIGURA 27

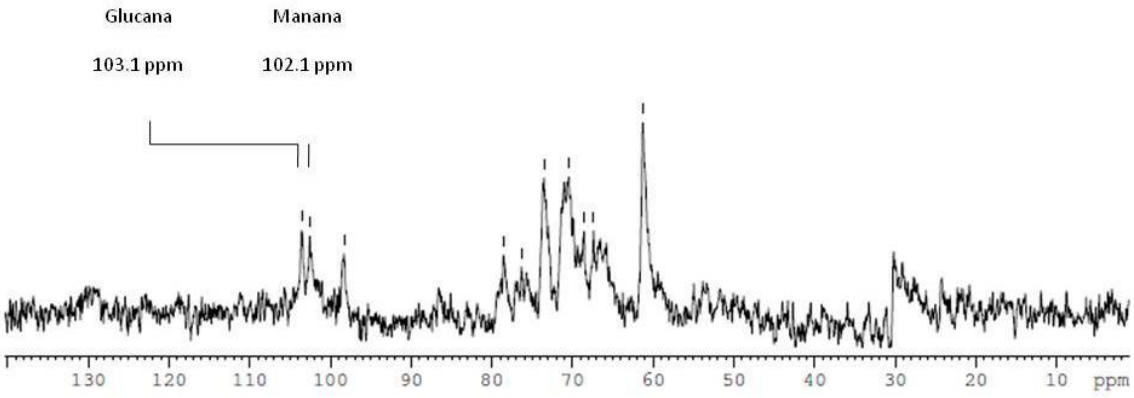


FIGURA 28

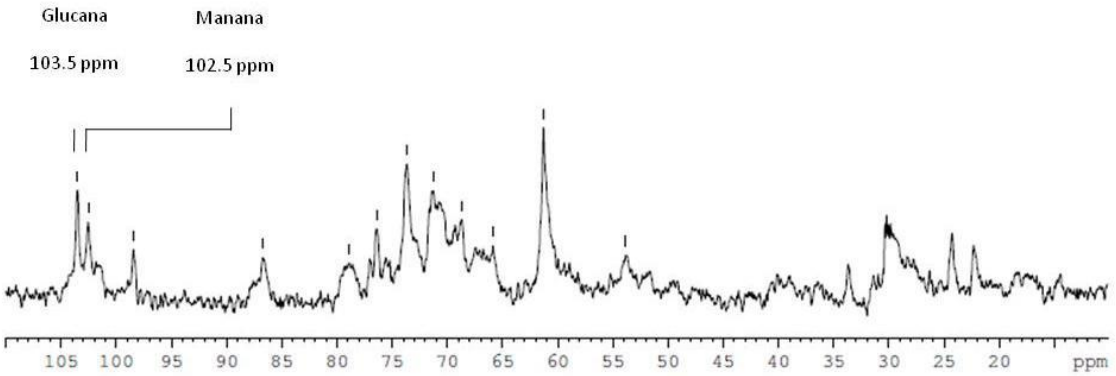


FIGURA 41

Tipo celular	Marcadores	TCRvβ1^{+}	TCRvβ^{-}
Linfócito T	CD4+	Linfócito T CD4 de mucosa	Linfócitos T CD4 gerais
	CD4-	Linfócito T CD8 de mucosa	
	Marcadores	CD28+	CD28-
	CD8+	Linfócitos T CD8 não ativados	Linfócitos T CD8 ativados
	CD8-	Linfócitos T CD4 não ativados	
Tipo celular	Marcadores	Bu-1+	
Linfócito B	Bu-1+	Linfócito B	
Tipo celular	Marcadores	MHC II+	MHC II-
Monócitos e APC	Kul-01+	Monócitos fagocíticos	Monócitos supressores
	Kul-01-	APC não monócito	

FIGURA 49

Kul- MHCII+ _ APCs não monócitos

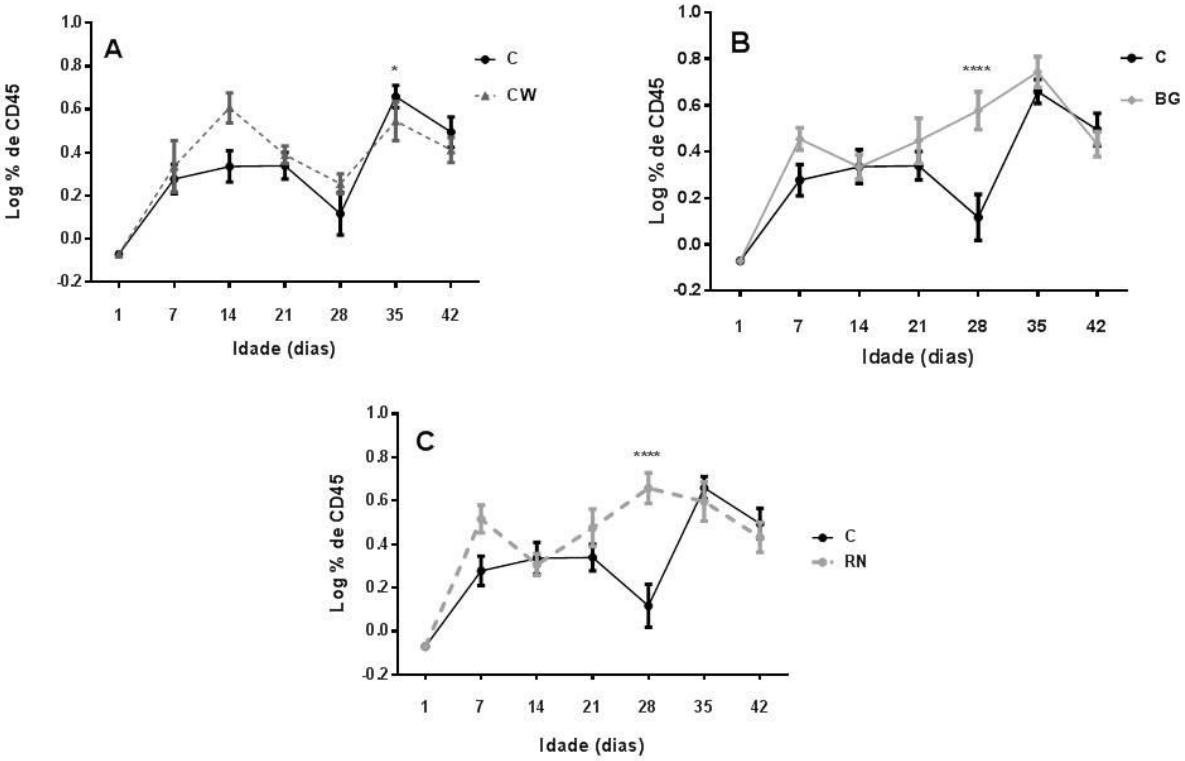


FIGURA 50

Kul+ MHCII- _ Monócitos supressores

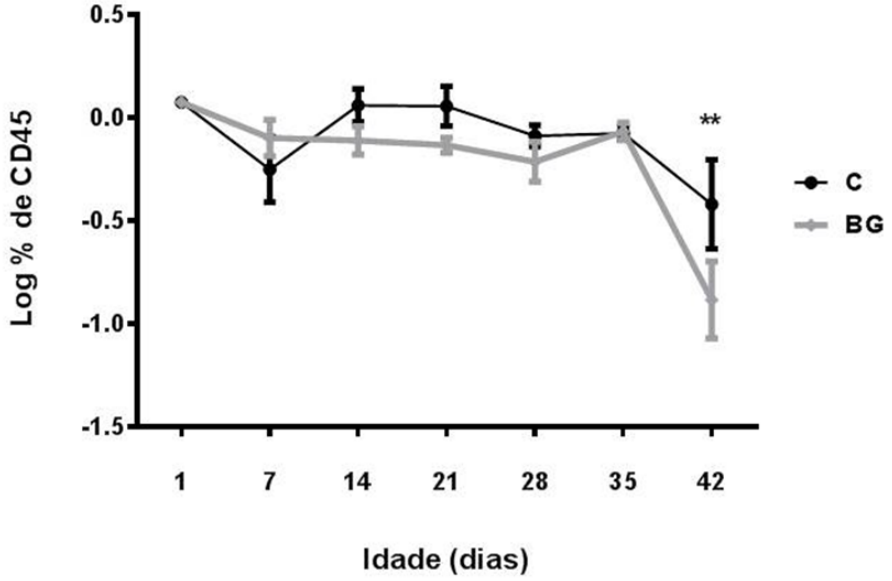


FIGURA 42

Semana	C			LIS			CW			MOS			BG			RN		
	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A	CR g/animal	GP g/animal	I.C.A
1	147,32	132,38	1,11	141,56	115,06	1,23	139,40	122,56	1,14	145,40	114,01	1,28	147,20	113,62	1,30	139,60	111,00	1,26
2	411,17	258,22	1,59	458,29	245,38	1,87	435,61	260,61	1,67	438,00	209,88	2,09	428,59	253,06	1,69	454,54	244,64	1,86
3	616,47	395,2	1,56	755,94	378,56	2,00	755,47	407,98	1,85	728,94	360,85	2,02	629,88	387,68	1,62	587,94	395,88	1,49
4	763,08	514,29	1,48	779,46	495,38	1,57	800,00	539,21	1,48	815,85	533,79	1,53	722,54	487,41	1,48	754,38	487,93	1,55
5	1385,00	493,6	2,81	1287,33	445,00	2,89	1177,11	500,00	2,35	1146,22	502,56	2,28	1151,50	407,55	2,83	1139,18	463,54	2,46
6	1818,20	814,56	2,23	1826,60	690,04	2,65	1923,50	728,00	2,64	2008,80	636,40	3,16	1828,60	790,82	2,31	1816,60	807,05	2,25

FIGURA 43

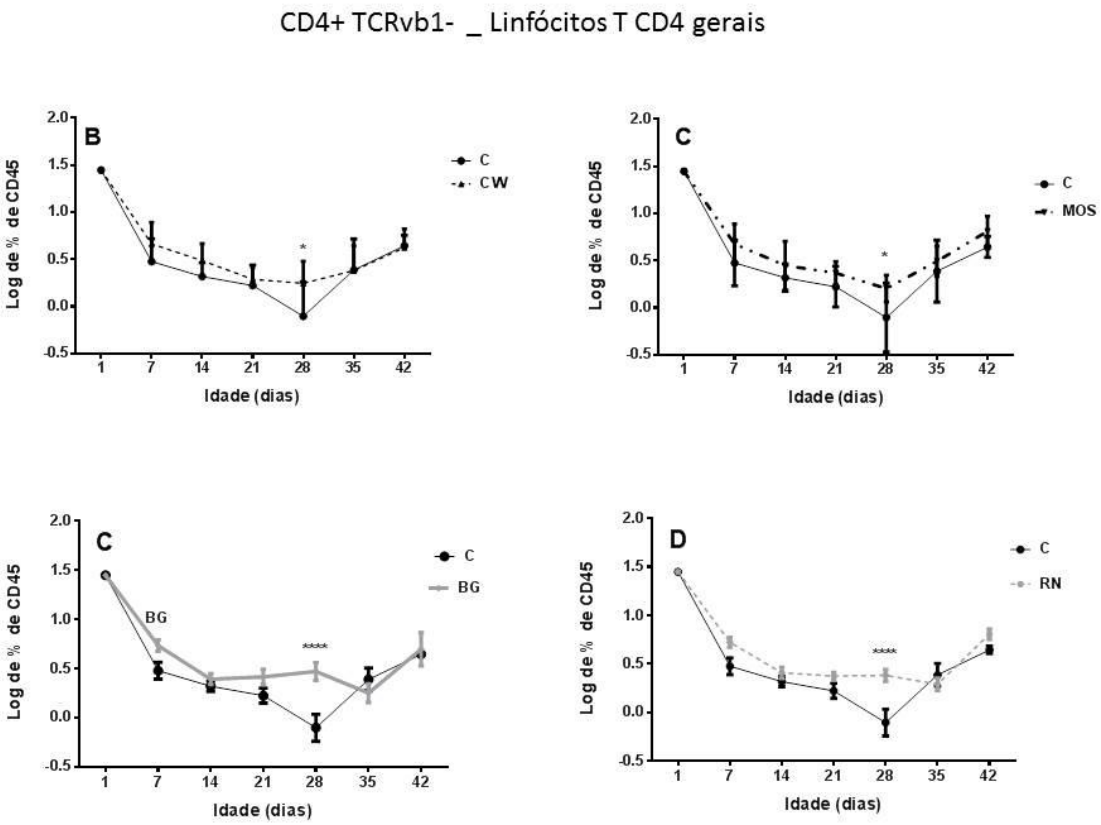


FIGURA 44

CD4- TCRVb1+ _ Linfócitos T CD8 de mucosa

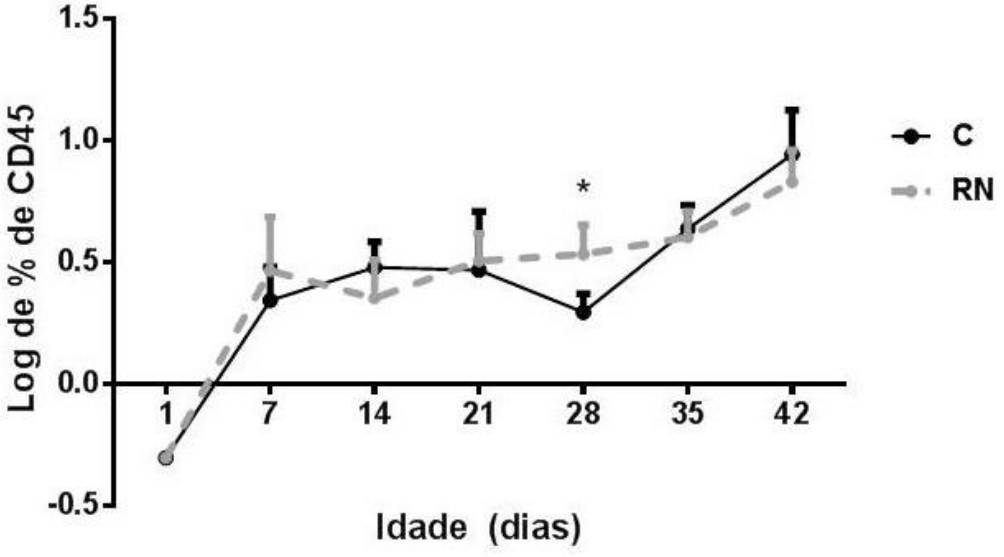


FIGURA 45

CD8+ CD28+ _ Linfócitos T CD8 não ativados

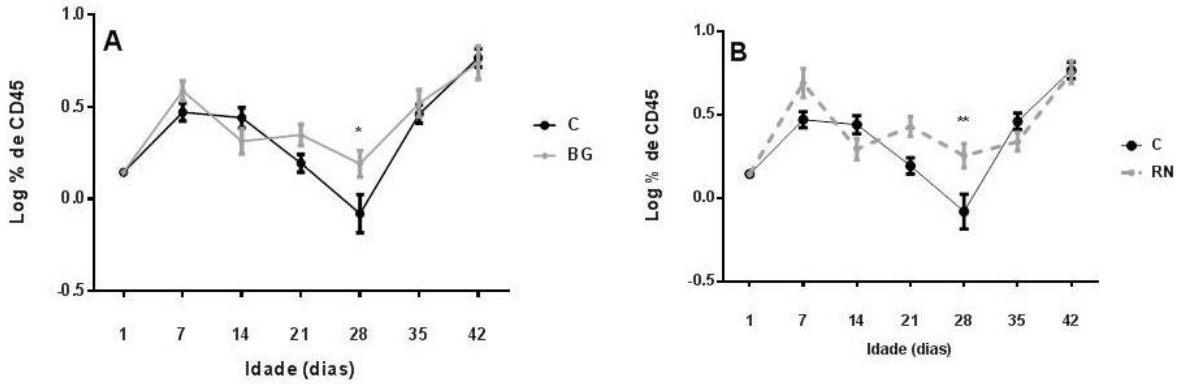


FIGURA 46

CD8+ CD28- _ Linfócitos T CD8 ativados

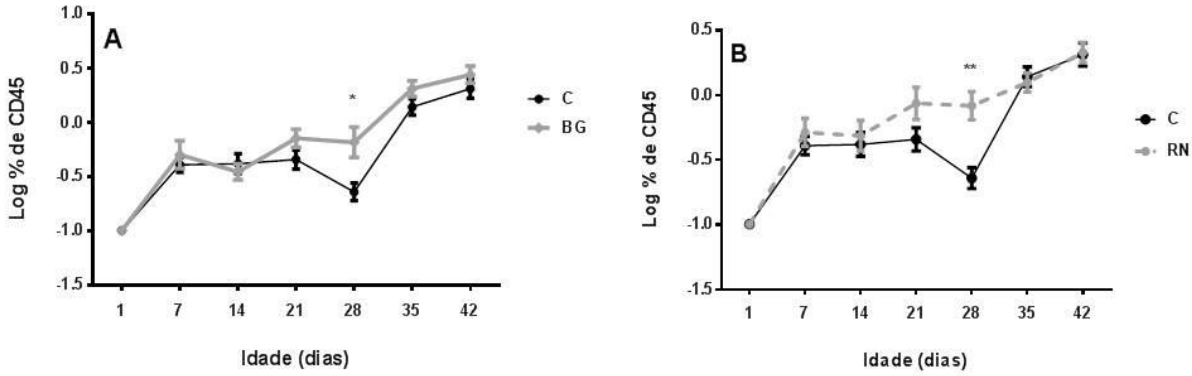


FIGURA 47

CD8- CD28+ _ Linfócitos T CD4 não ativados

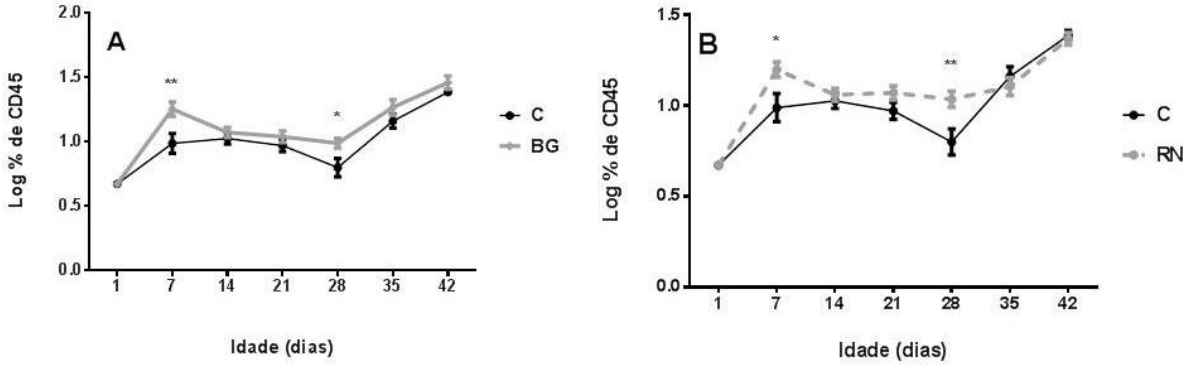
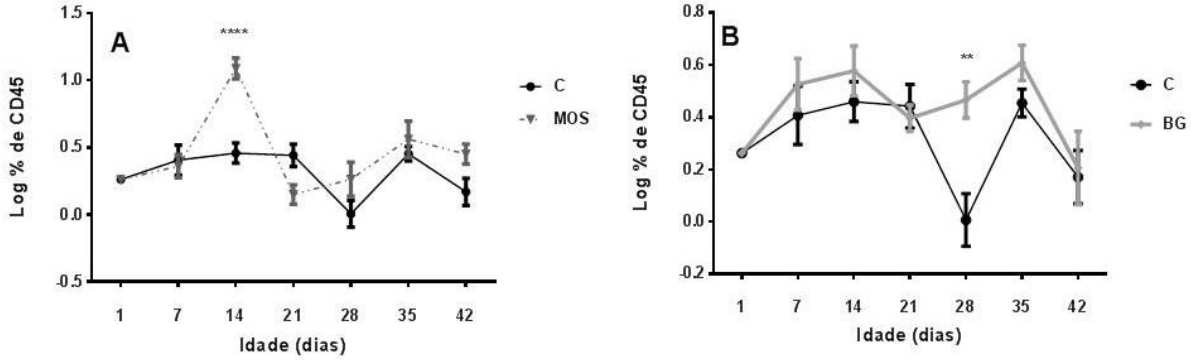


FIGURA 48

Kul+ MHCII+ _ Monócitos/Macrófagos fagocíticos



RESUMO

PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS, PAREDE CELULAR, MANANAS E B-GLUCANAS

A presente patente de invenção trata de um processo para obter quatro subprodutos de leveduras empregadas em usinas sucroalcooleiras e indústrias cervejeiras: (i) uma fração rica em 5'-ribonucleotídeos, (ii) parede celular (casca), (iii) mananas equivalentes a MOS comercial e (iv) β-glucanas, permitindo obter, em forma sequencial após autólise das leveduras, quatro distintos produtos: uma fração solúvel contendo 5'-ribonucleotídeos e outra insolúvel com a parede celular (casca), que a partir de extrações origina uma fração solúvel rica em mananas e uma fração insolúvel rica em β-glucanas, todas com elevada atividade de ligação a bactérias enteropatogênicas e atividade imunoestimulante quando aplicadas em ração animal.