

"UTILIZAÇÃO EM PANIFICAÇÃO DE  
LEVEDURAS (Saccharomyces spp.)  
PROVENIENTES DA PRODUÇÃO DE  
ÁLCOOL DE CANA-DE-AÇÚCAR"

34/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"UTILIZAÇÃO EM PANIFICAÇÃO DE LEVEDURAS  
(Saccharomyces spp.) PROVENIENTES DA PRODUÇÃO  
DE ÁLCOOL DE CANA-DE-ACÚCAR "

VERA DE TOLEDO BENASSI  
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. NORMA MANCILLA DIAZ  
Orientadora

Prof. Dr. CÉSAR FRANCISCO CIACCO  
Co-orientador

Profa. Dra. CELINA RAQUEL DE O. CAMARGO  
Co-orientadora

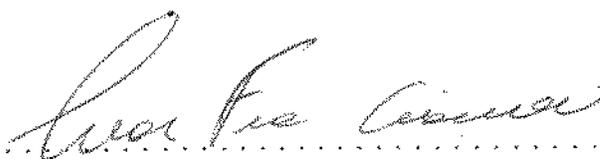
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
UNICAMP para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia  
de Alimentos

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida por Vera de Toledo Benassi  
e aprovada pela Comissão Julgadora em 15.12.89.  
Campinas, 15 de dezembro de 1989.

*Vera de Toledo Benassi*

BANCA EXAMINADORA



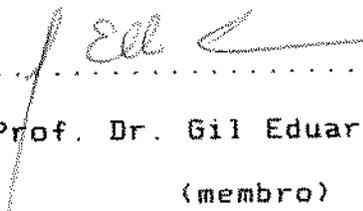
Prof. Dr. César Francisco Ciacco  
(co-orientador)



Profa. Dra. Celina Raquel de Oliveira Camargo  
(co-orientadora)



Prof. Dr. Jayme Amaya Farfán  
(miembro)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra  
(miembro)

## DEDICATÓRIA

À Profa. Dra. NORMA MANCILLA DIAZ, idealizadora deste trabalho, cuja presença alegre e amiga tanta falta nos tem feito.

## AGRADECIMENTOS

Aos Profs. César Ciacco e Celina Camargo, pela colaboração na redação da tese.

Aos professores membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos professores, funcionários, técnicos e colegas do Departamento de Tecnologia da FEA, pela ajuda prestada a nível profissional e pessoal.

À CAPES, FAPESP, UNICAMP e ABIA, pelo suporte financeiro.

À minha família e aos meus amigos, pelo apoio moral.

A todos, meu agradecimento sincero.

## INDICE GERAL

	PÁGINA
INDICE DE TABELAS .....	iv
INDICE DE FIGURAS .....	vi
SUMMARY .....	viii
RESUMO .....	x
INTRODUÇÃO .....	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
1. MICROORGANISMOS COMO FONTE DE PROTEÍNAS .....	03
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PROTEÍNA UNICELULAR .....	09
2.1. Aspectos nutricionais .....	09
2.2. Aspectos sensoriais e funcionais .....	11
2.3. Aspectos toxicológicos .....	12
2.3.1. Tipos de toxidez .....	12
2.3.2. Metabolismo dos ácidos nucleicos .....	14
3. REMOÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DA PROTEÍNA UNICELULAR .....	16
3.1. Desintegração da parede celular .....	16
3.1.1. Métodos físicos .....	17
3.1.2. Métodos químicos .....	19
3.1.3. Métodos enzimáticos .....	20
3.2. Remoção dos ácidos nucleicos da proteína unicelular .....	21
3.2.1. Métodos químicos .....	21
3.2.2. Métodos enzimáticos .....	23
3.2.3. Outros métodos .....	25
4. UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR EM PANIFICAÇÃO .....	28

<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
<b>1. MATERIAL</b> .....	33
1.1. Matéria-prima .....	33
1.2. Reagentes .....	33
1.3. Aparelhos e equipamentos .....	33
<b>2. MÉTODOS</b> .....	35
2.1. Determinação da composição centesimal .....	35
2.2. Determinação do conteúdo de ácidos nucleicos .....	35
2.2.1. Dosagem de fósforo .....	36
2.2.2. Dosagem de ribose .....	36
2.3. Determinação de minerais .....	37
2.4. Determinação de vitaminas .....	37
2.5. Determinação de aminoácidos .....	37
2.6. Determinação de umidade no pão .....	38
2.7. Determinação de cloreto .....	38
2.8. Remoção dos ácidos nucleicos .....	39
2.8.1. Tratamento químico .....	39
2.8.2. Tratamento enzimático .....	40
2.9. Determinação das propriedades reológicas .....	43
2.9.1. Farinógrafo .....	43
2.9.2. Extensógrafo .....	44
2.9.3. Viscoamilógrafo .....	44
2.9.4. Maturógrafo .....	45
2.10. Teste de panificação .....	46
2.11. Método para avaliação sensorial .....	49

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA REDUÇÃO</b>	
<b>DO TEOR DE RNA DA LEVEDURA ORIGINAL</b> .....	53
1.1. Tratamento químico .....	53
1.2. Tratamento enzimático .....	56
<b>2. EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO NO CONTEÚDO DE VITA-</b>	
<b>MINAS, MINERAIS E AMINOÁCIDOS DA LEVEDURA ORIGINAL</b> .....	57
2.1. Composição em vitaminas .....	57
2.2. Composição em minerais .....	58
2.3. Composição em aminoácidos .....	58
<b>3. EFEITO DA ADIÇÃO DE LEVEDURA TRATADA NAS</b>	
<b>PROPRIEDADES REOLÓGICAS</b> .....	64
3.1. Características de mistura da massa .....	64
3.2. Características de extensão da massa .....	65
3.3. Características de viscosidade da massa .....	66
3.4. Características de fermentação da massa .....	67
<b>4. EFEITO DA LEVEDURA TRATADA NA QUALIDADE DO PÃO</b> .....	77
4.1. Avaliação da qualidade tecnológica .....	77
4.2. Avaliação da qualidade organoléptica .....	81
<b>5. EFEITO DA LEVEDURA TRATADA NA COMPOSIÇÃO DO PÃO</b> .....	83
5.1. Composição centesimal dos pães produzidos	
com adição de levedura tratada .....	83
5.2. Composição em aminoácidos dos pães produzidos	
com adição de levedura tratada .....	83
<b>CONCLUSÕES</b> .....	87
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	90

## INDICE DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1: Composição centesimal e de RNA das leveduras original e tratada pelos métodos químico e enzimático.....	55
TABELA 2: Conteúdo de vitaminas das leveduras original e tratada.....	60
TABELA 3: Conteúdo de minerais das leveduras original e tratada.....	61
TABELA 4: Composição em aminoácidos das leveduras original e tratada.....	62
TABELA 5: Escore químico dos aminoácidos essenciais das leveduras original e tratada.....	63
TABELA 6: Parâmetros farinográficos das massas produzidas com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	69
TABELA 7: Parâmetros extensigráficos das massas produzidas com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	71

TABELA 8: Parâmetros viscoamilográficos das massas produzi- das com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	73
TABELA 9: Parâmetros maturográficos das massas produzidas com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	75
TABELA 10: Teste de panificação.....	79
TABELA 11: Análise de variância dos dados obtidos na ava- liação sensorial dos pães com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	82
TABELA 12: Composição centesimal dos pães produzidos com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	84
TABELA 13: Composição em aminoácidos dos pães produzidos com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	85
TABELA 14: Escore químico dos aminoácidos essenciais nos pães produzidos com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada.....	86

## INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
QUADRO 1: Tratamento químico para remoção dos ácidos nucleicos da levedura .....	41
QUADRO 2: Tratamento enzimático para remoção dos ácidos nucleicos da levedura .....	42
QUADRO 3: Teste instrumental de panificação .....	51
QUADRO 4: Ficha para análise das massas produzidas com levedura tratada .....	52
FIGURA 1: Curvas farinográficas das massas produzidas com levedura tratada .....	70
FIGURA 2: Curvas extensigráficas das massas produzidas com levedura tratada .....	72
FIGURA 3: Curvas viscoamilográficas das massas produzidas com levedura tratada .....	74
FIGURA 4: Curvas maturográficas das massas produzidas com levedura tratada .....	76

FIGURA 5: Aspecto geral dos pães produzidos com

0, 2, 5 e 10% de levedura tratada ..... 80

## SUMMARY

Dried and inactivated cells of *Saccharomyces* spp. originating from alcohol production were exposed to physico-chemical, chemical and enzymatic treatments in order to reduce their nucleic acid content. The best results were obtained by the enzymatic method, which consisted of incubation of a 10% suspension of yeast cells, followed by centrifugation and drying. This treatment achieved about a 28% reduction in the nucleic acid content.

Determinations of the proximate composition of the cells, before and after the treatment, as well as an evaluation of the rheological properties of doughs containing the treated material were made. This material was also added to bread formulations in 2, 5 and 10% levels and these loaves were compared to a control, which did not contain the treated yeast, by sensorial analysis.

The use of this material up to 10% in breadmaking, caused some modifications in the doughs technological performance, for instance: increase in the water absorption, increase in the energy required to completely develop the dough, increase in the elasticity and decrease in the extensibility, increase in the initial temperature of gelatinization and temperature of maximum viscosity, decrease in the maximum viscosity during the heating cycle and increase in the maximum viscosity in the cooling cycle, decrease in volume and fermentation time of doughs.

The final results showed that the addition of yeast to bread improved its nutritional value with good organoleptic acceptance. Although the loaves had some characteristics different from the control, such as darker colour and a moist texture, they were well accepted by the sensorial panel and the statistical evaluation did not show any significant difference among them. From the nutritional point of view, addition of treated yeast to bread caused an increase in its protein content and in the essential amino acids, especially lysine, whose content is limited in wheat flour

## RESUMO

Células inativas e secas de *Saccharomyces* spp., provenientes da produção de álcool de cana-de-açúcar, foram tratadas por métodos físico-químico, químico e enzimático, visando a redução de seu conteúdo de ácidos nucleicos. O método que apresentou melhores resultados foi o enzimático, que consistiu na incubação de uma suspensão com 10% de células, seguida de centrifugação e secagem do precipitado. Com esse tratamento, obteve-se uma redução de aproximadamente 28% no teor de ácidos nucleicos.

Foram feitas determinações da composição centesimal desse material, antes e depois do tratamento enzimático, bem como a avaliação das propriedades reológicas de massas adicionadas da levedura tratada. O material tratado foi adicionado na formulação de pão, a níveis de 2, 5 e 10% e esses pães foram testados sensorialmente em comparação com um pão padrão sem aditivação.

Os resultados obtidos mostraram que o uso desse material em panificação, em até 10%, provocou algumas alterações no comportamento tecnológico das massas, tais como: aumento na absorção de água, aumento na energia necessária para desenvolver a massa, aumento na resistência à extensão com decréscimo da extensibilidade, aumento na temperatura inicial de gelatinização e temperatura de viscosidade máxima, diminuição da viscosidade máxima a quente e aumento da viscosidade máxima no resfriamento, diminuição do volume e do tempo de fermentação das massas.

O resultado final da adição de levedura tratada no pão foi a melhora no seu valor nutricional, sendo boa a aceitação organoléptica. Embora os pães aditivados tenham apresentado algumas características diferentes do padrão, tais como cor mais escura e textura mais úmida, foram bem aceitos pelo painel de provadores e o resultado da análise estatística dos dados não acusou diferença significativa entre eles. Do ponto de vista nutricional, a adição da levedura tratada no pão causou aumentos no seu conteúdo de proteínas e de aminoácidos essenciais, com especial ênfase para a lisina, aminoácido no qual a farinha de trigo é deficiente.

## INTRODUÇÃO

Tendo em vista o grande interesse da Biotecnologia na pesquisa e produção de proteína de origem microbiana e também a necessidade de se aproveitar racionalmente os subprodutos da indústria, decidiu-se verificar a possibilidade de uso na alimentação humana das células de *Saccharomyces* spp., provenientes do processo de produção de álcool de cana. O aproveitamento desse material tem sido preconizado em função do potencial oferecido pela indústria alcooleira no Brasil. Pode-se produzir um concentrado proteico separando-se uma porcentagem excedente de células (aproximadamente 10 a 20%) crescidas durante a fermentação para produção do álcool de cana e que, normalmente, retornariam à fermentação através do processo de recuperação. Este concentrado proteico não é aproveitado pela maioria das usinas, exceto em alguns casos onde é incorporado em rações animais. Para que possa ser introduzido na alimentação humana, esse material deve ser primeiramente submetido a tratamentos para redução no seu teor de ácidos nucleicos, cujo nível caracteristicamente elevado representa problema metabólico para o homem.

Trabalhos já realizados com adição de células de levedura inativas em pão ou em dietas contendo cereais, mostraram alguns dos efeitos desse material sobre a qualidade nutricional, sensorial e tecnológica do produto final. No entanto, em nenhum dos trabalhos, a avaliação da qualidade foi realizada nesses três níveis simultaneamente, correlacionando diferentes porcentagens de adição com as alterações de composição química, de comporta-

mento tecnológico e de aceitação organoléptica.

De modo a obter mais informações sobre o assunto, nossa pesquisa buscou investigar os possíveis benefícios advindos da utilização em panificação de leveduras *Saccharomyces* spp. inativas, após o tratamento para redução dos ácidos nucleicos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. MICROORGANISMOS COMO FONTE DE PROTEÍNA

A alta taxa de crescimento populacional tem levado a prognósticos pouco animadores em relação à solução dos problemas de alimentação nas próximas décadas. Acredita-se que a agricultura será insuficiente para atender à demanda de toda a população mundial, da qual aproximadamente metade sofre atualmente de desnutrição, não só pela escassez de alimentos na dieta, mas pela sua baixa qualidade, que não atinge os requisitos mínimos (YOUSRI, 1982).

A alimentação básica do homem consiste de vegetais, animais e seus derivados. Historicamente, o consumo intencional de microorganismos sempre foi limitado, restringindo-se a cogumelos e certas algas. De modo não intencional, o homem os consome há milhares de anos, em produtos como bebidas alcoólicas, vinagre, iogurte, queijos, produtos fermentados de soja (Miso, Tempeh, Shoyu), pão, etc (TUSÉ, 1984). Com a necessidade crescente de fontes de alimento e, principalmente, de proteína, começou-se a pensar no emprego de células microbianas para alimentação animal. Desta forma, seria possível destinar ao consumo humano parte dos grãos e outros vegetais, antes apenas utilizados na alimentação animal. Outra possibilidade seria o consumo direto das células microbianas pelo homem (WASLIEN & STEINKRAUS, 1980).

Assim, dentro desse contexto, tem ganho cada vez mais importância a pesquisa de novas fontes não convencionais de produção de proteínas, sendo uma delas a fermentação microbiológica. O termo SCP (single cell protein) vem sendo largamente utilizado para designar o material celular microbiano destinado ao consumo como alimento pelo homem ou animais (ROTH, 1982). Essa denominação não é totalmente correta, uma vez que este material não contém apenas proteínas, mas também outros componentes como lipídeos, carboidratos, outros compostos nitrogenados, vitaminas e minerais (SISTA & SRIVASTAVA, 1981). No entanto, o termo SCP é considerado interessante do ponto de vista psicológico pois, segundo KIHBERG (1972), evita-se quaisquer associações desagradáveis que o consumidor possa fazer com os microorganismos que dão origem a essa fonte protéica.

A produção de proteína microbiana apresenta algumas vantagens em relação às mais tradicionais. Além do alto conteúdo protéico, os substratos para cultura podem ser diversos e a cultura independe das condições climáticas e de grande espaço físico. O material celular aumenta rapidamente devido ao curto tempo de geração, havendo ainda inúmeras possibilidades de induzir mutações genéticas para a obtenção de certas características desejadas (KILBERG, 1972).

Uma grande variedade de microorganismos tem sido pesquisada como fonte de proteínas, como as algas, as bactérias, os fungos e as leveduras. As leveduras se destacam por apresentarem características bastante favoráveis, tais como a estabilidade da cultura, taxa de crescimento elevada e tamanho de células

(6-15 u), que permite fácil recuperação do meio de fermentação. O teor de ácidos nucleicos encontrado em células de levedura (8-10%) é inferior ao das bactérias (18-20%) e, acima de tudo, têm melhor aceitação, por serem mais familiares ao consumo (COONEY *et alii*, 1980; SISTA & SRIVASTAVA, 1981).

Devido à presença de clorofila, as algas não necessitam de substratos orgânicos, pois utilizam diretamente a energia solar e o gás carbônico do ar para o seu desenvolvimento. Já as leveduras requerem uma fonte de energia, ou seja, substratos contendo carbono, uma fonte de nitrogênio, como amônia, nitratos, uréia, e uma fonte de fósforo, que pode ser o ácido fosfórico ou fosfatos solúveis, além de minerais como K, Mg, Zn, Mn e Fe, e vitaminas em quantidades adequadas ao desenvolvimento de cada espécie (ROTH, 1982; LITCHFIELD, 1983). Como substratos ou fontes de carbono podem-se utilizar carboidratos, hidrocarbonetos e outros compostos, como álcoois, aldeídos e ácidos orgânicos (LITCHFIELD, 1977a, 1983).

A utilização de compostos derivados de petróleo como substrato depende diretamente da disponibilidade e do custo desse material, que é uma fonte não renovável de energia. Por isso, várias pesquisas têm sido feitas, visando o uso de outras fontes de energia (LITCHFIELD, 1977a).

De uma maneira geral, os carboidratos podem ser obtidos a um baixo custo, a partir de processos agroindustriais. Tem sido estudado o uso de diversos materiais resultantes do processamento industrial de alimentos, como cascas de vegetais, farelo de cereais, soro de leite, bagaço de cana, etc, como substratos para a

produção de proteína unicelular. Seu uso é economicamente interessante, além das vantagens do ponto de vista ecológico, evitando problemas relativos à poluição do meio ambiente (TANNENBAUM, 1971).

O critério de escolha do substrato está baseado na sua disponibilidade, custo, toxidez e da adequação em relação ao microorganismo a ser cultivado (COONEY *et alii*, 1980). De acordo com o microorganismo e o processo adotado, serão então definidas as condições de fermentação, como a temperatura, o pH, aeração, agitação, e o grau de assepsia exigido (KIHLBERG, 1972).

Este trabalho não tem como principal preocupação a produção, mas o estudo do aproveitamento de células microbianas disponíveis no processo fermentativo para a produção de álcool de cana.

De um modo simplificado, a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar envolve as etapas de recepção e lavagem da cana, seguida da moagem e de uma série de tratamentos de clarificação do caldo. É feita então a adição das leveduras no caldo, que é deixado fermentar em dornas. Ao final do processo separa-se o "vinho", que é levado para a destilação, e o "leite" ou "creme" de leveduras. Essas células são adicionadas a uma nova batelada de caldo, após sofrerem um tratamento ácido para eliminação das bactérias contaminantes presentes no meio. Durante o período de incubação ocorre uma certa multiplicação do número de células de levedura, embora as condições sejam controladas para que esses microorganismos sigam preferencialmente a via fermentativa.

é possível retirar parte da levedura que seria recirculada, sem prejuízo do rendimento em álcool, podendo a referida "sangria" atingir até 20%. Esse material retirado deve passar por um tratamento, que compreende uma etapa de termólise para inativação e rompimento das células, seguida da secagem em rolos. O "leite" de leveduras contém normalmente uma pequena porcentagem de álcool, que é recuperado por lavagem ou por uma coluna de destilação, antes da termólise. Depois de seco, esse produto pode ser comercializado, sendo especialmente conhecido seu uso como ingrediente de rações animais.

Há alguns anos atrás, várias usinas interessaram-se pela produção desse material, adquirindo os equipamentos necessários para essa finalidade. No entanto, o mercado de rações não absorveu esse produto na quantidade esperada, devido à sua sazonalidade, ou seja, disponibilidade apenas durante os seis meses de safra da cana. O bagaço da cana, outro resíduo do processo, acabou mostrando-se mais interessante para o uso imediato na alimentação animal, desestimulando a maioria das usinas a produzir a levedura seca.

Atualmente essa levedura não está disponível em grande quantidade. Porém esse quadro pode ser alterado, desde que o mercado tenha interesse pelo produto, o que poderá ocorrer se surgirem novas alternativas para sua utilização. Trata-se de um material muito rico em proteínas, vitaminas e sais minerais, o que nos leva a acreditar que sua utilização na alimentação humana merece ser seriamente estudada. Além do mais, tendo em vista o grande volume de álcool produzido no Brasil, quase 11 bilhões de

litros em 1987, não se pode ignorar o grande potencial dos resíduos e efluentes desse processamento. A levedura seca pode ser obtida na proporção de 30 a 40 g / l de álcool produzido, o que representa aproximadamente 400.000 ton desse material por ano.

Cada vez mais o setor alcooleiro vem tomando consciência de que é importante diversificar e ampliar suas atividades. Desta forma, a levedura seca poderá ser produzida com um pequeno investimento e ser comercializada para fins alimentícios, químicos, farmacêuticos ou médicos, desde que se apresentem trabalhos técnicos que viabilizem o seu aproveitamento.

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PROTEÍNA UNICELULAR COMO ALIMENTO

A proteína unicelular não é convencionalmente usada na alimentação humana, tornando-se portanto necessário avaliar a sua capacidade de suprir as necessidades nutricionais do organismo, os aspectos toxicológicos e alergênicos e também a aceitabilidade sensorial e funcional da mesma (MATELES & TANNENBAUM, 1968).

### 2.1. ASPECTOS NUTRICIONAIS

A composição química das células microbianas é bastante variável e depende de diversos fatores, entre eles a espécie, a composição do meio de cultivo, as condições da fermentação e os processos utilizados na recuperação das células produzidas.

Segundo alguns autores (TEIXEIRA et alii, 1960; KIHLEBERG, 1972; WASLIEN, 1975; SARWAR et alii, 1985), o teor de proteína das leveduras varia entre 22 e 39 % (base seca).

O teor de proteína de *S. cerevisiae* é elevado, comparando com outras fontes protéicas convencionais, sendo superior ao do trigo integral e do leite e um pouco inferior ao do ovo e carne (MATELES & TANNENBAUM, 1968). Do nitrogênio presente nas células microbianas, 70 a 80 % constituem estruturas protéicas. Segundo MATELES & TANNENBAUM (1968), 8-13% do nitrogênio são purinas, 4% são pirimidinas, 0,5% são glucosaminas. Alguns pesquisadores (SARWAR et alii, 1985) determinaram a porcentagem de nitrogênio total e protéico em leveduras, sugerindo um fator de apro-

ximadamente 5,73 para a conversão da porcentagem de nitrogênio total em porcentagem de proteína.

Os teores médios de gordura, cinzas e fibras das leveduras é de 2, 6 e 1,5 %, respectivamente, sendo o restante constituído praticamente por carboidratos.

De um modo geral, as leveduras são uma boa fonte de vitaminas aquossolúveis, principalmente as do complexo B, porém praticamente não contêm vitaminas lipossolúveis. As leveduras podem ser uma fonte econômica de vitaminas para alimentação humana e animal, segundo alguns autores (KIHLEBERG, 1972; WASLIEN, 1975; MATELES & TANNENBAUM, 1968). O teor de vitaminas do complexo B é bastante elevado e superior ao de alimentos considerados como boas fontes dessas vitaminas. A levedura contém, em 100 g de material seco, cerca de 4 mg de tiamina (B<sub>1</sub>), 6 mg de riboflavina (B<sub>2</sub>), 4 mg de piridoxina (B<sub>6</sub>), 30 mg de niacina, 15 mg de ácido pantotênico, 3 mg de ácido fólico, 0,15 mg de biotina e 6 µg de cianocobalamina (B<sub>12</sub>). Esses valores foram citados por WASLIEN (1975), TEIXEIRA et alii (1960) e SARWAR et alii (1985) e são superiores aos requerimentos humanos diários dessas vitaminas (MARKS, 1975). Isto sugere que a inclusão de leveduras na dieta humana, mesmo em pequenas quantidades, pode ser muito benéfica, aumentando a ingestão diária recomendada das vitaminas do complexo B.

Quanto ao conteúdo de minerais das células de levedura, os teores de cálcio e sódio não diferem muito com relação aos dos alimentos tradicionais, porém os teores de potássio, fósforo e ferro são bem mais elevados na levedura. Deve ser notado o baixo

valor da relação Ca/P que pode levar alguns animais à nefrocalcinose quando alimentados com grande quantidade de proteína unicelular (WASLIEN, 1975).

Comparando-se a composição em aminoácidos da proteína da levedura com a da proteína de referência teórica da FAO/WHO ou com a de outras fontes protéicas tradicionais, nota-se que a sua composição em aminoácidos não é balanceada. As células de levedura possuem grande quantidade de lisina, porém são deficientes em aminoácidos sulfurados, enquanto que os demais aminoácidos são encontrados em quantidades suficientes (WASLIEN, 1975; MARTINI et alii, 1979; SARWAR et alii, 1985). Estes dados ficam evidenciados pelo cálculo do escore químico dos aminoácidos essenciais, no qual se estabelece uma estimativa do valor biológico da proteína. De modo geral, metionina e triptofano são os primeiros aminoácidos limitantes na proteína de leveduras, tendo o aminoácido lisina o escore químico mais alto. WASLIEN (1975) considerou que as proteínas de levedura são de boa qualidade, com base nos resultados comparativos de valor biológico (BV) e de eficiência protéica (PER) dessa proteína com outras fontes de proteína animal de boa qualidade.

## 2.2. ASPECTOS SENSORIAIS E FUNCIONAIS

Para uso na alimentação humana a proteína unicelular deve ter características aceitáveis de sabor, odor e textura. Cada espécie de levedura tem seu sabor e aroma característicos que, segundo COONEY et alii (1980) e MATELES & TANNENBAUM (1968), po-

dem ser influenciados pelo meio de crescimento

Dependendo do seu uso final, a proteína unicelular deve apresentar características funcionais adequadas com relação à capacidade de hidratação, de solubilização e de formação de gel, e outras propriedades como a de antioxidante, dispersante, espessante ou estabilizante de emulsões, etc. Em função de iiso, as células de levedura podem ser tratadas por processos químicos (acetilação, succinilação, adição de álcali, etc) ou físicos (formação de fibras ou proteína texturizada por extrusão) (LITCHFIELD, 1977a). Assim, a levedura poderá ser comercializada, na sua forma original ou sem a parede celular, na forma de isolado ou de concentrado protéico, ou ainda com outras modificações, conforme as características que se deseja para o seu uso final.

### 2.3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

A avaliação de um produto para consumo humano ou animal deve ser considerada também do ponto de vista toxicológico.

#### 2.3.1. Tipos de toxicidade:

Os problemas associados à proteína microbiana podem ser do tipo agudo ou crônico (MATELES & TANNENBAUM, 1968). Uma das causas da toxicidade aguda é a presença de qualquer componente tóxico no substrato, que causa a contaminação do material celular, tornando-o inaceitável para o consumo (TUSÉ, 1984). Esse problema tende a ocorrer no caso de cultivo em hidrocarbonetos,

devendo ser realizada uma boa separação entre as células e o substrato no final do processo, para evitar a possível presença de compostos aromáticos policíclicos ou n-alcanos residuais (LITCHFIELD, 1983). Outra causa é a presença da parede celular. A estrutura molecular da parede das células de levedura, segundo KIDBY & DAVIES (1970), apresenta uma rede formada por um complexo dos polissacarídeos glucanas e mananas, ligados entre si por uma proteína que contém uma ponte dissulfeto. Esta estrutura é difícil de ser rompida, sendo necessária a presença de enzimas específicas, ausentes no trato gastrointestinal de homem. Estudos com animais comprovaram que o rompimento da parede celular aumenta a digestibilidade da proteína unicelular (TANNENBAUM & MILLER, 1967). Além do rompimento, pode ser também necessária a retirada da parede celular, nos casos em que ela apresente fatores alergênicos (MATELES & TANNENBAUM, 1968). Geralmente, os sintomas de intoxicação aguda são perturbações gastrointestinais, com mal-estar generalizado, diarreia e câimbras, em estados mais graves.

O problema de toxicidade crônica está relacionado com o alto teor de ácidos nucleicos das células de levedura, que é bem superior ao encontrado nos alimentos em geral. Segundo ROSALES (1984), os teores de ácidos nucleicos em células de vários microrganismos estão entre 6,0 e 11,5%. KIHLEBERG (1972) verificou que a quantidade de ácidos nucleicos presente na proteína unicelular é consideravelmente maior que a encontrada em farinhas de trigo e centeio, sardinha, ova de peixe ou fígado. MATELES & TANNENBAUM (1968) encontraram valores próximos a 4% para fígado, peixe e ova de peixe e valores entre 7,5 e 16,3 para algumas bac-

térias.

### 2.3.2. Metabolismo dos ácidos nucleicos:

A ingestão de altos níveis de ácido nucleico pode acarretar problemas de saúde ao homem. Ao ser ingerido, esse ácido é despolimerizado por nucleases do suco pancreático e convertido a nucleosídeos pelas enzimas do intestino. Esses nucleosídeos contêm 2 tipos de bases nitrogenadas: as pirimidinas, que são razoavelmente metabolizadas pelo homem e as bases purinas (adenina e guanina), que são oxidadas e desaminadas a ácido úrico. O ácido úrico, entretanto, sendo apenas ligeiramente solúvel no pH fisiológico, não é prontamente excretado, podendo ser cristalizado em diferentes partes do organismo (TUSÉ, 1984; ROTH, 1982; KIHLEBERG, 1972).

O homem não possui a enzima uricase, cuja função é oxidar o ácido úrico à alantoína, uma substância mais solúvel e, portanto, mais eficientemente excretada pelos rins. Os animais que possuem essa enzima não apresentam quaisquer problemas na ingestão de leveduras ou outros microorganismos. De um modo geral, os mamíferos excretam uréia e alantoína como produtos finais do metabolismo do nitrogênio protéico alimentar das purinas, respectivamente. As aves excretam apenas ácido úrico, mas dispõem de um mecanismo de indução das nucleases pancreáticas que as protege do problema de cristalização do ácido úrico, que é benéfico na dieta, pois serve como fonte de fósforo, mineral importante no crescimento dos frangos (TUSÉ, 1984; GREIFE, 1984).

No caso do homem, apenas ácido úrico é excretado e, por isso, o aumento no consumo de purinas causa conseqüente aumento dos níveis de ácido úrico no plasma sanguíneo e urina. No sangue, isto resulta em deposição de ureato nos tecidos ("tophi") e nas juntas, com dolorosas manifestações de inflamação (gota). Altos níveis de ácido úrico na urina podem causar formação de pedras nos rins e bexiga.

### 3. REMOÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DA PROTEÍNA UNICELULAR

De acordo com VIKARI & LINKO (1977), é possível evitar o consumo excessivo de ácidos nucleicos ao ingerir células de levedura ou outros microorganismos. Os autores acreditam que uma maneira dessa redução ser alcançada seria a limitação da síntese de ácidos nucleicos durante a fermentação, o que seria indesejável, devido à diminuição da taxa de crescimento dos microorganismos e da síntese de proteínas.

Isolados ou concentrados protéicos com baixo conteúdo de ácidos nucleicos podem também ser obtidos a partir de células de levedura intactas ou desintegradas. Acredita-se que quando a parede celular é primeiramente desintegrada, os componentes celulares podem ser extraídos por processos brandos, o que proporciona melhor preservação da qualidade de proteína e maior viabilidade econômica do processo (HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972). Uma vez extraída ou solubilizada no meio de processamento, a proteína deve ser precipitada, de modo a poder ser separada dos outros componentes celulares.

#### 3.1. DESINTEGRAÇÃO DA PAREDE CELULAR

Vários métodos têm sido testados quanto à sua eficiência no rompimento da parede celular dos microorganismos. Sabe-se que *S. cerevisiae* apresenta um certo grau de dificuldade no rompimento celular (HETHERINGTON *et alii*, 1971), o que torna essa etapa

especialmente importante.

A desintegração das células de levedura pode ser conseguida por meios físicos, químicos ou enzimáticos.

### 3.1.1. Métodos físicos:

Entre os métodos físicos utilizados para o rompimento celular, são citados a agitação com partículas abrasivas, a homogeneização à alta pressão, os tratamentos térmicos e a ultrassonografia.

A desintegração através da agitação da suspensão de células com partículas abrasivas foi reportada em alguns trabalhos, usando-se homogeneizador horizontal (GUZMÁN-JUÁREZ & HUDSON, 1978; HEDENSKOG & MOGREN, 1973; MOGREN *et alii*, 1974) ou vertical (CURRIE *et alii*, 1972). Estes processos envolvem a agitação de uma suspensão de células por uma rosca sem fim ou outro tipo de agitador, como o de discos, sendo constantemente atritada contra bolinhas de vidro colocadas no homogeneizador. Segundo EDEBO & MAGNUSSON (1973), a presença das partículas de vidro pode causar adsorção de alguns componentes e a contaminação da suspensão com silicatos. Em certos modelos de equipamento têm-se usado bolinhas de plástico, com grande eficiência. Tanto em homogeneizador horizontal (Dyno-Muhle KD5) como vertical (Netzsch-Molinox KE5) observou-se que a desintegração é um processo de primeira ordem, cuja eficiência depende do número e do tamanho das partículas abrasivas, da concentração da suspensão de células, da vazão, do formato e da velocidade do agitador.

HEDENSKOG & MOGREN (1973) compararam a desintegração mecânica com tratamentos térmicos, utilizando secadores de rolos e tipo "spray". Os autores concluíram que a secagem em rolos foi mais eficaz, pela melhora no valor biológico, pela manutenção das propriedades funcionais e pela facilidade na extração das proteínas. Deve-se considerar que esses tratamentos térmicos podem ser necessários como etapa de secagem do material e também, como atuam sobre a atividade das células, para inativação de possíveis contaminantes presentes. As modificações nas propriedades funcionais podem ser favoráveis e são devidas principalmente à desnaturação protéica (LABUZA *et alii*, 1972).

A homogeneização sob alta pressão pode ser realizada com suspensão de células na forma líquida (LEE *et alii*, 1979; HETHERINGTON *et alii*, 1971; FOLLOWS *et alii*, 1971) ou sólida (EDEBO & MAGNUSSON, 1973). No primeiro caso, foram obtidos bons resultados com o uso do homogeneizador Manton-Gaulin 15M-8BA (APV), que possibilitou a ruptura da parede celular pela passagem, através de um orifício (válvula de carbureto de tungstênio), de uma suspensão de células mantida sob pressurização (550 atm). Conseguiu-se a extração das proteínas (HETHERINGTON *et alii*, 1971) e enzimas (FOLLOWS *et alii*, 1971) sem perda aparente da sua atividade. LEE *et alii* (1979) estudaram a estrutura da parede celular de *C. lypolytica* e verificaram que a homogeneização à alta pressão rompeu a parede celular sem fragmentá-la, mantendo o formato original ("egg shape") das células. Quando se trata de uma suspensão de células na forma sólida, a homogeneização se baseia na mudança de fase causada pelo aumento de pressão: o material, no estado sólido-

do (congelado), é forçado a passar de uma câmara do aparelho à outra, através de um orifício diminuto, pela ação de um pistão. A extensão da desintegração e a dimensão final das partículas dependem do número de movimentos de vai-e-vem do pistão e da pressão empregada.

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

### 3.1.2. Métodos químicos:

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

TREVELYAN (1976b) observou que células de *S. cerevisiae* em suspensão, incubadas por 4 horas a 50 °C, tornaram-se permeáveis e possibilitaram a difusão no meio dos componentes celulares de baixo peso molecular. Para suprimir o tempo de incubação, esse autor sugeriu a plasmólise com etil acetato ou com etanol (TREVELYAN 1976a; SUGIMOTO, 1974). Esses compostos parecem desorganizar algumas estruturas da membrana celular, principalmente aquelas ligadas ao vacúolo, iniciando a autólise das células.

Para a destruição da parede celular, GUNSALUS (1959) utilizou detergentes, que são compostos químicos capazes de atuar sobre as proteínas e lipídeos da mesma.

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

### 3.1.3. Métodos enzimáticos:

Para promover o rompimento da parede celular de leveduras pode ser feita a adição de enzimas exógenas durante a incubação de uma suspensão de células. Esse tratamento resulta em liberação das proteínas e RNA do interior das células, do mesmo modo que uma desintegração mecânica. Observou-se (KNORR *et alii*, 1979) que a adição de zimolase e lisozima ativou também as proteases e ribonucleases endógenas das leveduras, que passaram a agir durante a incubação. Apesar da eficiente desintegração da parede celu-

lar e da liberação de material intracelular em curto espaço de tempo, o uso de enzimas exógenas depende da facilidade em sua obtenção, do grau de pureza exigido e, principalmente do custo.

### 3.2. REMOÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DA PROTEÍNA UNICELULAR

A remoção dos ácidos nucleicos é feita após a desintegração da parede celular, a fim de separá-los do material celular restante. A remoção dos ácidos nucleicos pode ser conseguida através de vários métodos.

#### 3.2.1. Métodos químicos:

É possível realizar a separação dos ácidos nucleicos da proteína celular através da extração alcalina das proteínas contidas na suspensão de células de levedura. Esta metodologia foi estudada por vários pesquisadores, usando diversas condições de pH, temperatura e tempo de tratamento. A recuperação das proteínas do extrato alcalino foi normalmente conseguida pelo abaixamento do pH até o ponto isoelétrico (HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972; LINDBLOM, 1974b; GUZMÁN-JUÁREZ & HUDSON, 1978; TAJIMA & YOSHIKAWA, 1975; VANANUVAT & KINSELLA, 1975a) ou por tratamento térmico (GIERHART & POTTER, 1978; HEDENSKOG & MOGREN, 1973; HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972; LINDBLOM, 1974b; VANANUVAT & KINSELLA, 1975a). As quantidades de proteína recuperadas por precipitação ácida ou por aquecimento foram semelhantes, porém o aquecimento provocou algumas mudanças irreversíveis nas mesmas, como a

diminuição na sua solubilidade. Sabe-se também que o aquecimento pode tornar alguns aminoácidos essenciais menos disponíveis, devido à racemização e decomposição química (STERNBERG *et alii*, 1975). Certas combinações de pH alcalino e aquecimento, por determinado período de tempo, levam a modificações químicas e à formação de lisinoalanina (LAL); a partir de cistina e serina, são formados resíduos de dehidroalanina que, reagindo com grupo E-NH<sub>2</sub> da lisina, dão origem à lisinoalanina, que é um aminoácido pouco absorvido pelo organismo. Assim, o tratamento térmico em pH alcalino diminuiu o conteúdo de cistina e lisina e, em casos mais severos, decresceram também os teores de serina e arginina, bem como os valores de digestibilidade e NPU (de GROOT & SLUMP, 1969; SHETTY & KINSELLA, 1980b; STERNBERG *et alii*, 1975). A presença de cloreto de sódio durante o aquecimento influenciou positivamente os resultados, ampliando a faixa de pH alcalino na qual ocorre um aumento na remoção de RNA e no rendimento em proteína (HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972).

A separação dos ácidos nucleicos foi feita também, com bons resultados, usando meio ácido para extrair e precipitar as proteínas (OTERO *et alii*, 1982; TREVELYAN, 1977; TSANG *et alii*, 1979; ACHOR *et alii*, 1981).

Doutros reagentes químicos foram também usados para separar os ácidos nucleicos do material celular. Sabe-se que a proteína e o ácido nucleico formam um complexo através de interações eletrostáticas entre grupos catiônicos dos resíduos de lisina e grupos fosfato aniônicos dos ácidos nucleicos. Esse complexo pode ser desestabilizado em condições ácidas, facilitando assim a se-

paração dos ácidos nucleicos. Para tanto, foram induzidas modificações reversíveis no grupo E-NH<sub>2</sub> da lisina, com o uso de anidridos ácidos (SHETTY & KINSELLA, 1979a, 1979b, 1980a, 1982a, 1982b; VANANUVAT & KINSELLA 1983). Outros trabalhos utilizaram a fosforilação (DAMODARAN & KINSELLA, 1984) ou sais caotrópicos (DAMODARAN & KINSELLA, 1983) visando a separação do complexo nucleoprotéico.

### 3.2.2. Métodos enzimáticos:

A hidrólise enzimática foi também estudada como um meio de reduzir os ácidos nucleicos nas células microbianas. No entanto, essa metodologia exige preparações enzimáticas livres de outras enzimas, principalmente proteases, e adequadas para uso alimentar, o que normalmente torna seu custo muito elevado. A utilização das próprias enzimas ribonucleases (RNases) endógenas parece ser uma possibilidade mais viável. É sabido que nas células de levedura o RNA está localizado no núcleo, mitocôndria, ribossomos e citoplasma, enquanto que a RNase é encontrada nos vacúolos e associada aos ribossomos.

Quando se trabalha com células intactas, o contato entre a enzima (RNase) e o substrato (RNA) fica dificultado, sendo necessário algum agente que libere ou ative a enzima. A ativação pode ser feita através de choque térmico (MAUL *et alii*, 1970; CANEPA *et alii*, 1972; OHTA *et alii*, 1971; TREVELYAN, 1976a; SCHACHTEL, 1981) ou pela presença de compostos químicos como etanol (TREVELYAN, 1976a), etil acetato (TREVELYAN, 1976b), tióis (SHETTY

& KINSELLA, 1978) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (CANEPA *et alii*, 1972). As características das enzimas endógenas variam de um microorganismo para o outro, o que acarreta diferenças entre as condições de incubação e os mecanismos de ativação empregados (LINDBLOM, 1977a). Assim, o choque térmico, que foi usado com bons resultados em alguns microorganismos (*E. utilis*), não foi adequado para uso em *S. cerevisiae* (LINDBLOM, 1977a; TREVELYAN, 1976a, 1976b). Não se sabe ao certo o efeito do choque térmico, mas supõe-se a enzima se torne mais ativa devido à desnaturação de algum inibidor da mesma, pela sua liberação de algum compartimento celular ou pela desnaturação do substrato, que o torne mais disponível ao ataque enzimático (OHTA *et alii*, 1971). Já os compostos químicos atuam facilitando a hidrólise dos ribossomos e a saída de oligo e mononucleotídeos de dentro das células ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ativando enzimas e/ou quebrando complexos entre enzima e algum inibidor (tióis), ou mesmo desorganizando certas estruturas da membrana celular (vacúolo) para liberar as enzimas (etil acetato, etanol).

O rompimento das células pela desintegração mecânica foi considerado um procedimento bastante efetivo para colocar em contato enzima e ácidos nucleicos (LINDBLOM & MOGREN, 1974). Observou-se, no entanto, que na ausência de cloreto de sódio, a RNase não apresentou atividade sobre a suspensão de células previamente desintegradas. À princípio atribuiu-se a esse sal a função de ativador da enzima, mas posteriormente se constatou (LIND-  
BLOM, 1977a) que sua presença era necessária para proteger a enzima de inibidores durante a incubação. Foi também sugerido por TREVELYAN (1976a) que a atuação do sal pode estar ligada à desa-

gregação da estrutura dos ribossomos, seguida da ruptura de ligações eletrostáticas.

Depois da desintegração das células ou da ativação enzimática, a suspensão deve ser incubada em condições adequadas de tempo, temperatura e pH, para a atuação das RNases. No caso de *S. cerevisiae*, as condições ótimas encontradas foram pH 5-6 e temperatura de 50-60 °C. Valores de pH alcalino e temperaturas maiores que 65 °C inativaram irreversivelmente a enzima. O tempo de incubação deve ser o menor necessário, visto que outras enzimas, como as proteases, podem também agir, produzindo efeitos indesejáveis (LINDBLOM, 1977a). Após o período de incubação, a proteína pode ser então separada do ácido nucleico por aquecimento ou através de uma precipitação ácida.

### 3.2.3. Outros métodos:

Além dos métodos tradicionalmente usados, há outras possibilidades para reduzir o teor de ácidos nucleicos das células de microorganismos. Com o uso de resina de troca iônica foram obtidos concentrados de proteína não desnaturada, com boas propriedades funcionais e com nível toxicologicamente aceitável de ácidos nucleicos. Esse método se baseia no fato de que, no pH fisiológico (5-7), os ácidos nucleicos têm uma carga líquida negativa alta, enquanto que muitas proteínas estão próximas do seu ponto isoeletrico. Para se conseguir uma boa separação, é preciso proporcionar condições que aumentem a solubilidade do ácido nucleico e que reduzam as suas ligações com as proteínas. Isto pode ser

obtido através da homogeneização da suspensão e do tratamento com agentes quelantes, como o ácido cítrico, mantendo uma força iônica que reduza as interações eletrostáticas entre proteína e ácido nucleico. A suspensão é, então, passada pela resina, que faz a remoção seletiva dos ácidos nucleicos (LEWIS *et alii*, 1982).

Uma nova possibilidade é a produção de linhagens de leveduras com características mais apropriadas pela aplicação da engenharia genética. Uma linhagem mutante de *S. cerevisiae* (JD 109) com temperatura de crescimento de 27 °C, quando submetida a condições de temperatura acima de 37 °C e pH 8, sofreu lise de suas células, liberando facilmente a proteína (SCHAFFELD *et alii*, 1982; BATT & SINSKEY, 1984).

Depois de extraído por qualquer um desses métodos, o RNA pode ser convenientemente purificado e aproveitado comercialmente, para tornar o processo economicamente viável. Após a hidrólise alcalina, é possível recuperar o RNA de alto peso molecular contido no sobrenadante através de uma precipitação ácida (HEDENSKOG & MOGREN, 1973). Nos processos enzimáticos podem ser formados 3' ou 5'-mononucleotídeos, respectivamente a pH ácido e alcalino (OHTA *et alii*, 1971). Sabores semelhantes à carne e queijo, notados em algumas preparações, têm sido atribuídos à formação de 5'-mononucleotídeos, durante a hidrólise do RNA (GIERHART & POTTER, 1978), podendo ter interesse tecnológico. Muitos nucleotídeos, nucleosídeos e seus derivados têm também aplicações no campo bioquímico, médico e de nutrição.

SEELEY *et alii* (1974) obtiveram isolado protéico com alto teor e boa qualidade de proteína, baixo teor de RNA, sabor e aro-

ma suaves e boas propriedades funcionais. Além do isolado foram obtidas duas outras frações, que podem ser utilizadas como espessantes ou flavorizantes para alimentos.

Independentemente do método de obtenção, os concentrados protéicos podem ser produzidos com ou sem as paredes celulares. Embora não seja imprescindível, a não ser quando associada a algum problema alergênico, a retirada da parede envolve apenas a adição de uma etapa de separação que, de modo geral, parece contribuir para as propriedades funcionais e nutricionais da levedura.

#### 4. UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR EM PANIFICAÇÃO

Em países onde proteínas de boa qualidade não existem em grande quantidade, os cereais contribuem com uma parcela importante da ingestão diária. O enriquecimento de farinhas tem sido frequentemente considerado, seja pela adição de vitaminas e/ou aminoácidos sinteticamente produzidos, seja pela adição de concentrados protéicos, como farinha de peixe, soja e outros.

As características da proteína unicelular, principalmente seu alto teor de lisina e carência de aminoácidos sulfurados, sugerem que a sua associação com cereais seria muito vantajosa no aspecto nutricional (KIHLEBERG, 1972; YÁÑEZ *et alii*, 1973, 1974; LINDBLOM, 1977b; PYLER, 1973; PONTE, 1978). Além disso, a levedura é uma fonte natural de vitaminas do complexo B e de componentes minerais nutricionalmente benéficos ao homem.

YÁÑEZ *et alii* (1974) fizeram um estudo sobre a complementação de farinhas de trigo, milho e arroz com proteína unicelular em diversas proporções. Os resultados obtidos comprovaram a melhora significativa na quantidade e qualidade protéica das dietas à base de cereais, quando adicionadas dos concentrados protéicos. Os valores do PER foram aumentados, aproximando-se daquele da dieta de controle contendo caseína e o ganho de peso dos animais testados (ratos) foi superior, em alguns casos. O efeito observado foi atribuído ao acréscimo de aminoácidos essenciais, especialmente lisina, primeiro aminoácido limitante nos cereais estudados.

Entre os produtos provenientes de cereais, o pão é um produto largamente consumido, podendo ser usado como veículo da suplementação de proteínas à dieta, principalmente em países onde é um alimento básico e de alto consumo diário. Além do enriquecimento nutricional, a adição de proteína unicelular em uma massa para panificação estimulou a sua taxa de fermentação. LAI *et alii* (1984) estudaram o efeito estimulante de um concentrado protéico de leveduras sobre a fermentação de uma massa de panificação, para conhecer o constituinte responsável e o seu modo de ação na massa. A série de testes realizada mostrou que o efeito notado não era função da presença de nitrogênio, enzima, íon metálico, vitamina ou açúcar fermentável existentes no concentrado protéico. Segundo os autores, parece haver um sistema de interação entre 2 ou mais componentes, sendo um deles uma proteína e o outro, um composto de baixo peso molecular.

SEELEY *et alii* (1950) investigaram o valor nutritivo de pães de farinha de trigo contendo 1 e 3% de levedura de cerveja inativa e isenta de sabor amargo, através da medida do crescimento de ratos submetidos a uma dieta de pão, *ad libitum*, e um suplemento de vitaminas lipossolúveis. Como a maioria dos pães comercializados nos EUA contém sólidos desengordurados de leite, a adição de leveduras foi feita em formulações com e sem esse ingrediente. Nas condições empregadas, a levedura foi superior, como suplemento, ao leite em pó, e os melhores resultados foram observados nos pães com ambos os ingredientes. Verificou-se que os pães com levedura provocaram um aumento no ganho de peso, porém sem aumento significativo no valor biológico e digestibilidade

das proteínas. O efeito de ganho de peso foi atribuído ao aumento do conteúdo protéico dos pães contendo levedura e também pela presença de vitaminas do complexo B.

MILATOVIC *et alii* (1979) pesquisaram pães de farinha de trigo com adição de 5% de levedura (*S. cerevisiae*) seca e inativada, do ponto de vista nutricional, fisiológico e também tecnológico. Como a levedura é deficiente em aminoácidos sulfurados, foi incorporado à formulação 2% de soro de leite em pó. Foi também adicionada 10% de farinha de milho tratada termicamente a fim de aumentar a absorção de água da massa e o seu rendimento e também prolongar o tempo de prateleira. Finalmente, foi incorporado à formulação um pré-fermento, sem levedura inativa. A porcentagem final de proteína foi de 15% e o teor de vitamina B e de aminoácidos também aumentou.

Um estudo sobre o uso de células inativas de *C. utilis* (YÁÑEZ *et alii*, 1973) teve como objetivo estabelecer os efeitos da adição de 3, 6 e 10% de levedura ao pão. Os resultados mostraram que, tecnologicamente, a qualidade do pão diminuiu com o aumento de levedura, afetando as propriedades físicas, notadamente o volume e as propriedades organolépticas, produzindo pães com a cor da crosta mais escura. A qualidade nutricional foi medida pela observação de ratos que receberam pão como única fonte de proteína, tendo como referência um outro grupo, com dieta contendo caseína. O ganho de peso e o valor do PER aumentaram com a porcentagem crescente de levedura, mas não foram os mesmos do grupo de controle. O efeito da melhora da qualidade protéica foi atribuído à presença de lisina.

LINDBLOM (1977b) comparou o efeito da adição de diferentes concentrados protéicos sobre as características funcionais e de panificação. Nesse trabalho, a solubilidade do concentrado protéico não foi influenciada pela remoção da parede celular, sendo essa propriedade afetada principalmente pelo tratamento térmico. Nos concentrados não tratados termicamente, onde a proteína permaneceu na forma nativa, notou-se uma influência do pH sobre a solubilidade dos concentrados, a qual foi mínima a pH 4 e de 80-90% a pH neutro; a solubilidade diminuiu devido à desnaturação protéica, sendo praticamente independente do pH. A capacidade de inchamento foi maior nos concentrados com tratamento para remoção do RNA, sendo pouco afetada pela remoção da parede celular.

Quanto às propriedades relativas à panificação, os concentrados não termicamente tratados apresentaram problemas na qualidade, possivelmente devido às enzimas liberadas durante o processo de desintegração das células. Essas enzimas e componentes de baixo peso molecular como a glutatona podem ter causado danos à estrutura do glúten e do pão. A adição desses concentrados à farinha de trigo proporcionou a formação de uma massa fraca, com pouca elasticidade, conforme avaliação no Extensígrafo. Os pães produzidos foram achatados, com cor escura e forte gosto de levedura autolisada. A presença ou não da parede celular não foi importante na produção do pão.

Os concentrados que sofreram algum tipo de tratamento térmico produziram pães com formato semelhante ao de controle, embora com volume menor. Os concentrados com solubilidade muito

baixa (em torno de 5%) não interagiram com a massa, comportando-se como um composto inerte e resultando em massa com alta resistência à extensão e baixa extensibilidade. Os concentrados com solubilidade um pouco mais elevada interagiram com a massa, baixando a resistência à extensão e aumentando a extensibilidade. Esses concentrados influenciaram pouco no sabor.

Com base nesse trabalho, o concentrado protéico a ser usado em panificação deve ter solubilidade baixa e estar livre de componentes de baixo peso molecular. Grandes quantidades de proteína solúvel são prejudiciais à massa, sendo desejável a solubilidade relativamente baixa, para que o material inerte não exceda a 10 ou 12%. A redução de RNA é um passo importante, tanto do ponto de vista nutricional como funcional. A remoção da parede não foi considerada importante, devendo ser realizada apenas se a aplicação tecnológica do concentrado assim o exigir.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. MATERIAL

#### 1.1. MATÉRIA PRIMA

Foi utilizada levedura seca (*Saccharomyces* spp.), resultante da produção de álcool, fornecida pela Usina Santa Luiza, de Matão, SP.

A farinha de trigo utilizada foi uma mistura (1:1) de farinha comum e especial, fornecida pelos Moinhos Anhanguera, Campinas, SP.

#### 1.2. REAGENTES

Foram utilizados reagentes com o grau de pureza requerido pelos métodos de análise empregados.

#### 1.3. APARELHOS E EQUIPAMENTOS

Além da vidraria e instrumentação comuns de laboratório, foram também utilizados os seguintes equipamentos:

- . Balança semi analítica Mettler P1200
- . Balança analítica Bosch S2000
- . pHmetro Metrohm Herisau E516 Titriskop
- . Espectrofotômetro Milton Roy Company mod. Spectronic 20
- . Espectrofotômetro Carl Zeiss, com monocromador M4QIII, indicador PMQII e demais acessórios para absorção atômica
- . Estufa com circulação mecânica Fanem mod. 320-SE
- . Centrífuga Fanem mod. 204N

- . Centrífuga refrigerada Fanem mod. FR22
- . Agitador magnético com aquecimento Tecnal
- . Agitador de tubos Brabender
- . Farinógrafo Brabender
- . Extensígrafo Brabender
- . Viscoamilógrafo Brabender
- . Maturógrafo Brabender
- . Moinho Brabender Quadromatic Senior
- . Moinho para grãos Tecnal TE020
- . Mufla Engro mod. 355L
- . Banho Maria Fanem mod. 145
- . Liofilizador Stokes
- . Autoanalisador de aminoácidos Technicon TSM
- . Digestor de proteínas Technicon mod. BD-40
- . Destilador de proteínas Tecnal
- . Ultrassom Branson mod. B-12
- . Forno elétrico doméstico Layr
- . Liquidificador doméstico Walita
- . Bloco digestor com sistema de refluxo Tecnal TE046 GG/50
- . Planímetro MaHo

## 2. MÉTODOS

### 2.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal foi determinada nas amostras de levedura original e tratada, farinha de trigo e pão.

As determinações de umidade, cinzas e proteínas foram feitas segundo os métodos da AACC 44.15A, 08.01 e 46.12, respectivamente, e a determinação de gordura, segundo BLIGH & DYER (1959). A determinação de fibras foi feita de acordo com o método proposto por KAMER & GINKEL (1952), com a seguinte modificação: a titulação de óxido-redução do método original foi substituída por uma determinação gravimétrica. A amostra digerida foi filtrada em cadinho com fundo sinterizado, lavada com água quente e pesada após secagem a 105 °C por 3-4 horas. O teor de carboidratos foi calculado por diferença.

### 2.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

O teor de ácidos nucleicos foi determinado na levedura original e na levedura tratada. A determinação de ácidos nucleicos foi feita pela quantificação do fósforo e da ribose presentes em sua estrutura. Em ambos os casos, a relação entre fósforo ou ribose e o teor de ácidos nucleicos foi baseada em curva padrão estabelecida com amostra de RNA puro.

### 2.2.1. Dosagem de fósforo:

O método utilizado para determinação de fósforo foi o método oficial da Associação de Saúde Pública Americana (TARAS, 1971). O teor de fósforo foi determinado após digestão da amostra (200 mg) com ácido sulfúrico concentrado (3 ml), sob aquecimento por 1 hora a 170 °C e 3 horas a 350 °C. Após a neutralização com NaOH (50% p/v), o volume foi completado a 25 ml com água destilada e uma alíquota (1 ml) dessa solução foi misturada com 4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e água, 1:25). A seguir, foram adicionados 2,5 ml de uma mistura (1:1) dos reagentes molibdato de amônio (80 g/l de água destilada) e metavanadato de amônio (4 g/l de HCl 5M). Após 30 minutos de repouso, foi feita a leitura da absorbância a 470 nm e o valor comparado com uma curva padrão previamente construída com K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro.

### 2.2.2. Dosagem de ribose:

Utilizou-se a reação com fenol-ácido sulfúrico para determinação da ribose (leitura da absorbância a 480 nm para pentoses), de acordo com o procedimento descrito por DUBOIS et alii (1956).

### 2.3. DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

A determinação de minerais foi feita por espectroscopia de absorção atômica, segundo o método 2.096 da AOAC. Os minerais foram determinados nas cinzas das leveduras com e sem tratamento, ambas incineradas a 550 °C por aproximadamente 4 horas. A seguir, as cinzas foram solubilizadas com HCl concentrado e o diluídas em água destilada. Foram determinados os teores de cálcio, magnésio, manganês e cobre, pela leitura da absorbância a 422,7, 285,2, 279,4 e 324,7 nm, respectivamente.

### 2.4. DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS

A determinação de vitaminas do complexo B (vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, niacina e biotina) foi realizada no Laboratório de Análise de Vitaminas da Companhia NESTLÉ, seguindo os métodos da Associação dos Químicos de Vitaminas (1966), com algumas adaptações. As vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram determinadas por método químico (fluorimétrico) e as demais por método microbiológico, utilizando os microorganismos *S. carlsbergensis* (vit B<sub>6</sub>), *L. leichmannii* (vit B<sub>12</sub>) e *L. arabinosus* (niacina e biotina).

### 2.5. DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

As determinações de aminoácidos das amostras de levedura original e tratada foram realizadas em autoanalisador TSM da Technicon, por cromatografia em resina de troca iônica. O triptofa-

no foi quantificado separadamente, segundo o método de SPIES (1967).

A mesma metodologia foi também utilizada para a determinação da composição em aminoácidos das amostras de pão com 0, 2, 5 e 10 % de levedura tratada, porém nestas amostras não foram realizadas as quantificações de triptofano.

## 2.6. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE NO PÃO

A secagem do pão foi realizada em 2 estágios, baseando-se no método AACC 44.15A, no qual foram introduzidas algumas modificações. Os pães foram cortados em fatias de aproximadamente 1 cm e mantidos por uma noite a 40-45 °C em estufa. A seguir, as fatias foram trituradas grosseiramente em almofariz, passadas no moinho de laboratório, secas a 105 °C por 4 horas e pesadas.

## 2.7. DETERMINAÇÃO DE CLORETO

A determinação de cloreto foi realizada apenas na amostra de levedura tratada pelo método enzimático. Usou-se o tradicional método de MOHR (1856), que quantifica o íon cloreto através da titulação com  $\text{AgNO}_3$ .

## 2.8. METODOLOGIA USADA PARA REMOÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Foram utilizados três métodos para a redução do teor de RNA das células de levedura. Além dos tratamentos químico e enzimático, descritos a seguir, foram previamente testadas duas formas físicas de desintegração das células. Não dispondo de um desintegrador específico para o rompimento de células microbianas, como os citados na literatura por CURRIE *et alii* (1972), HEDENSKOG & MOGREN (1973), MOGREN *et alii* (1973) e GUZMÁN-JUÁREZ & HUDSON (1978), foi estudada a possibilidade de tratamento das suspensões de células em liquidificador doméstico e em ultrassom. Após a desintegração, que não resultou eficiente, seguiu-se a separação dos ácidos nucleicos através da precipitação das proteínas.

### 2.8.1. Tratamento Químico:

A remoção dos ácidos nucleicos através de tratamento químico é baseada na degradação da parede celular das leveduras pelo detergente lauril sulfato de sódio (LSS). O procedimento adotado foi descrito por GUNSALUS (1959).

A uma amostra de 8 g de células de levedura foram adicionados, lentamente, 8 ml de solução 0,01M de citrato de sódio. Após homogeneização da dispersão, foram adicionados 80 ml de LSS a 15% em solução de NaCl 0,14M, seguido de agitação enérgica por 1 hora à temperatura ambiente. A precipitação das proteínas foi realizada pela adição de 2 volumes de 176 ml de etanol absoluto,

com agitação, seguida de repouso de aproximadamente 12 horas a 4°C. Separou-se o precipitado, lavando-o 2 vezes seguidas com água.

O fluxograma do Quadro 1 mostra o método químico para remoção dos ácidos nucleicos da levedura.

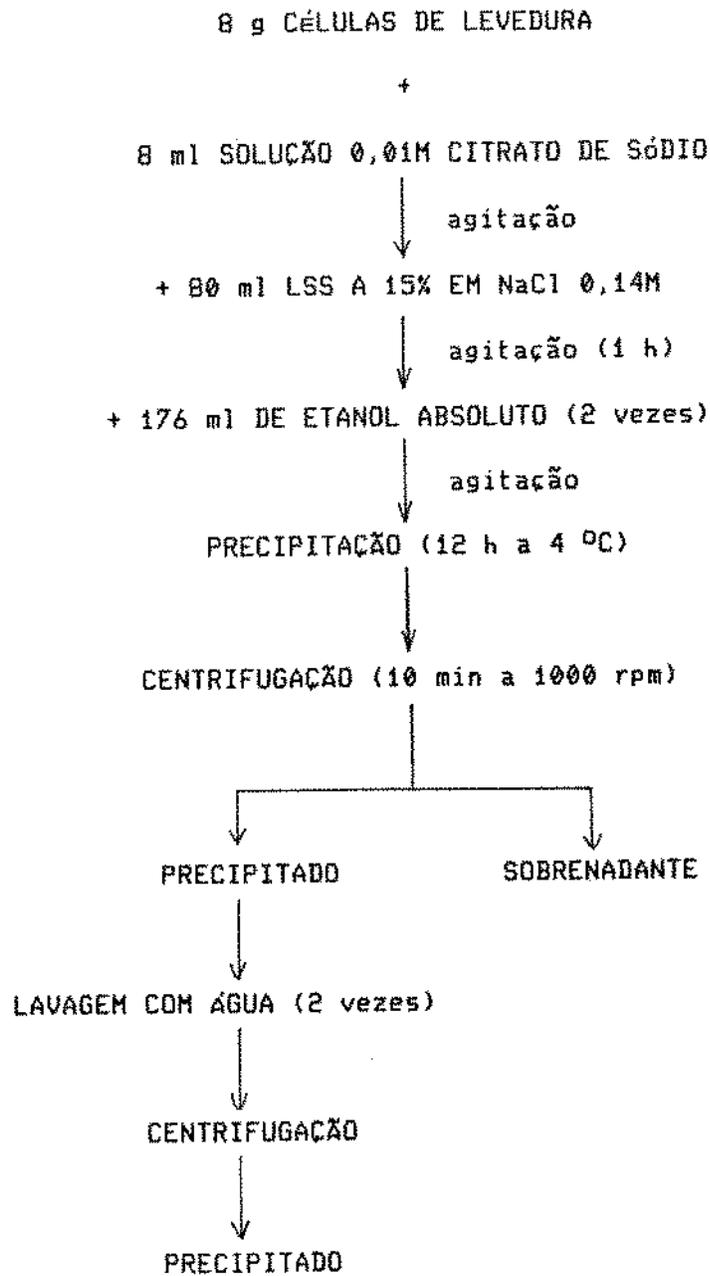
### 2.8.2. Tratamento Enzimático:

O método enzimático de remoção dos ácidos nucleicos é baseado na liberação e/ou ativação das ribonucleases (RNases) endógenas das células de levedura, através da incubação de uma suspensão de células em condições pré-determinadas de tempo e temperatura.

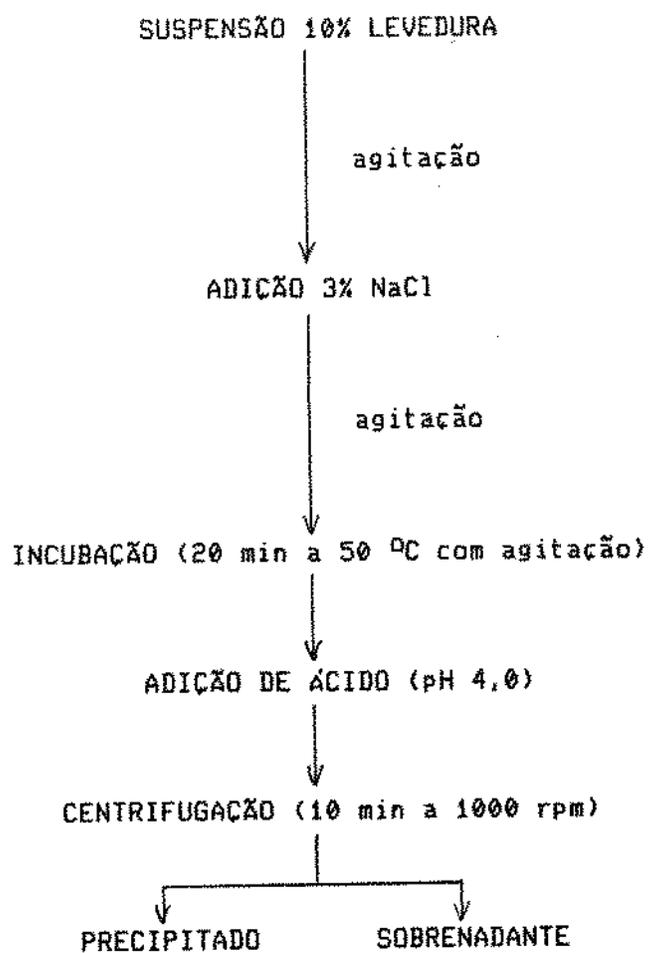
Foi seguido o método de LINDBLOM & MÖGREN (1974), onde foi primeiramente incubada uma suspensão de leveduras a 10% de sólidos, na presença de 3% de NaCl, à temperatura de 50 °C por 20 minutos. A seguir, o pH foi ajustado a 4,0 com adição de ácido e o precipitado separado por centrifugação. Este método foi repetido usando-se uma amostra sem adição de sal e outra sem o abaixamento de pH. Os precipitados obtidos nos 3 procedimentos foram secos em estufa e analisados com relação ao seu teor de proteínas e RNA.

No Quadro 2 encontra-se o esquema deste processo.

QUADRO 1 - MÉTODO QUÍMICO PARA REMOÇÃO DOS  
ÁCIDOS NUCLEICOS DA LEVEDURA



QUADRO 2 - MÉTODO ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DOS  
ÁCIDOS NUCLEICOS DA LEVEDURA



## 2.9. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA MASSA:

As massas produzidas com diferentes níveis de adição (0, 2, 5 e 10%) de levedura tratada e seca foram analisadas pelos testes do Farinógrafo, Extensógrafo, Viscoamilógrafo e Maturógrafo.

### 2.9.1. Farinógrafo:

O método AACC 54.21 foi usado para determinação das propriedades farinográficas. Os parâmetros usados para a avaliação dos resultados foram os seguintes:

- ABSORÇÃO DE ÁGUA: quantidade de água adicionada necessária para que a massa alcance consistência de 500 UF (unidades farinográficas) em seu máximo desenvolvimento (curva centralizada em 500 UF).
- TEMPO DE CHEGADA: tempo (minutos) desde o início até que o topo da curva chegue à linha das 500 UF.
- TEMPO DE DESENVOLVIMENTO: tempo (min) desde o início até que a curva alcance o valor máximo de consistência, medido imediatamente antes do primeiro sinal de enfraquecimento.
- TEMPO DE SAÍDA: tempo (min) desde o início até que o topo da curva deixe a linha das 500 UF.
- ESTABILIDADE: diferença (min) entre o ponto onde o topo da curva cruza a linha das 500 UF e o ponto onde ele a abandona. É a diferença entre o tempo de saída e o tempo de chegada.

- INDICE DE TOLERÂNCIA À MISTURA: diferença (em UF) entre o topo da curva no pico de consistência até o topo da curva medido 5 min após o pico.
- D-20: diferença (UF) entre a linha das 500 UF e a altura da curva (medida no centro) após 20 minutos de mistura).

### 2.9.2. Extensógrafo:

Realizado segundo o método AACC 54.10. Os parâmetros usados na avaliação dos resultados foram:

- ÁREA OU ENERGIA (A): área total sob a curva (cm<sup>2</sup>), medida com planímetro.
- EXTENSIBILIDADE (E): comprimento (mm) total da curva.
- RESISTÊNCIA À EXTENSÃO OU ELASTICIDADE (R): altura da curva, em UE (unidades extensigráficas), 50 mm após o seu início.
- RESISTÊNCIA MÁXIMA: altura (UE) máxima da curva.
- NÚMERO PROPORCIONAL: relação entre a resistência à extensão e a extensibilidade da massa (R/E).
- OXYNUMBER: definido como (AxE)/R, dá uma idéia das exigências de oxidação das massas; se for alto indica reação positiva à adição de agentes oxidantes e vice-versa.

### 2.9.3. Viscoamilógrafo:

Uma suspensão contendo 80 g de farinha e 450 ml de água destilada foi colocada no copo do Viscoamilógrafo e aquecida desde 25 até 95 °C, com agitação, a uma taxa de 1,5 °C/min. Manteve-

se a temperatura de 95 °C por 20 min e depois foi ligado o sistema de resfriamento, até que a suspensão atingisse 50 °C. Os parâmetros amilográficos foram determinados conforme descrito por MAZURS *et alii* (1957) e foram os seguintes:

- TEMPERATURA INICIAL DE GELATINIZAÇÃO: temperatura (°C) correspondente ao ponto onde se observa o início (10 UA) do aumento de viscosidade.
- TEMPERATURA DE VISCOSIDADE MÁXIMA: temperatura (°C) durante o aquecimento, correspondente ao ponto mais alto da curva.
- FAIXA DE GELATINIZAÇÃO: diferença (°C) entre a temperatura de viscosidade máxima e a temperatura inicial de gelatinização.
- VISCOSIDADE MÁXIMA: valor da viscosidade, em UA (unidades amilográficas), no ponto mais alto da curva.
- VISCOSIDADE MÍNIMA À TEMPERATURA CONSTANTE: valor mínimo da viscosidade (UA) após ter sido atingida a temperatura constante de 95 °C.
- VISCOSIDADE MÁXIMA NO CICLO DE RESFRIAMENTO: valor máximo de viscosidade (UA) alcançado durante o ciclo de resfriamento, ou seja, a viscosidade a 50 °C.

#### 2.9.4. Maturógrafo:

Este teste mede o comportamento da massa durante a fermentação final, determinando o seu tempo ideal. A massa é colocada sob um pistão em uma cabine de fermentação e o aumento de volume é registrado, bem como a sua diminuição, quando submetida à pressão pelo pistão; este ciclo se repete a cada 2 minutos, até

que a curva alcance o pico máximo, desligando-se o aparelho ao verificar a primeira queda.

A preparação da massa para o teste foi feita do seguinte modo: fez-se uma massa com farinha (300 g a 14% de umidade), 3% de fermento, 2% de sal e água suficiente para atingir 500 UF, cessando a mistura no ponto de desenvolvimento máximo. Foram cortados 2 pedaços de 155g, boleados e levados a fermentar na cabine do maturógrafo (30 °C, 85% de umidade relativa) durante 35 minutos. Repetiu-se o boleamento, seguido de mais 15 min de descanso, novo boleamento e novo descanso de 30 min. As massas, ajustadas a 150g, foram a seguir boleadas e colocadas nos recipientes apropriados, pressionadas e inseridas sob os pistões do equipamento para dar início ao teste.

A avaliação dos resultados se fez com base nos seguintes parâmetros:

- TEMPO DE DESCANSO FINAL: tempo (min) desde o início até a primeira queda.
- ESTABILIDADE DE FERMENTAÇÃO: tempo (min) durante o qual a massa apresenta volume máximo, medido com régua apropriada.
- NÍVEL DE MASSA: altura do pico em UM (unidades maturográficas).
- ELASTICIDADE: diferença (UM) entre as partes da curva registradas sob pressão e sem pressão.

#### 2.10. TESTE DE PANIFICAÇÃO

A qualidade dos pães produzidos com a adição de 0, 2, 5 e 10 % de levedura seca foi avaliada pelo teste de panificação de

EL-DASH (1978), onde a absorção de água e o tempo de mistura são determinados instrumentalmente.

A formulação básica utilizada foi:

Farinha	100 %
Gordura	3 %
Fermento	3 %
Açúcar	5 %
Sal	2 %
Vitamina C	90 ppm
Água	suficiente para obter 500 UF

A levedura seca foi adicionada em níveis de 0, 2, 5 e 10%, descontados dos 100% de farinha considerados na formulação padrão. As quantidades dos demais ingredientes foram calculadas sobre 300 g de farinha, na base de 14% de umidade. O sal foi calculado descontando-se o sal residual da levedura seca, obtida após o processo de remoção dos ácidos nucleicos.

O procedimento usado sofreu pequenas alterações em relação à referência citada. A farinha foi colocada na caixa misturadora do farinógrafo e misturada por 5 min a 31,5 rpm, para homogeneizar a amostra à temperatura de 30 °C. O sal, açúcar e vitamina C foram dissolvidos em água a 30 °C. O fermento foi disperso em água separadamente. Essas soluções, o restante da água e a gordura (nessa ordem) foram adicionados à farinha em até 30 seg, após se ter aumentado a velocidade do misturador (63 rpm) e ligado o registrador do gráfico. A massa foi misturada até que se ve-

rificasse uma queda de 10 UF em relação ao pico de desenvolvimento. Depois foi retirada do misturador, cortada em 2 pedaços de 175 g, boleada e moldada na unidade modeladora do extensígrafo. Foi a seguir fermentada na câmara do extensígrafo por 90 min a 30 °C, dentro de formas retangulares de alumínio, previamente untadas com gordura, e assadas a 220 °C por 20 minutos.

O pão produzido pelo teste instrumental de panificação, depois de resfriado, foi submetido à determinação de volume, à avaliação das suas características externas e internas, além da avaliação do seu sabor e aroma. O Quadro 3 mostra os parâmetros avaliados e suas notas máximas, totalizando 100 pontos.

Os parâmetros de avaliação foram:

#### Características externas do pão:

- VOLUME: deve ser o maior possível, sem prejudicar as demais características. É medido pelo deslocamento de sementes (painço) num determinado recipiente. A nota máxima é 20 pontos, obtida pela multiplicação entre o volume específico (volume/massa) do pão e 3,33, considerando que um volume específico ideal seria de 6 ml/g.
- COR DA CROSTA: deve ser dourada, brilhante, nem clara nem escura demais, o mais homogênea possível.
- QUEBRA: é uma medida de quanto o pão "abre" nas laterais, com o aumento de volume. Deve ser razoável em tamanho e uniforme.
- SIMETRIA: deve haver simetria transversal e longitudinal.

#### Características internas:

- CARACTERÍSTICA INTERNA DA CROSTA: não deve ser muito grossa nem muito fina, nem muito fechada nem muito aberta. Deve ser regular, nem muito quebradiça nem muito "borrachenta".
- COR DO MIOLO: deve ser uniforme, branca e brilhante.
- ESTRUTURA DA CÉLULA DO MIOLO: as células devem ser alongadas e uniformes por toda a superfície, nem excessivamente abertas nem fechadas demais.
- TEXTURA DO MIOLO: deve ser sedosa e aveludada, uniforme e não áspera.

#### Aroma e gosto:

- AROMA: deve ter intensidade razoável e ser compatível com o produto.
- GOSTO: deve ser agradável e compatível com o produto, não deve ácido ou cru.

### 2.11. MÉTODO PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL

A análise sensorial dos pães produzidos com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada foi feita no Laboratório de Análise Sensorial da FEA, por uma equipe de 30 provadores adultos, aleatoriamente escolhidos. Foi realizado um teste de preferência (comparação múltipla), sem repetição, usando escala hedônica de 9 pontos, onde (1) representava "desgostei muitíssimo" e (9), "gostei muitíssimo". A ficha utilizada para a análise pode ser visualizada no Quadro 4.

Os pães produzidos em laboratório foram cortados em fatias de aproximadamente 1 cm, desprezando-se as pontas. Cada fatia, cortada no sentido de seu eixo vertical, forneceu 2 pedaços simétricos.

Foram apresentadas aos provadores 4 amostras em pratos codificados, cuja ordenação foi aleatória e igual para todos os provadores. Os testes foram realizados em cabines individuais e sob luz vermelha, para minimizar as diferenças de cor entre as amostras.

Foi aplicado o teste de comparação múltipla para a determinação de preferência, sendo depois feita a análise de variância dos resultados obtidos.

QUADRO 3 - TESTE INSTRUMENTAL DE PANIFICAÇÃO

	VALOR MÁXIMO
<b>CARACTERÍSTICAS EXTERNAS</b>	
VOLUME (vol. esp. x 3,33)	20
COR DA CROSTA	10
QUEBRA	5
SIMETRIA	5
<b>CARACTERÍSTICAS INTERNAS</b>	
CARACT. DA CROSTA	5
COR DO MIOLO	10
ESTRUTURA DO MIOLO	10
TEXTURA DO MIOLO	10
<b>AROMA E GOSTO</b>	
AROMA	10
GOSTO	15
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>

QUADRO 4 - FICHA PARA ANÁLISE SENSORIAL DOS PÃES

TESTE DE PREFERÊNCIA

PRODUTO:

NOME:

DATA:

Você irá receber 4 amostras para provar e deverá dar sua opinião, usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou de cada uma.

AMOSTRA Nº	AMOSTRA Nº	AMOSTRA Nº	AMOSTRA Nº
gostei	gostei	gostei	gostei
muitíssimo	muitíssimo	muitíssimo	muitíssimo
desgostei	desgostei	desgostei	desgostei
muitíssimo	muitíssimo	muitíssimo	muitíssimo

COMENTÁRIOS:

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA REDUÇÃO DO TEOR DE RNA DA LEVEDURA ORIGINAL

Para a remoção dos ácidos nucleicos da levedura original foram testados dois métodos, um químico e outro enzimático.

#### 1.1. TRATAMENTO QUÍMICO

Após o tratamento químico para remoção dos ácidos nucleicos, o material foi seco e analisado. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal e o conteúdo de ácidos nucleicos da levedura original e da levedura tratada pelo método químico.

Os resultados da determinação de ácidos nucleicos foram baseados na quantificação de fósforo, pois o método de quantificação de ribose apresentou resultados inconsistentes. O teor de RNA encontrado está dentro da faixa citada na literatura (MATELES & TANNENBAUM, 1968; ROSALES, 1984) para células de microorganismos, que varia de 6 a 16 %.

Segundo MATELES & TANNENBAUM (1968), o valor obtido da porcentagem de nitrogênio total multiplicada pelo fator 6,25, não expressa a porcentagem real de proteína na amostra de levedura, uma vez que cerca de 20 % desse nitrogênio não está constituindo estruturas de aminoácidos. Apesar da porcentagem real de proteína ser inferior ao valor encontrado, sua quantidade na levedura original é considerável.

O tratamento químico para redução do teor de ácidos nucleicos causou alteração nas proporções entre os componentes da levedura. Notou-se uma redução de aproximadamente 33% no teor de proteínas, que se deve possivelmente ao arraste de proteínas solúveis durante o tratamento e, principalmente, à retirada dos ácidos nucleicos que, diminuindo o nitrogênio total, refletiu no cálculo final da porcentagem de proteína.

O método químico propiciou uma considerável redução no teor de ácidos nucleicos das células, de cerca de 37 %. Entretanto apresentou uma séria limitação com relação ao produto resultante, no qual se observou a presença de resíduos do detergente utilizado no tratamento, mesmo após as 2 etapas de lavagem com água realizadas ao final do processo. Esse resíduo conferiu ao material gosto estranho e a capacidade de formação de espuma ao ser agitado em suspensão. Essas características indesejáveis na levedura tratada enzimaticamente tornaram inviável o seu uso para fins alimentícios.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DE RNA DAS LEVEDURAS ORIGINAL  
E TRATADAS PELOS MÉTODOS QUÍMICO E ENZIMÁTICO (% b.s.)

	LEVEDURA	LEVEDURA TRATADA	
	ORIGINAL	MÉT. QUÍMICO	MÉT. ENZIMÁTICO
PROTEÍNA (Nx6,25)	38,97	25,81	25,94
GORDURA	1,69	1,86	2,02
CINZAS	5,14	2,27	10,01
FIBRAS	0,62	0,95	0,60
CARBOIDRATOS*	53,58	69,11	61,43
RNA**	8,56	5,38	6,20

(\*) calculado por diferença

(\*\*) resultados baseados na dosagem de fósforo

## 1.2. TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Nos testes preliminares, os produtos resultantes dos tratamentos enzimáticos com ou sem a etapa de ajuste de pH, foram analisados quanto aos teores de proteínas e RNA. Concluiu-se que o método enzimático pode ser realizado suprimindo-se a etapa de ajuste de pH, sem afetar os resultados finais. Ao contrário, a etapa de adição de sal foi mantida, porque mostrou ser fundamental na redução dos ácidos nucleicos presentes na levedura.

Na Tabela 1 está mostrada a composição centesimal e de RNA da levedura original e da levedura tratada pelo método enzimático. Os resultados foram similares aos obtidos para a levedura tratada pelo método químico, comentados no item anterior. Apenas o teor de cinzas encontrado para a levedura tratada pelo método enzimático foi bem mais alto em relação ao da levedura original. Constatou-se que esse valor elevado foi devido ao sal adicionado nesse tratamento, que resultou em 8,45% (b.s.) de cloreto na amostra. A redução no teor de ácidos nucleicos obtida por esse tratamento foi de 27,6%.

Entre os métodos testados para redução dos ácidos nucleicos, este processo foi considerado o melhor, pela facilidade de execução e pelas características do produto final. O produto obtido por meio desse tratamento apresentou coloração mais escura, granulometria maior e aroma menos acentuado em relação à levedura original. Desta forma, a levedura tratada pelo método enzimático foi utilizada nos experimentos subsequentes que objetivaram investigar a possibilidade de sua utilização em panificação.

## 2. EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO NO CONTEÚDO DE VITAMINAS, MINERAIS E AMINOÁCIDOS DA LEVEDURA ORIGINAL

### 2.1. CONTEÚDO DE VITAMINAS

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de conteúdo de vitaminas do complexo B das leveduras original e tratada pelo método enzimático.

A levedura original apresentou valores de vitamina B<sub>1</sub> e biotina na faixa citada na literatura (TEIXEIRA *et alii*, 1960; WASLIEN, 1975; SARWAR *et alii*, 1985), porém os conteúdos de vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e niacina foram inferiores aos valores encontrados. Não foi detectada vitamina B<sub>12</sub>, o que está de acordo com o observado por PYLER (1973) de que esta substância, quando presente, se encontra em quantidades muito pequenas nas células de levedura.

Pode-se observar pela Tabela 2 que o tratamento enzimático diminuiu consideravelmente (3 a 4 vezes) o conteúdo de vitaminas da levedura tratada em relação à original, com exceção da biotina, que foi totalmente preservada. Acredita-se que as vitaminas quantificadas não foram afetadas pelo pH do tratamento enzimático, que foi de aproximadamente 5,6. Por outro lado, o aquecimento realizado poderia ter afetado o conteúdo de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e biotina (HARRIS, 1971). No entanto, verificou-se uma redução no conteúdo de niacina, o que certamente não foi decorrente da temperatura do processo, visto que as condições de aquecimento utilizadas foram brandas e também pelo fato dessa vitamina ser

estável ao calor. Isto sugeriu a hipótese das vitaminas aquossolúveis terem sido solubilizadas no meio aquoso durante a incubação e arrastadas no sobrenadante durante a posterior centrifugação. Este fato tem sido verificado na cocção de alimentos, principalmente de vegetais, onde as vitaminas aquossolúveis são arrastadas na água de cocção (HARRIS & LEVENBERG, 1971).

## 2.2. CONTEÚDO DE MINERAIS

Foram determinados os conteúdos de cálcio, magnésio, cobre e manganês nas amostras das leveduras original e tratada (Tabela 3).

A levedura original apresentou teores de cálcio, manganês e magnésio dentro da faixa encontrada na literatura (WASLIEN, 1975; SARWAR *et alii*, 1985), enquanto o teor de cobre foi superior.

O tratamento enzimático da levedura causou redução de cerca de 2 a 4 vezes no teor desses minerais, o que pode também ser explicado pelo arraste desses componentes no sobrenadante obtido após a centrifugação. Segundo TANNENBAUM (1976), o arraste é a maior causa de perda de minerais em vegetais, onde têm sido encontrados em grande quantidade na água de cocção (HARRIS & LEVENBERG, 1971).

### 2.3. COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS

A influência do tratamento enzimático na composição em aminoácidos da levedura pode ser vista na Tabela 4. Observa-se que a levedura original apresentou resultados semelhantes aos citados na literatura (KIHLBERG, 1972; MARTINI *et alii*, 1979; SARWAR *et alii*, 1985).

É importante que se note que as quantidades de aminoácidos da levedura aumentaram com o tratamento enzimático, uma vez que, com a retirada de parte dos ácidos nucleicos, os aminoácidos passaram a representar uma maior porcentagem do nitrogênio total.

Comparando com a proteína de referência (JOINT FAO/WHO, 1973) e calculando-se o escore químico dos aminoácidos essenciais (Tabela 5), observa-se que, tanto na levedura original como na tratada, os aminoácidos limitantes foram metionina e cistina, enquanto que a lisina obteve o maior escore químico.

É conhecido que o trigo e os produtos de panificação são normalmente deficientes em lisina. Portanto, a adição da levedura tratada na farinha de trigo para uso em panificação é bastante desejável, no sentido de enriquecer com lisina os produtos finais. Tal complementação tem sido sugerida por alguns autores como LINDBLOM (1977b), YAÑEZ *et alii* (1973, 1974) e KIHLBERG (1972).

TABELA 2 - CONTEÚDO DE VITAMINAS DAS LEVEDURAS ORIGINAL E TRATADA  
ENZIMATICAMENTE (mg / 100g amostra)

	LEVEDURA ORIGINAL	LEVEDURA TRATADA
B <sub>1</sub>	5,1	1,4
B <sub>2</sub>	1,9	0,75
B <sub>6</sub>	1,6	0,4
B <sub>12</sub>	-	-
NIACINA	13,4	4,0
BIOTINA	0,08	0,08

(-): não detectável

TABELA 3 - CONTEÚDO DE MINERAIS DAS LEVEDURAS ORIGINAL E TRATADA  
ENZIMATICAMENTE (mg / 100 g amostra)

	LEVEDURA ORIGINAL	LEVEDURA TRATADA
CÁLCIO	18,93	4,85
MAGNÉSIO	177,00	64,41
COBRE	4,26	2,80
MANGANÊS	3,04	0,66

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS LEVEDURAS ORIGINAL E TRATADA ENZIMATICAMENTE (mg de aa/16 g de N)

	LEVEDURA ORIGINAL	LEVEDURA TRATADA
ARG	3,64	5,55
HIS	1,03	3,28
LYS	6,39	9,37
TYR	3,16	3,70
PHE	3,57	4,70
CYS	-	-
MET	0,98	1,54
THR	3,98	4,43
LEU	5,59	8,64
ILE	3,98	5,94
VAL	4,72	8,06
TRP	1,11	1,23
ASP	7,29	10,64
SER	4,34	6,32
GLU	7,65	9,29
PRO	3,31	4,70
GLY	3,44	4,70
ALA	5,13	7,05

(-): não detectável

TABELA 5 - ESCORE QUÍMICO\* DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DAS  
LEVEDURAS ORIGINAL E TRATADA ENZIMATICAMENTE

	LEVEDURA ORIGINAL	LEVEDURA TRATADA
ILE	1,00	1,49
LEU	0,80	1,23
LYS	1,16	1,70
MET+CYS	0,28	0,44
PHE+TYR	1,12	1,40
THR	1,00	1,11
VAL	0,94	1,61
TRP	1,11	1,23

(\* calculado em relação à proteína de referência (JOINT FAO/WHO, 1973)

### 3. EFEITO DA ADIÇÃO DE LEVEDURA TRATADA NAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA MASSA

Foram estudadas as características de mistura, de extensão, de viscosidade e de fermentação de massas apresentando 2, 5 e 10% de levedura tratada, as quais foram comparadas com uma massa padrão sem aditivação.

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS DE MISTURA DA MASSA

As características de mistura de massas contendo 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada foram determinadas pelo teste do Farinógrafo. Os parâmetros medidos se encontram na Tabela 6 e as curvas farinográficas estão expostas na Figura 1.

Observou-se que as massas de farinha de trigo adicionada de níveis crescentes de levedura apresentaram valores também crescentes de absorção de água, mostrando que a levedura tem uma absorção específica maior que a da farinha de trigo. Isto se deve possivelmente ao alto teor de proteínas da levedura, visto que a quantidade de proteína tem sido apontada como o fator de grande influência na absorção de água de uma farinha (PRATT, 1978).

O tempo de chegada, que está relacionado com o tempo requerido para hidratação das partículas, praticamente não se alterou e o tempo de desenvolvimento aumentou com as quantidades crescentes de levedura, mostrando que sua presença aumentou a energia necessária para desenvolver a estrutura do gluten. O tempo de saída aumentou com a adição de 2% de levedura, diminuindo a

partir desse nível, o mesmo acontecendo com a estabilidade e o índice de tolerância mecânica a mistura. O D-20 aumentou com a adição de levedura.

A proteína da levedura, embora sem capacidade de formar gluten, interferiu no desenvolvimento do gluten da massa, tornando-a menos resistente ao esforço mecânico durante a mistura, nas massas com adição de levedura superior a 2%.

### 3.2. CARACTERÍSTICAS DE EXTENSÃO DA MASSA

As características de extensão de massas produzidas com 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada foram determinadas pelo teste do Extensígrafo e os valores obtidos se encontram na Tabela 7. As curvas extensigráficas encontram-se na Figura 2.

Tomando as curvas fornecidas pela massa sem levedura como padrão para comparação, a adição de 2% de levedura provocou um aumento da área, motivado tanto pelo aumento da extensibilidade como da resistência à extensão. A massa com 5% de levedura também obteve maior área, mas foi inferior à da massa com 2% , devido ao menor valor na extensibilidade. A massa com 10% de levedura apresentou redução ainda maior na extensibilidade, porém ocorreu o aumento da resistência à extensão, o que acarretou um valor numérico de área semelhante ao da massa padrão (sem levedura), embora com curvas totalmente diferentes. Assim, a energia requerida para estender e romper a massa padrão foi aproximadamente igual àquela exigida pela massa com adição de 10% de levedura, embora apresentassem características diferentes. A massa com 5% requereu maior

energia para ser rompida e a massa com 2%, um valor ainda superior.

Como tendência geral, observou-se que a adição de níveis crescentes de levedura causou o aumento da resistência à extensão e a diminuição da extensibilidade. Essa tendência ficou bem evidenciada pelo aumento do número proporcional.

Esses resultados mostraram que, com o aumento do teor de levedura, as massas tornaram-se mais elásticas, o que seria um bom resultado, se avaliado isoladamente, pois é um indicativo de que as massas têm maior capacidade de reter os gases produzidos na fermentação, sem sofrer colapso em sua estrutura. Entretanto é preciso lembrar que, com o aumento de levedura, também ocorreu uma queda na extensibilidade da massa, o que é indesejável, pois significa menor aumento de volume durante a fermentação. As massas com excesso de agentes oxidantes apresentam comportamento semelhante (PYLER, 1973).

### 3.3. CARACTERÍSTICAS DE VISCOSIDADE DA MASSA

Foram determinadas pelo teste do Viscoamilógrafo e os parâmetros medidos estão na Tabela 8. Na Figura 3 estão as curvas amilográficas da farinha com 0, 2, 5 e 10% de adição de levedura.

Como a levedura tem cerca de duas vezes mais proteína que a farinha de trigo, sua adição acarretou uma diluição do amido presente na farinha. Notou-se que a temperatura inicial de gelatinização e a temperatura de viscosidade máxima aumentaram e que a viscosidade máxima diminuiu com o aumento do teor de leve-

dura na massa. Estes resultados estão de acordo com ANKER & GEDDES (1944), que verificaram que um aumento na concentração de amido fazia aumentar a viscosidade máxima e diminuir a temperatura de gelatinização.

Segundo MAZURS *et alii* (1957), em uma pasta contendo apenas amido, a retrogradação é tanto maior quanto maior a concentração do amido em dispersão, ou seja, a diminuição na concentração de amido deve diminuir a viscosidade máxima da pasta no resfriamento. No entanto, em nosso estudo temos um sistema mais complexo, onde interagem outros componentes. Assim, a incorporação de 2 e 5% de levedura provocou uma maior retrogradação, observada pelo aumento da viscosidade máxima no resfriamento e tornou os grânulos de amido menos susceptíveis ao rompimento, visto que a viscosidade mínima à temperatura constante tendeu a aumentar.

#### 3.4. CARACTERÍSTICAS DE FERMENTAÇÃO DA MASSA

As características de fermentação da massa foram determinadas pelo teste do Maturógrafo e os resultados encontram-se na Tabela 9. As curvas maturográficas das massas com 0, 2, 5 e 10% de levedura estão mostradas na Figura 4.

Observou-se que o nível de massa é inversamente proporcional ao acréscimo de levedura, ou seja, o volume alcançado pelas massas fermentadas é tanto menor quanto mais levedura tratada foi incorporada à massa. No entanto, o tempo de fermentação ideal foi alcançado antes pelas massas com levedura, mostrando que sua

presença estimulou a taxa de fermentação, o que também foi observado por LAI *et alii* (1984).

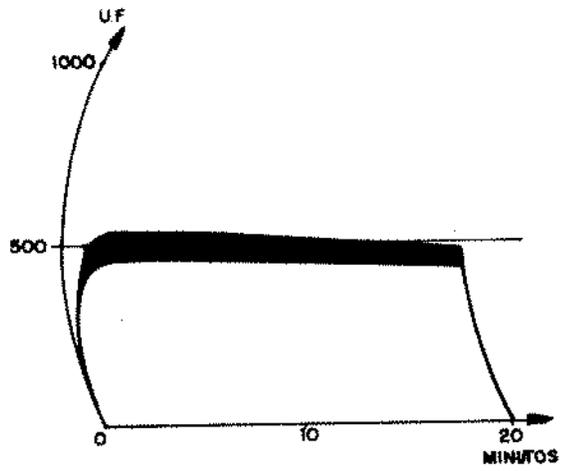
O aumento do volume da massa é resultado de 2 fatores, que são as capacidades de produzir e de reter os gases da fermentação. No momento em que a massa atinge o ponto mais alto da curva maturográfica é que se encontram as melhores características de aumento de volume. Depois do pico a produção e a retenção de gases decrescem, bem como a elasticidade da massa na fermentação. Notou-se que com teores mais altos de levedura (5 e 10%) a queda verificada na curva foi bastante suave, mantendo-se relativamente estável por um determinado período, enquanto que na massa padrão ou com 2% de levedura, a queda foi mais acentuada e contínua.

Considerando-se que a adição da levedura tratada aos níveis de 2, 5 e 10% aumentou a elasticidade em relação ao padrão (sem aditivação), conforme determinado no extensígrafo, pode-se verificar que essas massas apresentaram uma elasticidade inadequada para se alcançar um bom volume final, apesar da adição de levedura propiciar a aceleração do processo de fermentação.

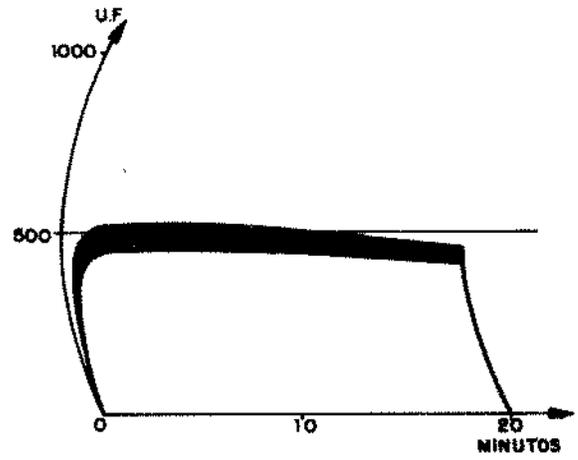
TABELA 6 - PARÂMETROS FARINOGRÁFICOS DAS MASSAS PRODUZIDAS COM  
LEVEDURA TRATADA ENZIMATICAMENTE

	LEVEDURA(%)			
	0	2	5	10
ABSORÇÃO (%)	58,7	59,6	61,3	64,3
TEMPO DE CHEGADA (min)	1,5	1,0	1,5	1,5
T DESENVOLVIMENTO (min)	2,5	5,0	7,5	7,5
TEMPO DE SAÍDA (min)	15,5	17,0	19,5	12,0
ESTABILIDADE (min)	14,0	16,0	12,0	10,5
IND. TOL. MECÂNICA (UF)	10	0	30	40
D-20 (UF)	40	50	60	80

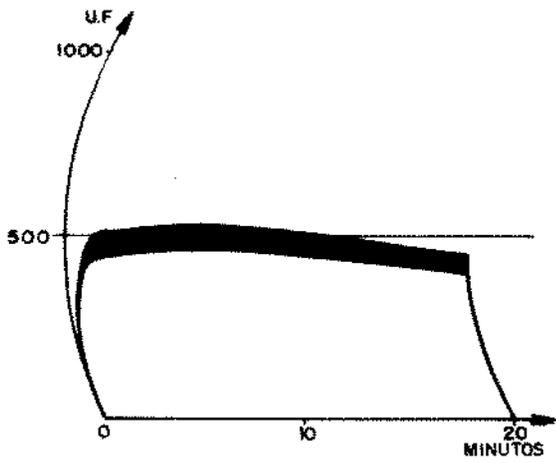
a)



b)



c)



d)

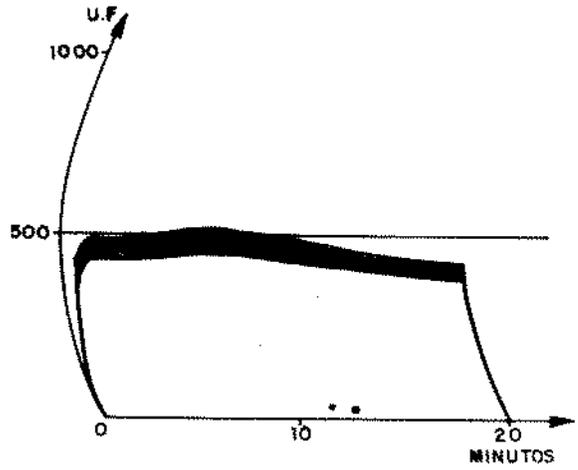


TABELA 7 - PARÂMETROS EXTENSIGRÁFICOS DAS MASSAS PRODUZIDAS COM LEVEDURA TRATADA ENZIMATICAMENTE

	LEVEDURA(%)					
	0			2		
	TEMPO DE DESCANSO					
	45'	90'	135'	45'	90'	135'
ÁREA (cm <sup>2</sup> )	109,3	106,6	117,4	138,7	140,1	133,1
ELASTICIDADE (UE)	300	340	330	370	400	390
EXTENSIBILIDADE (min)	182	170	183	192	180	177
RESIST. MÁXIMA (UE)	440	470	480	540	580	570
Nº PROPORCIONAL	1,65	2,00	1,80	1,93	2,22	2,20
OXYNUMBER	66,3	53,3	65,1	72,0	63,0	60,4

	LEVEDURA(%)					
	5			10		
	TEMPO DE DESCANSO					
	45'	90'	135'	45'	90'	135'
ÁREA (cm <sup>2</sup> )	123,5	113,8	116,8	105,1	108,2	110,2
ELASTICIDADE (UE)	390	380	410	420	450	480
EXTENSIBILIDADE (min)	173	161	155	147	142	143
RESIST. MÁXIMA (UE)	520	520	540	510	560	570
Nº PROPORCIONAL	2,25	2,36	2,65	2,86	3,17	3,36
OXYNUMBER	54,8	48,1	44,2	36,8	34,1	32,8

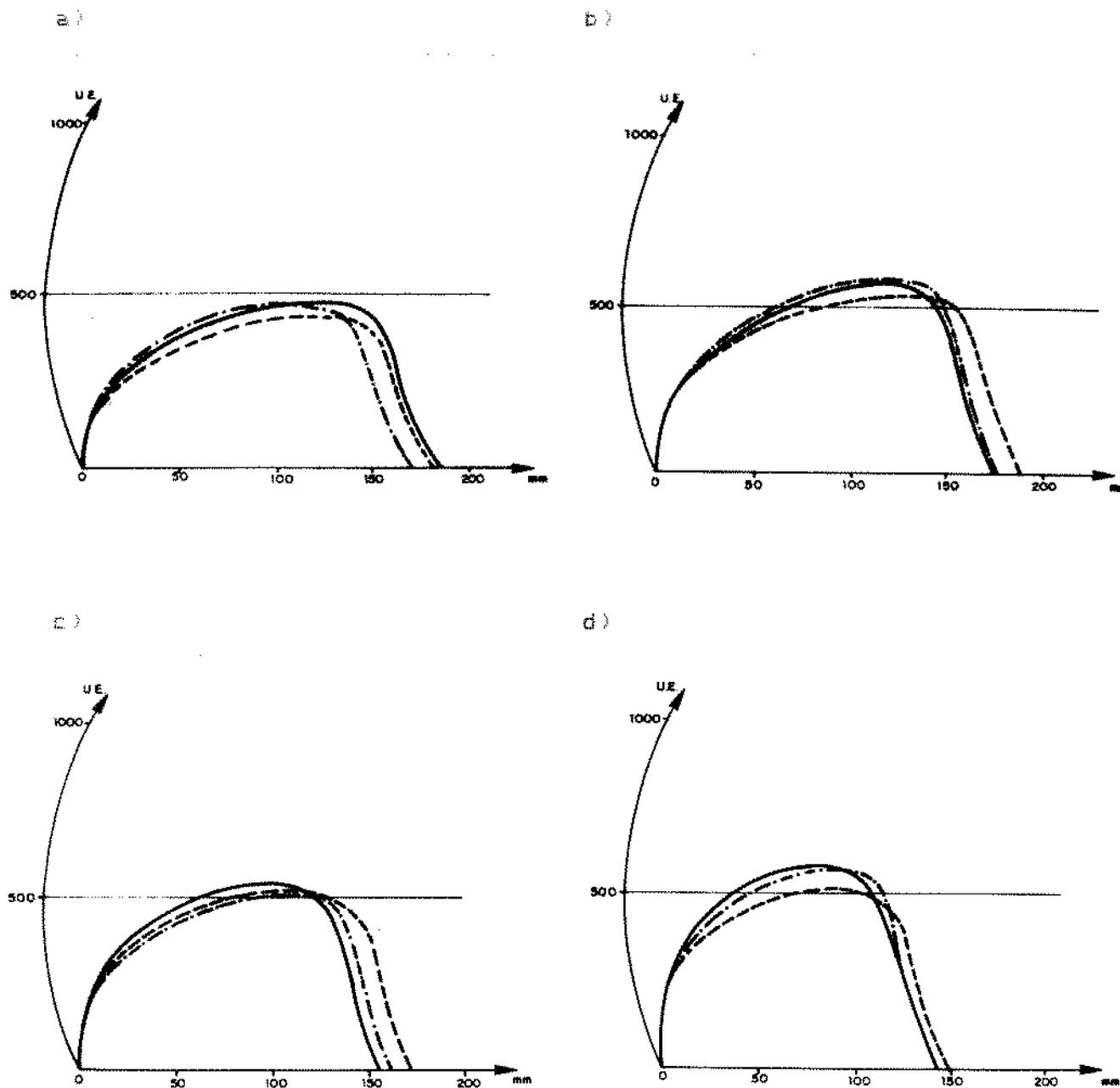


FIGURA 2 - CURVAS EXTENSIGRÁFICAS DAS MASSAS PRODUZIDAS COM

LEVEDURA TRATADA: a) 0% ; b) 2% ; c) 5% ; d) 10%

--- 45 minutos de descanso

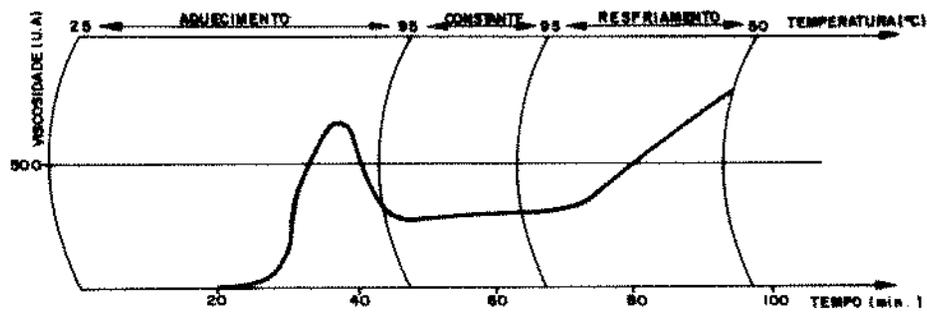
-.- 90 minutos de descanso

— 135 minutos de descanso

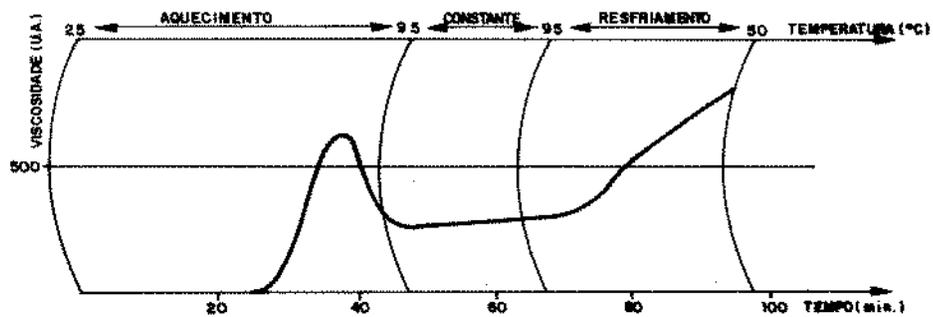
TABELA 8 - PARÂMETROS VISCOAMILOGRÁFICOS DAS MASSAS PRODUZIDAS  
COM LEVEDURA TRATADA ENZIMATICAMENTE

	LEVEDURA (%)			
	0	2	5	10
T. INICIAL GELATINIZAÇÃO (°C)	58,5	60,3	61,0	61,8
T. VISC. MÁXIMA (°C)	85,8	86,8	86,8	87,6
FAIXA GELATINIZAÇÃO (°C)	27,3	26,5	25,8	25,8
VISC. MÁXIMA (UA)	665	630	617	560
VISC. MÍNIMA À T CTE (UA)	287	285	295	345
VISC. MÁX. RESFRIAMENTO. (UA)	775	800	815	755

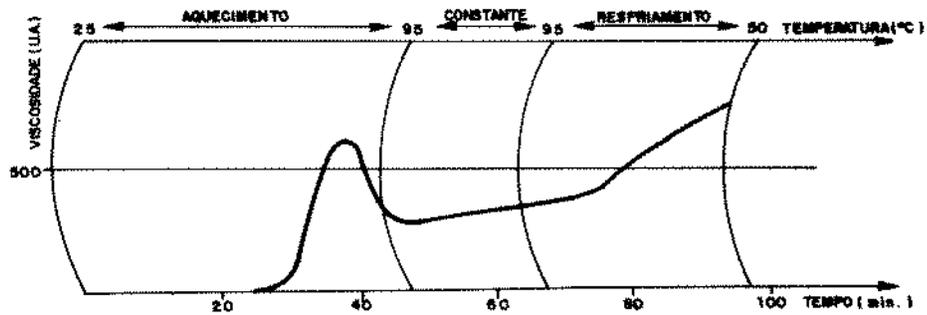
b)



b)



c)



d)

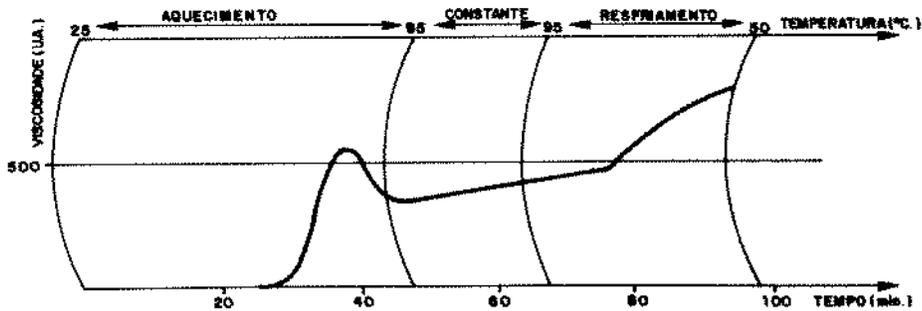
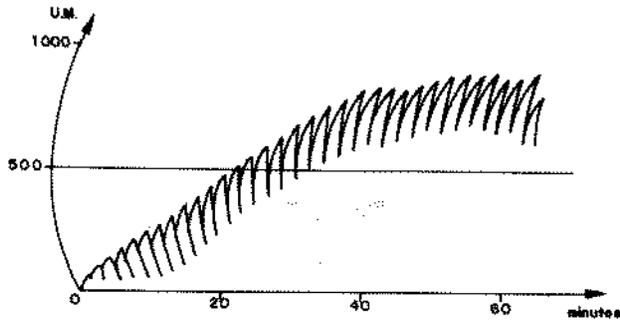


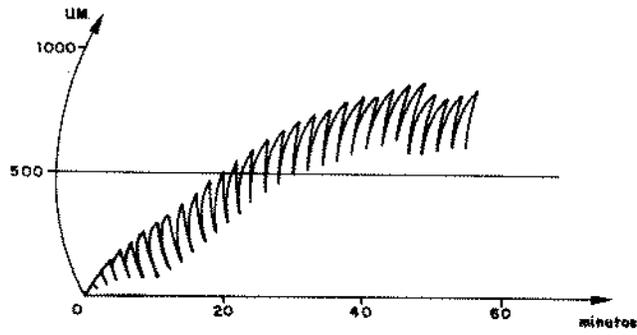
TABELA 9 - PARÂMETROS MATUROGRÁFICOS DAS MASSAS PRODUZIDAS COM  
LEVEDURA TRATADA ENZIMATICAMENTE

	LEVEDURA(%)			
	0	2	5	10
TEMPO DESCANSO FINAL (min)	59	55	53	41
ESTABILIDADE (min)	8	8	12	4
NÍVEL DE MASSA (UM)	880	860	780	640
ELASTICIDADE (UM)	240	230	220	210

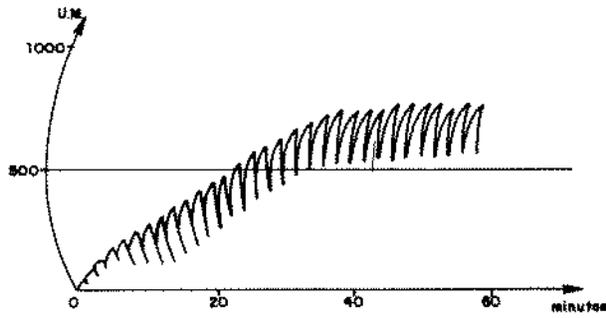
a)



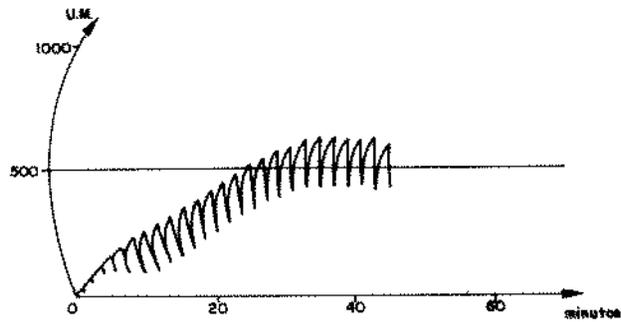
b)



c)



d)



## 4. EFEITO DA ADIÇÃO DA LEVEDURA TRATADA NA QUALIDADE DO PÃO

### 4.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA

A avaliação da qualidade tecnológica do pão na presença de 2, 5 e 10 % de levedura tratada foi realizada objetivamente, comparando-se com o pão sem aditivo, segundo o procedimento descrito no teste de panificação.

Com a adição de teores crescentes de levedura foram notadas algumas modificações no aroma, que tornou-se mais acentuado e agradável. O gosto não foi praticamente alterado.

À medida que se adicionou maiores teores de levedura tratada o volume foi prejudicado, o que era esperado, tendo em vista os resultados obtidos nos testes do Extensígrafo e Maturógrafo, comentados anteriormente. Em relação ao padrão, a característica de quebra do pão foi prejudicada, devido à diminuição do volume; a cor da crosta ficou ligeiramente mais escura, mas as suas características internas não foram afetadas; a simetria foi muito boa e estável.

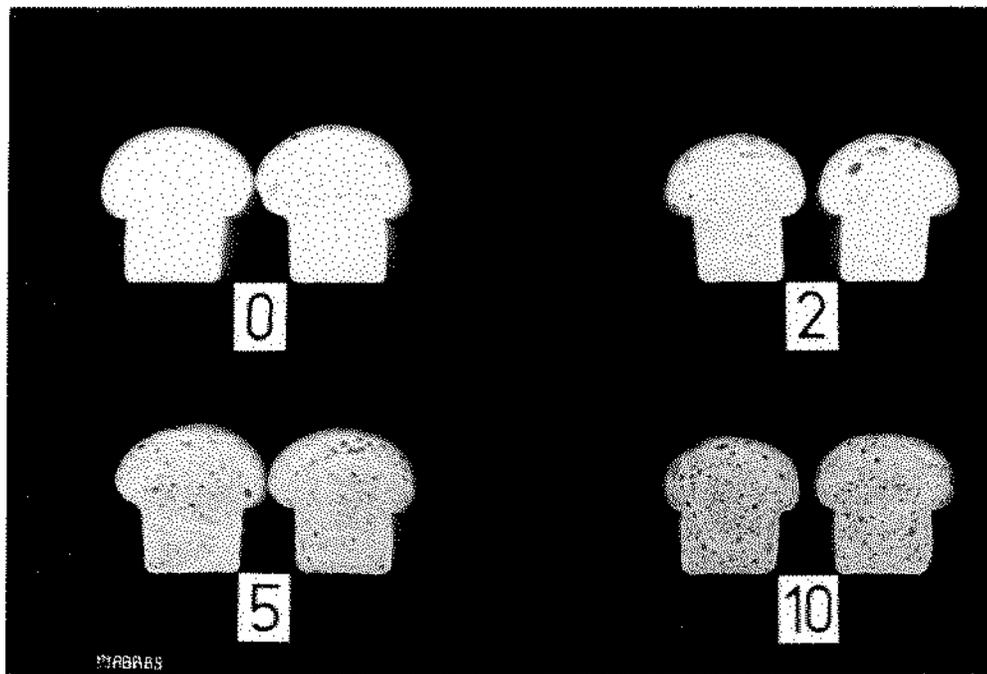
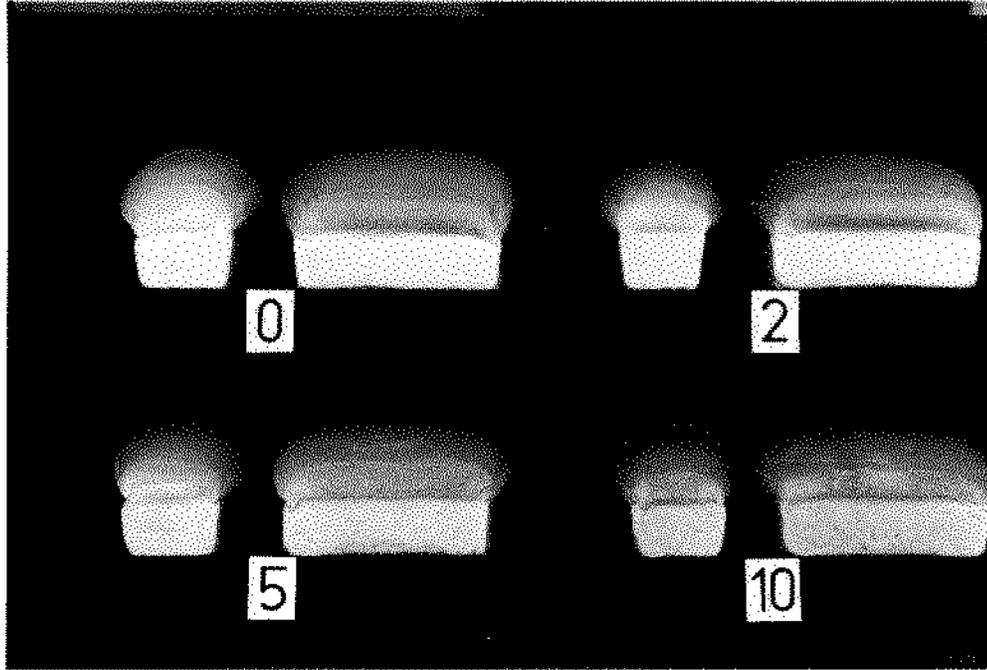
Na presença de levedura a estrutura do miolo apresentou-se menos uniforme, com células ligeiramente maiores. A textura ficou mais "borrachenta" e mais úmida, embora macia. A cor foi visivelmente alterada, passando de branco amarelado (do padrão) a tonalidades mais escuras à medida que se aumentou o nível de levedura tratada na massa; ao nível de 2% de levedura essa mudança foi praticamente imperceptível.

A avaliação conjunta dos parâmetros de qualidade do pão está mostrada na Tabela 10. Pelas notas obtidas, observou-se que as características que mais se alteraram com a adição de levedura tratada foram o volume do pão e a cor do miolo. O pão padrão apresentou a maior nota final (93,9 pontos) e o pão com 10% de levedura a menor (71,8 pontos), enquanto que as outras duas amostras obtiveram valores intermediários.

O aspecto geral dos pães pode ser observado na Figura 5.

TABELA 10 - TESTE DE PANIFICAÇÃO

	VALOR		AMOSTRAS		
	MÁXIMO	0%	2%	5%	10%
<b>CARACTERÍSTICAS EXTERNAS</b>					
VOLUME (vol esp. x 3,33)	20	14,9	13,0	13,0	12,3
COR DA CROSTA	10	9,0	9,0	8,0	7,0
QUEBRA	5	5,0	3,5	3,5	2,0
SIMETRIA	5	5,0	5,0	5,0	4,0
<b>CARACTERÍSTICAS INTERNAS</b>					
CARACT. DA CROSTA	5	5,0	4,5	4,5	4,5
COR DO MIOLO	10	10,0	8,0	6,0	4,0
ESTRUTURA DO MIOLO	10	10,0	9,0	8,0	7,0
TEXTURA DO MIOLO	10	10,0	9,0	9,0	8,0
<b>AROMA E GOSTO</b>					
AROMA	10	10,0	9,5	9,0	8,0
GOSTO	15	15,0	15,0	15,0	15,0
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>93,9</b>	<b>85,5</b>	<b>81,0</b>	<b>71,8</b>



#### 4.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ORGANOLÉPTICA (teste sensorial)

Foi feita a análise de variância dos dados obtidos pela avaliação sensorial dos pães contendo 0, 2, 5 e 10% de levedura tratada e os resultados se encontram na Tabela 11. Segundo esses resultados, os pães não apresentaram diferença significativa entre si, indicando que o provador desses produtos aceitou tanto o pão sem levedura como aqueles com 2, 5 e 10% de levedura.

Essa conclusão é importante porque mostra que, embora as diferenças entre os pães existam e sejam tecnológica e sensorialmente perceptíveis, todas as amostras foram aceitas e, estatisticamente, a diferença entre elas foi considerada não significativa, a nível de 5 % de significância. Assim, foi possível adicionar até 10% da levedura tratada enzimaticamente na formulação de pão, sem provocar rejeição por parte do consumidor.

TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO  
 SENSORIAL DOS PÃES COM 0, 2, 5 E 10% DE LEVEDURA TRATADA

	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
AMOSTRAS	3	3,5	1,17	0,75
PROVADORES	29	167,8	5,79	
RESÍDUO	87	136,02	1,56	
TOTAL	119	307,32	2,58	

F calculado < F tabelado, portanto, não existe diferença significativa  
 entre as amostras a nível de 5 % de significância

## 5. EFEITO DA LEVEDURA TRATADA NA COMPOSIÇÃO DO PÃO

### 5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS PÃES PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE LEVEDURA TRATADA

Os pães produzidos foram submetidos à secagem, de acordo com o método de 2 estágios, e a seguir à moagem, para determinação da composição centesimal, a qual é apresentada na Tabela 12. Observa-se que houve um aumento de 3,9, 4,2 e 10,5 % no teor de proteína dos pães adicionados de 2, 5 e 10% de levedura, respectivamente. Também aumentaram os teores de gordura, cinzas e fibras, com conseqüente redução no conteúdo de carboidratos.

### 5.2. COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DOS PÃES PRODUZIDOS COM LEVEDURA TRATADA

A composição em aminoácidos dos pães adicionados de levedura tratada está mostrada na Tabela 13. Observou-se que, na maioria dos casos, a quantidade de aminoácidos aumentou proporcionalmente à adição de levedura. Deve-se notar que os pães apresentaram aumento de 38,5, 57,7 e 66% no teor de lisina (com adição de 2, 5 e 10% de levedura, respectivamente), melhorando sensivelmente sua qualidade nutricional, como fica ainda mais evidenciado pelo escore químico dos aminoácidos essenciais (Tabela 14).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS PÃES PRODUZIDOS COM  
0, 2, 5 e 10% DE LEVEDURA TRATADA (% b.s.)

	LEVEDURA (%)			
	0	2	5	10
PROTEÍNA (N x 6,25)	15,08	15,67	15,71	16,66
GORDURA	4,35	4,41	4,50	4,57
CINZAS	2,35	2,39	2,49	2,57
FIBRAS	0,34	0,44	1,06	1,83
CARBOIDRATOS*	77,88	77,09	76,24	74,37

(\*) calculado por diferença

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DOS PÃES PRODUZIDOS COM  
 0, 2, 5 e 10% de LEVEDURA TRATADA  
 (mg aa / 100 g de proteína)

	LEVEDURA (%)			
	0	2	5	10
ARG	1,86	3,09	3,22	3,52
HIS	1,72	1,65	1,10	1,04
LYS	1,56	2,16	2,46	2,59
TYR	2,00	2,44	2,57	3,22
PHE	3,89	4,26	4,69	4,70
CYS	-	-	-	-
MET	1,81	1,65	1,59	1,58
THR	2,64	3,39	3,61	4,23
LEU	5,81	6,52	7,06	7,46
ILE	1,94	2,33	2,33	2,64
VAL	5,07	6,15	6,47	9,07
TRP	-	-	-	-
ASP	3,44	5,19	5,37	5,67
SER	5,60	4,66	4,24	3,33
GLU	35,57	33,66	32,90	30,17
PRO	11,46	11,44	8,92	8,13
GLY	3,73	3,32	3,28	3,20
ALA	2,53	2,63	2,84	3,00

TABELA 14 - ESCORE QUÍMICO DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS NOS PÃES  
 PRODUZIDOS COM 0, 2, 5 E 10% DE LEVEDURA TRATADA

	0	2	5	10
ILE	0,49	0,58	0,58	0,66
LEU	0,83	0,93	1,01	1,07
LYS	0,28	0,39	0,45	0,47
MET+CYS	0,52	0,47	0,45	0,45
PHE+TYR	0,98	1,12	1,21	1,32
THR	0,66	0,85	0,90	1,06
VAL	1,01	1,23	1,29	1,81

## CONCLUSÕES

1) Os resultados mostraram que o método químico não foi satisfatório para dominuir o teor de RNA das células de levedura.

2) O método enzimático foi escolhido pela maior facilidade de execução e pelas características do produto final obtido. A etapa de ajuste de pH foi considerada dispensável. A levedura assim obtida apresentou coloração mais escura, maior granulometria e aroma menos acentuado que a original.

3) A levedura tratada pelo método enzimático apresentou redução de aproximadamente 28 % no teor de RNA e cerca de 30 % no teor de proteína (quando calculado com base no nitrogênio total). A redução no teor de vitaminas do complexo B e de minerais foi de aproximadamente 70 %..

4) A quantidade de aminoácidos na levedura tratada pelo método enzimático foi superior à da levedura original. Esse resultado mostrou que, devido ao tratamento, ocorreu um aumento no teor de proteínas em relação ao nitrogênio total. Os aminoácidos limitantes, tanto na levedura original como na tratada, foram metionina e cistina, enquanto que o aminoácido que apresentou o maior escorre químico foi a lisina.

5) A adição de níveis crescentes de levedura tratada em massas de farinha de trigo, causou aumento em sua absorção de água, como determinado através do Farinógrafo. A adição de levedura aumentou a energia necessária para desenvolver a massa. A resistência à mistura aumentou com a adição de 2% de levedura, diminuindo para níveis superiores.

6) A adição de níveis crescentes de levedura tratada praticamente não alterou a energia requerida para estender e romper as massas, porém houve um crescimento na resistência à extensão acompanhado de um simultâneo decréscimo na extensibilidade da massa.

7) O aumento do teor de leveduras aumentou a temperatura inicial de gelatinização e a temperatura de viscosidade máxima, enquanto que a viscosidade máxima da pasta sofreu uma diminuição. A presença da levedura provocou uma maior tendência à retrogradação.

8) Os volumes alcançados pelas massas foram tanto menores quanto maiores as quantidades de levedura tratada adicionadas. Entretanto as taxas de fermentação foram maiores, conforme mostrado pela diminuição no tempo de fermentação.

9) A adição de níveis crescentes de levedura no pão propiciou algumas modificações no aroma, tornando-o mais acentuado e agradável, enquanto que o gosto praticamente não se alterou. O volume e a quebra diminuíram, a cor da crosta ficou mais escura, a estrutura do miolo ficou menos uniforme, a cor do miolo tornou-se mais escura e a textura ficou mais úmida e elástica.

10) A avaliação sensorial dos pães com levedura tratada mostrou que, apesar das diferenças entre eles serem perceptíveis, todas as amostras foram aceitas e, estatisticamente, a diferença entre elas não foi considerada significativa a um nível de 5 % de significância.

11) Foi observado o aumento nos teores de proteínas e de aminoácidos no pão com a adição de níveis crescentes de levedura na massa. O aumento da lisina nos pães aditivados com a levedura tratada melhorou sensivelmente seu escore químico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOR, I.M.; RICHARDSON, T. & DRAPER, N.R. - Effect of treating *C. utilis* with acid or alkali, to remove nucleic acids, on the quality of protein. J. Agric. Food Chem., Washington, 29(1):27-33, 1981.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC) - Approved Methods. St. Paul, Minn., 1969. v.1 e 2.

ANKER, C.A. & GEDDES, W.F. - Gelatinization studies upon wheat and other starches with the amilograph. Cereal Chem., St. Paul, 21(1): 335-60, 1944.

ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS - Métodos de análisis de vitaminas. trad. M. Soledad G. Chamarro y Claudio Fernández Heredia. 3. ed. León, Editorial Academia, 1966. 396 p.

BATT, C.A. & SINSKEY, A.J. - Use of biotechnology in the production of SCP. Food technol., Chicago, 38(2):108-11, 1984.

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem., Ottawa, 37:911, 1959.

CANEPA, A.; PIEBER, M.; ROMERO, C. & TOHA, J.C. - A method for large reduction of the nucleic acid content of yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 14(2):173-7, 1972.

COONEY, C.L.; RHA, C. & TANNENBAUM, S.R. - SCP: engineering, economics and utilization in foods. *Adv. Food Res.*, New York, 26:1-52, 1980.

CREMIERS, P. - Les nouvelles sources de protéines et leurs utilisations en alimentation humaine. *Bulletin des Anciens Elèves de l'école de meunerie*, France, 260:82-7, 1974.

CURRIE, J.A.; DUNNIL, P. & LILLY, M.D. - Release of protein from bakers' yeast (*S. cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 14(5):725-36, 1972.

DAMODARAN, S. & KINSELLA, J.E. - The use of chaotropic salts for separation of RNA and proteins from yeast nucleoproteins. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 25(3):761-70, 1983.

DAMODARAN, S. & KINSELLA, J.E. - Dissociation of yeast nucleoprotein complexes by chemical phosphorylation. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 32(5):1030-2, 1984.

- DE GROOT, A.P. & SLUMP, P. - Effects of severe alkali treatment of proteins on aminoacid composition and nutritive value. *J. Nutrition*, Bethesda, 98(1):45-56, 1969.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERS, P.A. & SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, 28(3):350-6, 1956.
- EDEBO, L. & MAGNUSSON, K.E. - Disintegration of cells and protein recovery. *Pure Appl. Chem.*, 36(3):325-38, 1973.
- EDOZIEN, J.C.; UDO, U.U.; YOUNG, V.R. & SCRIMSHAW, N.S. - Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young men. *Nature*, London, 228(10):180, 1970.
- EL-DASH, A.A. - Standardized mixing and fermentation procedure for experimental baking test. *Cereal Chem.*, St. Paul, 55(4):436-46, 1978.
- FAO/WHO - Energy and protein requirements. Geneva, WHO, 1973. 118 p. (WHO Technical Report Series, 522).
- FOLLOWS, M.; HETHERINGTON, P.J.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. - Release of enzymes from bakers' yeast by disruption in an industrial homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 13(4):549-60, 1971.

FRANCO, G. - Nutrição. 6. ed. Rio de Janeiro, Edições Atheneu, 1982.

GAGE, J.M. - Fortification of bread products. The Bakers Digest, Kansas City, 52(2):26-7,51,1978.

GIERHART, D.L. & POTTER, N.N. - Effects of RNA removal methods on composition and functional properties of *C. utilis*. J. Food Sci., Chicago, 43(6):1705-13, 1978.

GREIFE, H.A. - Die nukleinsäuren: ein gesundheitlicher Risikofaktor beim einsatz von "Single-cell protein" in der Tierernahrung? (Teil 1). Kraftfutter, 67(11):412-4, 1984.

GUNSALUS, I.C. - Experimental Biochemistry. University of Illinois, Illinois, 1959.

GUZMÁN-JUÁREZ, M. & HUDSON, B.J.F. - Yeast protein isolates low in nucleic acids. J. Sci. Fd. Agric., London, 29(12):1091, 1978.

HARRIS, R.S. - General discussion on the stability of nutrients. In: HARRIS, R.S. & von LOESECKE, E.H., eds. Nutritional evaluation of food processing. Westport, AVI, 1971. chap. 1, p. 2-5.

HARRIS, R.S. & LEVENBERG, R.K. - Effects of home preparation on nutrient content of foods of plant origin. In: HARRIS, R.S. & von LOESECKE, E.H., eds. Nutritional evaluation of food processing. Westport, AVI, 1971. chap. , p. .

HEDENSKOG, G. & EBBINGHAUS, L. - Reduction of the nucleic acid content of SCP concentrates. Biotechnol. Bioeng., New York, 14(3):447-57, 1972.

HEDENSKOG, G. & MOGREN, H. - Some methods for processing of SCP. Biotechnol. Bioeng., New York, 15(1):129-42, 1973.

HETHERINGTON, P.J., FOLLOWS, M.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. - Release of protein from baker's yeast (*S. cerevisiae*) by disruption in an industrial homogenizer. Trans. Instn. Chem. Engrs., London, 49(2):142-8, 1971.

JOINT FAO/WHO AD HOC EXPERT COMMITTEE - Energy and Protein Requirements: a report. Geneva, WHO, 1973. 118 p. (WHO Technical Report Series 522).

KAMER, J. H. van de & GINKEL, L. van - Rapid determination of crude fiber in cereals. Cereal Chem., St. Paul, 29(4):239-51, 1952.

KIDBY, D.K. & DAVIES, R. - Invertase and disulphid bridges in the yeast wall. J. Gen. Microbiol., London, 61:327-33, 1970.

- KIHLBERG, R. - The microbes as a source of food. *Ann. Rev. Microbiol. California*, 26:427-66, 1972.
- KNORR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F. & KINSELLA, J.E. - An enzymatic method for yeast autolysis. *J. Food Sci.*, Chicago, 44(5):1362-5, 1979.
- KRAUSE, M.V. & MAHAN, L.K. - Alimentos, nutrição e dietoterapia. trad. André Luis Montagnini *et alii*. 6. ed. São Paulo, Livraria Roca, 1985. cap. 7-8, p. 129-206.
- LABUZA, T.P.; JONES, K.A.; SINSKEY, A.J.; GOMEZ, R.; WILSON, S. & MILLER, B. - Effect of drying conditions on cell viability and functional properties of SCP. *J. Food Sci.*, Chicago, 37(1):103-7, 1972.
- LAI, C.S.; DAVIS, A.B. & HOSENEY, R.C. - Isolation of a fermentation stimulant from yeast protein concentrate. *Cereal Chem.*, St. Paul, 61(5):428-31, 1984.
- LEE, C.H.; TSANG, S.K.; URAKABE, R. & RHA, C.K. - Disintegration of dried yeast cells and its effect on protein extractability, sedimentation property and viscosity of the cell suspension. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 21(1):1-17, 1979.
- LEVITA Assessoria e Representações Ltda. - *S. cerevisiae*: catálogo.

LEWIS, P.N.; LAWFORD, H.G.; KLIGERMAN, A. & LAWFORD, G.R. - A novel method for reducing the RNA content of SCP isolates. *Biotechnol. Letters, Surrey*, 4(7):441-6, 1982.

LINDBLOM, M. - Alkali treatment of a yeast protein concentrate. *Lebensm.-Wiss. u. Technol., Zurich*, 7(5):295-8, 1974a.

LINDBLOM, M. - The influence of alkali and heat treatment on the yeast protein. *Biotechnol. Bioeng., New York*, 16(11):1495-506, 1974b.

LINDBLOM, M. - Properties of intracellular RNase utilized for RNA reduction in disintegrated cells of *S. cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng., New York*, 19(2):199-210, 1977a.

LINDBLOM, M. - Bread baking properties of yeast protein concentrates. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol., Zurich*, 10(6):341-5, 1977b.

LINDBLOM, M. & MOGREN, H. - Enzymatic RNA reduction in disintegrated cells of *S. cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng., New York*, 16(8):1123-33, 1974.

LITCHFIELD, J.H. - Single Cell Proteins. *Food Technology, Chicago*, 31(5):175-9, 1977a.

LITCHFIELD, J.H. - Single Cell Proteins. *Science*, Washington, 219(4585):740-6, 1983.

MATELES, R.I. & TANNENBAUM, S.R. - Single-cell protein. MIT Press, Massachusetts, 1968. 480 p.

MARKS, J. - A guide to the vitamins. Lancaster, MTP, 1975. 208 p.

MARTINI, A.E.V.; MILLER, M.W. & MARTINI, A. - Aminoacid composition of whole cells of different yeasts. *J. Agric. Food Chem.*, Sta. Monica, 27(5):982-4, 1979.

MAUL, S.B.; SINSKEY, A.J. & TANNENBAUM, S.R. - New process for reducing the nucleic acid content of yeast. *Nature*, London, 228 (10):181, 1970.

MAZURS, E.G.; SCHOCH, T.J. & KITE, F.E. - Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. *Cereal Chem.*, St. Paul, 34(3):141-52, 1957.

MILATOVIC, L.; KAUZLARIC, L.; VIDALI, P. & HUSNJAK, S. - Herstellung von Brot mit hoherem biologischen Wert durch Zugabe von durch Hitze inaktivierter Trockenhefe. *Getreide, Mehl Brot*, 33(8):205-7, 1979.

MOHR, F. - *Ann.* 97:335, 1856.

MOGREN, H.; LINDBLOM, M. & HEDENSKOG, G. - Mechanical disintegration of microorganisms in an industrial homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 16(2):261-74, 1974.

MOSQUEIRA, R.G.; HIGGINS, J.J.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. - Characteristics of mechanically disrupted bakers' yeast in relation to its separation in industrial centrifuges. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 23(2):335-45, 1981.

OHTA, S.; MAUL, S.; SINSKEY, A.J. & TANNENBAUM, S.R. - Characterization of a heat-shock process for reduction of the nucleic acid content of *C. utilis*. *Appl. Microbiol.*, Washington, 22(3):415-21, 1971.

OTERO, M.A.; GONZÁLES, A.C.; BUENO, G.E. & GARCÍA-REVILLA, J.L. - Acid treatment for RNA removal from yeast. *Biotechnology Letters*, Surrey, 4(3):149-52, 1982.

PONTE JR., J.G. - End products of wheat: bread. In: POMERANZ, Y., ed. *Wheat chemistry and technology*. 2. ed. St. Paul, A.A.C.C., 1978. chap. 13, p. 675-742.

PRATT JR., D.B. - Criteria of flour quality. In: POMERANZ, Y., ed. *Wheat chemistry and technology*. 2. ed. St. Paul, A.A.C.C., 1978. chap. 5, p. 201-26.

PYLER, E.J. - Baking science and technology. 2. ed. Chicago, Siebel Publishing Co., 1973. v.1. chap. 5-6, p. 171-269.

RACÃO: um novo subproduto da cana. Meios e Métodos, São Paulo, 6(39):10-2, 1983.

ROSALES, F.H. - Yeast as protein source for human nutrition. Acta Microbiol. Hungarica, 31(3):159-72, 1984.

ROTH, F.X. - Microorganisms as a source of protein for animal nutrition. Adv. Agric. Microbiol., 663-76, 1982.

SALGADO, J.M. & SARRUGE, J.R. - Efeito da lavagem sobre a qualidade do concentrado proteico obtido em destilaria de álcool. Rev. Bras. Tecnologia, Brasília, 7:339-44, 1976.

SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU, R. & HOPPER, K. - Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. J. Food Sci., Chicago, 50(2):353-7, 1985.

SCHACHTEL, A.P. - Effects of preparative processes on the composition and functional properties of protein preparations from *C. utilis*. J. Food Sci., Chicago, 46(2):377-82, 1981.

SCHAFFELD, G.; SINSKEY, A.J. & RHA, C. - Release of SCP by induced cell lysis. J. Food Sci., Chicago, 47(6):2072-3, 1982.

SEELEY, R.D.; ROBBINS, E.A.; SUCHER, R.W.; SCHULDT, E.H.; NEWELL, J.A.; SIDOTI, D.R. & CLAYTON, R.A. - Protein isolates from bakers yeast. Proc. IV Int. Congress Fd. Sci. and Technol., 5:135-41, 1974.

SEELEY, R.D.; ZIEGLER, H.F.; SUMNER, R.J. - The nutritional value of white bread containing nonviable dried yeast. Cereal Chem., St. Paul, 27(1):50-60, 1950.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Effect of thiol reagents on extractability of protein from yeast. Biotechnol. Bioeng., New York, 20(5):755-66, 1978.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Novel method for the reduction of NA content in yeast protein. Biotechnol. Bioeng., New York, 1(2):329-32, 1979a.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Preparation of yeast protein isolate with low NA content by succinylation. J. Food Sci., Chicago, 44(3):633-8, 1979b.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Ready separation of protein from nucleoprotein complexes by reversible modification of lysine residues. Biochemical J., London, 191(1):269-72, 1980a.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Lysinoalanine formation in yeast proteins isolated by alkaline methods. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 28(8):798-800, 1980b.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Reversible modification of lysine: separation of proteins and nucleic acids in yeast. *Adv. Chem. Series*, 198:169-98, 1982a.

SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Isolation of yeast protein with reduced NA level using reversible acylating reagents: some properties of the isolated protein. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 30(6):1166-71, 1982b.

SISTA, V.R. & SRIVASTAVA, G.C. - SCP: its relevance in Indian context. *Indian J. Microbiol.*, India, 21(3):259-64, 1981.

SPIES, J.R. - Determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, Washington, 39:1242, 1967.

STERNBERG, M.; KIM, C.Y. & SCHWENDE F.J. - Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients. *Science*, Washington, 190:992-4, 1975.

SUGIMOTO, H. - Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food grade yeast extracts. *J. Food Sci.*, Chicago, 39(5):939-42, 1974.

- TAJIMA, M. & YOSHIKAWA, S. - Changes of nucleic acids in the preparation process of cell protein isolates from yeast (*S. cerevisiae*). *Agric. Biol. Chem, Tokyo*, 39(3):611-6, 1975.
- TANNENBAUM, S.R. - SCP: food of the future. *Food Technol., Chicago*, 25(9):962-7, 1971.
- TANNENBAUM, S.R. - Vitamins and minerals. In: FENNEMA, O.R., ed. *Principles of food science. Part 1: food chemistry*. New York, Marcel Dekker Inc., 1976. chap. 7, p. 347-84.
- TANNENBAUM, S.R. & MILLER, S.A. - Effect of cell fragmentation on nutritive value of *Bacillus megaterium* protein. *Nature, London*, 214:1261-2, 1967.
- TARAS, M.J. - Standard methods for examinations of water and waste water. 13th edition. American Public Health Association, Washington, 1971. p. 527-30.
- TEIXEIRA, C.G. - Composição do fermento alcoólico: nutrição e fatores de crescimento. In: ALMEIDA, J.R. et alii - *Curso sobre fermentação alcoólica*. Piracicaba, Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo, 1960. 2 v. v.1, Cap. 5, p. 85-102.
- TREVELYAN, W.E. - Chemical methods for the reduction of the purine content of baker's yeast, a form of SCP. *J. Sci. Food Agric., London*, 27(3):25-30, 1976a.

- TREVELYAN, W.E. - Autolytic methods for the reduction of the purine content of baker's yeast, a form of SCP. *J. Sci. Food Agric.*, London, 27(8):753-62, 1976b.
- TREVELYAN, W.E. - Induction of autolytic breakdown of RNA in yeast by addition of ethanol and by drying/rehydration. *J. Sci. Food Agric.*, London, 28(6):579-88, 1977.
- TSANG, S.; LEE, C. & RHA, C.K. - Disintegration of cell wall and extraction of protein from *C. lipolytica*. *J. Food Sci*, Chicago, 44(1):97-103, 1979.
- TU, C.; FARNUM, C. & CLELAND, J. - Extraction of protein from mechanically disrupted freeze-dried brewer's yeast. *J. Milk Food Technol.*, Ames, 38(4):219-22, 1975.
- TUSÉ, D. - SCP: current status and future prospects. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, Cleveland, 19(4):273-325, 1984.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Extraction of protein, low in nucleic acid, from *S. fragilis* grown continuously on crude lactose. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 23(2):216-21, 1975a.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Some functional properties of protein isolates from yeast, *S. fragilis*. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 23(4):613-6, 1975b.

- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Preparation of succinylated yeast protein: composition and solubility. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 20(9):1329-44, 1978.
- VIIKARI, L. & LINKO, M. - Reduction of nucleic acid content of SCP. *Process Biochem.*, London, 12(4):17-9, 35, 1977.
- WASLIEN, C.I. - Unusual sources of proteins for man. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, Cleveland, 6(1):77-151, 1975.
- WASLIEN, C.I.; CALLOWAY, D.H.; MARGEN, S. & COSTA, F. - Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. *J. Food Sci.*, Chicago, 35(3):294-8, 1970.
- WASLIEN, C.I. & STEINKRAUS, K.H. - The potential of microbial cells as protein for man. *Bioscience*, 30(6):397-8, 1980.
- YAÑEZ, E.; BALLESTER, D. & GATTAS, V. - Suplementación de cereales con levadura *Candida utilis* o hidrolisado enzimático de pescado. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, 24(2):263-76, 1974.
- YAÑEZ, E.; WULF, H.; BALLESTER, D.; FERNÁNDEZ, N.; GATTÁS, V. & MONCKEBERG, F. - Nutritive value and baking properties of bread supplemented with *C. utilis*. *J. Sci. Food Agric.*, London, 24(5): 519-25, 1973.

YOUSRI, R.M. - SCP: its potential use for animal and human nutrition. World Rev. Anim. Prod., New York, 18(2):49-67, 1982.