

"OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS PROTÉICOS POR AUTÓLISE DAS
LEVEDURAS *Sacharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces carlsbergensis*"

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Flávia Edite Justina Manuel Dzimba e aprovada pela Comissão Julgadora em 10.05.94



"OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS PROTÉICOS POR AUTÓLISE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces carlsbergensis*"

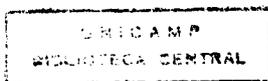
FLÁVIA EDITE JUSTINA MANUEL DZIMBA ^{n.º 1997}
Médica Veterinária

PROF. DR. OLAVO RUSIG ^x
Orientador

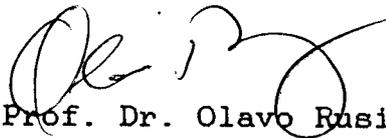
TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS

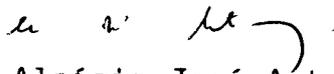
1994



BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Olavo Rusig
(orientador)



Prof. Dr. Aloísio José Antunes
(membro)



Prof. Dr. Horácio Pezoa
(membro)



Dr. Arlindo Moreira Sales
(membro)

Campinas, 10 de maio 1994

À meus pais:

Manuel Isaiás (In Memoriam)

Justina Aniana Jeremias

Ao meu marido Gaspar

Aos meus filhos Thindeka e Zimane

À meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Olavo Rusig, pelo estímulo, dedicação constante e participação na execução deste trabalho.

Ao Governo da República de Moçambique pela oportunidade

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela oportunidade para a realização deste trabalho.

A todos do laboratório de Tecnologia Geral, Alice, Ana Maria, Ana Lourdes, Nelson, Maria José, pelo auxílio, colaboração e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, Everardo, Carlos, Eli, Célia, Silvana, Ana Lúcia, Dirce, Normandis e Regina pelo carinho e pelo incentivo

À Teresa pela ajuda na análise do teor de ácidos nucléicos.

Ao Dr. Arlindo, da Seção de Bioquímica do Ital, pela ajuda na análise de aminoácidos.

Ao Prof. Contreras e Judite pela análise do triptofano.

Ao Lourival, Pesquisador da Embrapa, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Edinho pela ajuda no uso do Multímetro electrónico.

À Cleusa pela revisão das normas de referências bibliográficas

Ao Gerente Controle de qualidade da Cervejaria Kaiser S.P. Ltda, Roberto Dietrich pelo resíduo de cerveja fornecido.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Luísa, Márcia, Ana Artur, Bernardo, Domingos e todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
SUMMARY.....	IX
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
II.1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA.....	9
II.2- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA LEVEDURA.....	11
II.2.1- MÉTODOS FÍSICOS.....	12
II.2.2- MÉTODOS QUÍMICOS.....	13
II.2.3- MÉTODOS ENZIMÁTICOS.....	14
II.3- TEOR DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DOS EXTRATOS.....	17
II.4- PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	24
II.5- USO DE AUTOLISADOS E HIDROLISADOS NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS.....	37
III- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
III.1- MATÉRIAS PRIMAS.....	40
III.2- REAGENTES.....	40

III.3- EQUIPAMENTOS.....	40
III.4- MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	41
III.4.1- DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> POR AUTÓLISE.....	41
III.4.1.1- PREPARO DO EXTRATO DE LEVEDURA	43
III.4.1.2- EFEITO DO pH.....	45
III.4.1.3- EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRA- ÇÕES DE BIOMASSA	45
III.4.2- OBTENÇÃO DO EXTRATO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	45
III.4.3- CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>S.cere-</i> <i>visiae</i> E <i>S carlsbergensis</i>	46
III.5- MÉTODOS ANALÍTICOS.....	46
III.5.1- DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	46
III.5.2- DETERMINAÇÃO DE CINZAS.....	46
III.5.3- DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS.....	46
III.5.4- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA.....	46
III.5.5- DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	47
III.5.6- DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS.....	47
III.5.7- DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE AMINO- ÁCIDOS DO EXTRATO CONCENTRADO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
III.5.8- DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO.....	47
III.5.9- DETERMINAÇÃO DE CLORETO DOS EXTRATOS DE <i>S.cerevisiae</i> E <i>S carlsbergensis</i> ..	48
III.5.10-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	48
III.6- DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO EXTRATO CONCENTRADO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
III.6.1- SOLUBILIDADE- ÍNDICE DE NITROGÊNIO SOLÚVEL	48

III.6.2- CAPACIDADE GELIFICANTE.....	49
III.6.3- CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO.....	49
III.7- ANÁLISE SENSORIAL DE CALDOS FORMULADOS NA BASE DE EXTRATO DE LEVEDURA POR SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE CARNE.....	51
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
IV.1- COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	54
IV.2- EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE <i>S.cerevisiae</i>	57
IV.3- EFEITO DO TIPO DE SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DA LEVEDURA <i>S.cerevisiae</i> E SEU SINERGISMO COM O CLORETO DE SÓDIO.....	58
IV.4- EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DA LEVEDURA NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA.....	64
IV.5- AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS AUTOLISADOS CONCENTRADOS DAS LEVEDURAS.....	68
IV.5.1- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS EXTRATOS AUTO- LISADOS CONCENTRADOS DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E <i>carlsbergensis</i>	68
IV.5.2- COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DO EXTRATO AUTOLISADO DA LEVEDURA <i>S.cerevisiae</i> .	72
IV.5.3- AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO EXTRATO CONCENTRADO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	75
IV.5.3.1- SOLUBILIDADE.....	75
IV.5.3.2- CAPACIDADE DE GELIFICAÇÃO.....	77
IV.5.3.3- CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO...	81
IV.5.4- ANÁLISE SENSORIAL DOS EXTRATOS CONCENTRADOS	86

V.- CONCLUSÕES.....	89
VI.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de microrganismos unicelulares na base seca	11
Tabela 2: Resumo de alguns métodos investigados para redução de RNA nos isolados de levedura	24
Tabela 3: Classes gerais de propriedades funcionais de proteínas importantes para aplicação em alimentos	25
Tabela 4: Propriedades funcionais típicas de preparações protéicas	26
Tabela 5: Condições gerais de extração da proteína da levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) por autólise	42
Tabela 6: Composição dos caldos de carne utilizando extrato de levedura <i>S.cerevisiae</i> e <i>S.carlsbergensis</i>	51
Tabela 7: Ficha para análise sensorial do caldo de carne	52
Tabela 8: Composição centesimal da levedura <i>S.cerevisiae</i>	55
Tabela 9: Composição centesimal da levedura <i>S.carlsbergensis</i>	56
Tabela 10: Rendimento de extração da proteína da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando-se o metanol como solvente.	61
Tabela 11: Rendimento de extração da proteína da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando-se o etanol como solvente	62

Tabela 12: Rendimento de extração da proteína da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando-se o clorofórmio como solvente	63
Tabela 13: Percentagem de proteína e de rendimento de extração de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> determinada pelos métodos de Biureto e de Kjeldahl	65
Tabela 14: Composição centesimal dos extratos concentrados das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	71
Tabela 15: Teor de aminoácidos do extrato protéico da levedura <i>S.cerevisiae</i> em g de aminoácido/100g de proteína	72
Tabela 16: Capacidade de emulsificação da proteína do extrato concentrado da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
Tabela 17: Resultados da avaliação sensorial das amostras com substituições de extrato de carne por extrato de levedura nas formulações para caldo de carne	86
Tabela 18: Frequência de razões para preferir ou rejeitar as formulações de caldo de carne com extrato de levedura	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Perfil típico da solubilidade das proteínas da levedura 29
- Figura 2: Fluxograma da obtenção de extrato de levedura 44
- Figura 3: Efeito do pH e da concentração da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no rendimento da autólise 67
- Figura 4: Curva de solubilidade da proteína do extrato autolisado concentrado de *Saccharomyces cerevisiae* 75
- Figura 5: Gelificação das proteínas do extrato de *Saccharomyces cerevisiae* a várias concentrações protéicas 77
- Figura 6: Gelificação das proteínas do extrato autolisado de *Saccharomyces cerevisiae* concentradas a 8.97, 11.64, 15.27 e 19.08% (da direita para a esquerda) 79
- FIGURA 7: Gelificação das proteínas do extrato autolisado de *Saccharomyces cerevisiae* concentradas a 22.90, 26.71 e 30.0% (da esquerda para a direita)
- FIGURA 8: Variação da capacidade de emulsificação das proteínas do extrato concentrado da levedura *S.cerevisiae* com o aumento da concentração protéica 83

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido no sentido de otimizar os rendimentos de autólise, caracterizar algumas propriedades funcionais e avaliar sensorialmente os concentrados finais dos extratos protéicos das leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) e de resíduo de produção de cerveja (*Saccharomyces carlsbergensis*).

Para otimizar o processo no tempo pré-determinado de 5 horas foram analisadas as condições de temperatura, concentrações de sal e solventes (metanol, etanol e clorofórmio), pH e concentração celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e depois extrapolados os resultados para a *Saccharomyces carlsbergensis*. Foram obtidos extratos de alto rendimento, na autólise de suspensões ajustadas a pH 5 contendo 20% de células, 7% de etanol, 5% de NaCl a 55°C. Os extratos foram concentrados a vácuo até 80⁺²° Brix à 56°C, de modo a evitar a desnaturação das proteínas.

As determinações das propriedades funcionais nos extratos concentrados estudados mostraram solubilidade mínima a pH 4,3 e máxima a pH 5,3 na faixa de pH estudada. Os extratos obtidos mostraram importante capacidade de gelificação e de emulsificação, indicando que existem boas possibilidades de uso dos extratos concentrados em alimentos.

Nas avaliações sensoriais dos caldos, nos quais 0, 20, 50 e 100% do caldo de carne foi substituído por extrato concentrado de levedura, não houve diferença significativa, e concluiu-se que mesmo a substituição total (100%) foi amplamente aceita pelos provadores.

SUMMARY

The objective of this research were to optimize the yields from the autolysis of bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and beer yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*) and to characterize some of the functional properties and carry out sensory evaluations of both the final concentrates of the protein extracts from bakery yeasts and of the residues from beer making.

In order to optimize the process at the pre-fixed time of 5 hours, the conditions of temperature, salt and solvent (methanol, ethanol and chloroform) concentrations, pH and cell concentration were analyzed for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the results then extrapolated for *Saccharomyces carlsbergensis*. High yields in extracts were obtained on autolysis of suspensions adjusted to pH 5 at 55°C and containing 20% of cells, 7% ethanol and 5% NaCl. The extracts were concentrated under vacuum at 55°C to 80⁺²°Brix, thus avoiding protein denaturation.

Within the pH range studied, the determinations of the functional properties of the concentrated extracts showed minimum solubility at pH 4.3 and maximum solubility at pH 5.3. The results showed an extract with gelifying and emulsifying properties, indicating good possibilities for the use of the concentrated extracts in foods.

In sensory evaluations of the broths, in wich 0, 20, 50 and 100% of the meat broth was substituted by concentrated yeast extract, there was no significant difference, it thus being concluded that even total substitution (100%) was widely accepted by the judges.

I- INTRODUÇÃO

Os primeiros registros do uso de leveduras estão relacionados com a produção de um tipo de cerveja ácida chamada "boozah" em 6000 AC, no Egito. O processo de produção de vinho, cerveja e fermento de panificação provavelmente se desenvolveu em paralelo nos milênios seguintes (HOBSON, 1985). No tempo dos romanos a cerveja era uma bebida comum entre os habitantes da Gália, Espanha e Alemanha. Os Britânicos acolheram bem a produção de cerveja dos Romanos e adotaram-na como sua bebida nacional.

Há milhares de anos que os povos do Sul da Ásia produzem os alimentos por métodos fermentativos. Por exemplo: vinho de arroz, vinho de cana de açúcar, "pickles", molhos de peixe e vários alimentos de soja são produzidos desse modo (REED, 1981). Uma grande variedade de alimentos (produtos lácteos, salsichas fermentadas, etc.) também contém microorganismos incluindo leveduras. Portanto, células microbianas têm sido consumidas há muito tempo pelo Homem, em alguns casos em altas quantidades. Segundo SCHMIDT (1987), a cerveja Kaffir que é uma bebida tradicional na África, ainda é produzida pelos povos Bantos e é quase uma dieta completa devido ao seu equilíbrio entre leveduras e grãos.

A tecnologia de produção de células microbianas em escala comercial para alimentação se desenvolveu somente nos últimos 100 anos. Antigamente os povos recuperavam a levedura de fermentação do topo do recipiente da produção de bebidas fermentadas como a cerveja, e usavam essas leveduras como fermento em produtos de panificação. Preparações de levedura de cerveja prensadas, tiveram início no final do século XVIII na Alemanha, Grã-Bretanha e Países Baixos. Em 1868, Fleischmann fundou a indústria de levedura prensada nos EUA e os avanços na bioquímica de fermentação e engenharia contribuíram grandemente para o surgimento de modernas fábricas de manuseio de fermento. A tecnologia específica com aeração contínua e

separação com centrífugas foi desenvolvida para a produção de levedura de panificação. Tecnologias atuais para a produção de células microbianas datam da I Guerra Mundial. Fermentadores de grande escala com aeração efetiva e novos processos contínuos foram usados. Novos substratos (melaços, resíduos do processamento de frutas e da indústria de fermentação alcoólica, soro de leite, hidrolisados de celulose, etc.) foram identificados e usados. O número de variedades e espécies de leveduras desenvolvidas em diferentes matérias primas também foi aumentado (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

A despeito do grande número de publicações sobre a produção de bactérias, algas e fungos, até o presente, apenas leveduras produzidas a partir de substrato de hidratos de carbono tem sido efetivamente empregadas na alimentação humana. Atualmente são usadas em alimentos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces fragilis* e *Candida utilis*, entre outras. As duas primeiras citadas são subprodutos da produção de cerveja. As demais leveduras são cultivadas especialmente para uso alimentício e são muitas vezes denominadas de "leveduras primárias". Segundo OLIVEIRA (1978a), não são consideradas leveduras alimentares aquelas que sofreram extração para obtenção de algum de seus constituintes, que apresentem mais de 20% de gordura e que contenham elementos estranhos na sua composição.

A levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) é um dos maiores produtos da indústria fermentativa pois ela é produzida em quantidades superiores a 1,8 milhões de toneladas (30% de sólidos) anualmente (BURNOW, 1979). A levedura de cerveja (*Saccharomyces carlsbergensis* ou *cerevisiae*) é obtida ou de culturas puras ou, como acontece hoje na maioria das cervejarias, recuperada e preparada para elaboração de nutrientes frescos. A levedura recuperada pode ser reciclada mais de 20 vezes antes de precisar ser substituída por uma cultura pura. Contudo, há consideráveis variações nesta prática como algumas cervejarias que substituem a

levedura depois de poucas reciclagens. O resíduo de levedura de cerveja é processado como extrato de levedura para uso como aromatizante ou como levedura seca para suplemento alimentar. Esses resíduos são gerados em elevadas quantidades. Sómente os Estados Unidos produzem cerca de 34 mil toneladas de resíduos sólidos de levedura anualmente, da qual sómente uma menor parte é reciclada para o processamento de cerveja (PEPPLER, 1979).

A aplicação de levedura e seus derivados no reforço nutricional (como fonte de proteína e vitamina) de alimentos processados e também para refinar o seu perfil de sabor, tem tendência a crescer (HOBSON, 1985 e SCHMIDT, 1987). O ideal seria que as células microbianas fossem consumidas diretamente como ingrediente alimentício. No entanto, devido à presença de componentes ativos fisiologicamente indesejáveis (alto teor de ácidos nucléicos e material da parede celular), a ruptura das células e extração da proteína e/ou outros componentes, na maioria dos casos é uma etapa importante no seu processamento e aplicação (DZIEZAK, 1987).

O objetivo do presente trabalho foi examinar a possibilidade de obter extratos autolisados de levedura para uso em nutrição humana, mantendo-se as propriedades funcionais das proteínas. Autolisados e extratos são produtos de auto-digestão ou autólise de levedura de cerveja ou outras fontes. Durante o processo autolítico, a parede celular é quebrada e são liberados peptídeos e amino-ácidos, inclusive componentes celulares solúveis. Diferentes características de sabor e aroma podem ser desenvolvidos variando-se as condições de autólise e método de extração. Depois de se remover a parede celular insolúvel e composto de sabor amargo, o líquido remanescente é concentrado à uma pasta viscosa castanha que é caracterizada por um aroma cárneo e é chamado de extrato de levedura. Tecnicamente, se as paredes da célula não são removidas e a pasta de levedura é seca ou concentrada o produto final é referido como um autolisado. A nomenclatura para extratos e autolisados,

contudo, pode variar com o fabricante (DZIEZAK, 1987).

A idéia não é nova e, atualmente no Brasil existem alguns fabricantes de proteínas autolisadas, porém, a tecnologia para obtenção dos produtos pertence à empresas multinacionais, e são mantidos como segredos industriais ou patenteados pelas mesmas. O principal uso desses extratos está na substituição do uso de extrato de carne pelos mesmos, porém o seu uso tem sido geral em produtos cárneos, molhos, snacks, sopas, caldos, etc. Devido a falta de extrato de carne e o alto custo no mercado internacional, o Brasil tem exportado pequenas quantidades desses extratos de leveduras, porém a falta de conhecimento das propriedades funcionais, assim como de suas características intrínsecas, provocadas pelas mudanças dos parâmetros de extração, tem dificultado o aumento das exportações. Também há interesse na importação desses produtos por empresas internacionais, porém o "know-how" de produção tem sido mantido por poucas empresas nacionais, que devido à falta de agressividade no setor e investimento em pesquisas, têm contribuído pouco para que o Brasil aumente a produção e exportação dos extratos autolisados.

Neste trabalho será estudado o rendimento da autólise de duas fontes protéicas, ou seja das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*). Com o propósito de incrementar os rendimentos considerou-se importante estudar algumas condições para extração das proteínas e determinar as condições de temperatura, tipo e concentração de solventes, teor de sal, pH e concentração celular.

Por outro lado considerou-se importante avaliar a qualidade das proteínas com base na determinação do perfil de amino-ácidos obtido nos autolisados, bem como o efeito da autólise sobre a eliminação dos ácidos nucléicos presentes na levedura.

O presente trabalho consistiu também na caracterização de algumas propriedades funcionais dos autolisados por sistemas modelos: solubilidade, capacidade de gelificação e capacidade de emulsificação. Finalmente, os extratos foram avaliados sensorialmente pela aplicação em caldo de carne por substituição do extrato de carne.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As fontes de proteína podem ser chamadas de convencionais e não convencionais. As primeiras dizem respeito aos produtos tradicionalmente utilizados como fontes de proteína, como carne, leite, ovos, etc e as não convencionais referem-se às fontes não tradicionais, como é o caso da proteína unicelular.

A expressão "Proteína Unicelular" (Single Cell Protein- SCP) é um termo para proteína cuja origem é de organismos unicelulares. Foi proposta em 1966, no Instituto de Tecnologia de Massachussets (M.I.T.) (TANNENBAUM, 1971), sendo também usado o termo biomassa e proteína microbiana (TANNENBAUM & WANG, 1975). SISTA & SRIVASTAVA (1981) alegam que a denominação SCP não é totalmente correta porque além de proteínas, este material contém outros componentes como lipídeos, carboidratos, vitaminas, minerais e outros compostos nitrogenados.

Entre os organismos utilizados para a produção de proteína unicelular estão as algas, as bactérias, os fungos e as leveduras, os quais representam uma fonte potencial não só de proteína como de glicídeos, lipídeos, vitaminas e minerais.

Destas quatro classes de microorganismos, as leveduras particularmente *Saccharomyces* e *Candida* são as mais estudadas, por serem usadas há muito tempo na alimentação animal e humana. Além do mais, elas podem crescer em pH baixo (4,5 e 5,5) e assim minimizar a contaminação por bactérias (KILBERG, 1972).

SCRIMSHAW (1975) relata que a possibilidade de cultivar levedura como um alimento para consumo humano foi pela primeira vez explorada em Berlim por Debrucj *et al.* em 1910. Os alemães utilizaram a espécie de levedura *Candida utilis* durante a I e a II Guerra Mundial como substituto da carne. As leveduras também foram

incorporadas às rações de russos e japoneses durante a II guerra Mundial.

Segundo LOESECKE (1946), o emprego de leveduras como alimento, particularmente como fonte protéica, passou a ser encarado seriamente pela primeira vez, durante a I Guerra Mundial, no entanto, naquela época, o produto não teve grande sucesso por problemas , principalmente de palatabilidade. Durante a II guerra Mundial a produção já era em escala maior e foi melhor aceita para o consumo, tanto que em 1945 uma quantidade razoável de levedura *Saccharomyces* foi usada na alimentação humana.

Em junho de 1971 realizou-se em Moscou (U.R.S.S.) a segunda Reunião do Grupo de Trabalho "AD HOC" do "Protein Advisory Group" (P.A.G.) sobre Proteínas Unicelulares (SCP). Nela foram propostas certas espécies de leveduras, algas e bactérias que poderão ser usadas como fontes de proteínas, bem como de vitaminas e minerais para o homem e animais e que esses critérios dependam dos organismos selecionados, do substrato utilizado, das condições para crescimento e ainda de detalhes de processamento e manipulação do material (OLIVEIRA, 1978b).

Segundo REED & PEPPLER (1973), nos Estados Unidos o uso de leveduras é disciplinado por uma legislação específica, publicada em 1970 pelo "Nutritional Formulary", que quantifica os limites máximos e mínimos dentro dos quais as leveduras são consideradas como alimentares:

Máximos

10% umidade

10% cinzas

5 $\mu\text{g/g}$ arsênico

5 $\mu\text{g/g}$ chumbo

7500 bactérias/grama

50 fungos/grama

Mínimos

45% de proteína bruta

120 $\mu\text{g/g}$ tiamina

30 $\mu\text{g/g}$ riboflavina

300 $\mu\text{g/g}$ niacina

Adicionalmente o produto deverá ser livre de amido e bactérias do gênero *Salmonella*. A Food Drug Administration (F.D.A.) restringe o uso de leveduras quanto ao conteúdo de ácido fólico, que não deve ultrapassar 8mg/g em alimentos comuns e 100mg/g nas porções de alimentos dietéticos consumidos diariamente por indivíduos adultos (OLIVEIRA, 1978a).

Experiências com leveduras realizadas no ser humano, visando a relação existente entre ingestão de leveduras e eliminação de ácido úrico, demonstraram que há correlação positiva, e que tal fato poderia levar à produção de gota em pessoas já predispostas geneticamente, bem como aumentar o risco para aquelas que não o fossem (WASLIEN *et al.*, 1970, CANEPA *et al.*, 1972, HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972, SINSKEY & TANNENBAUM, 1975). O grupo FAO/OMS/UNICEF ao discutir os limites de segurança que deveriam ser respeitados ao introduzir esta fonte protéica não convencional na alimentação humana ou animal, após estudos controlados, estabeleceu que a quantidade de ácidos nucléicos não deveria ultrapassar o limite de 2g por dia, para um indivíduo adulto normal, sendo ainda mais reduzida, quando administrada a crianças (ASPECTOS de nutrición..., 1974, ENSAYOS preclínicos..., 1974, GUIDELINE for testing..., 1975, GUIDELINE on the production..., 1975).

II.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA

As leveduras possuem 50 a 70% de proteína bruta (nitrogênio x 6,25) na base seca, sendo que aproximadamente 20% do nitrogênio é não protéico, derivado de ácidos nucleicos e outros constituintes (BREISSANI, 1968 e REED & PEPPLER, 1973). O aumento do teor protéico e da taxa de crescimento é geralmente associado com o aumento do teor de ácidos nucleicos. Segundo SOBOLEVA & POPOVA (1988) relativamente poucos dados acerca da composição exata dos componentes da proteína estão disponíveis. Há uma tendência de fracionar as proteínas baseada na solubilidade, similarmente a classificação de Osborne para proteínas vegetais. A maior parte das proteínas nativas de leveduras pertence às solúveis em água e/ou sal (albuminas e globulinas, segundo a classificação de Osborne).

O teor (4 a 7%) e composição de lípidos depende da natureza do meio de crescimento. Leveduras alimentares contêm majoritariamente ácidos graxos de cadeia longa, com aproximadamente 20, 40 e 15% de ácidos oléico, linoléico e linolênico, respectivamente (SCHNELL & AKIN, 1979). O alto teor de ácidos graxos insaturados torna as células das leveduras suscetíveis a "off-flavours" oxidativos e descoloração.

Normalmente um quinto a um terço da matéria seca consiste de diferentes carboidratos. A maior parte dos carboidratos está presente na forma de polissacarídeos, sendo que o total de mono e oligossacarídeos é baixo exceto a trealose (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Para SOLS *et al.* (1971) quase toda a reserva de carboidratos (reserva de energia) compreende o glicogênio e a trealose. A levedura de panificação normalmente contém 16 a 20% de glicogênio e 6 a 10% de trealose. A levedura de cerveja possui quantidades inferiores.

Segundo PHAFF (1971) o teor de carboidratos da maioria das leveduras alimentares varia entre 20 e 35% na base seca, sendo que

glucanas, mananas e, em menor quantidade, a quitina constituem os principais carboidratos estruturais na parede celular da levedura *Saccharomyces*.

ABD-ALLAH *et al.* (1986) ao investigarem a reserva de carboidratos de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, detectaram que o teor de glicogênio das células de levedura alcança o máximo após 72 horas de fermentação e a trealose ao fim de 120 horas. Em relação ao efeito da intensidade da aeração no teor de carboidratos eles concluíram que aumentando a aeração melhora a habilidade das células da levedura de armazenar mais carboidratos. No entanto, o aumento do teor de carboidratos é geralmente associado a um decréscimo do teor de proteína (HALÁZ, 1988).

Quanto ao teor de minerais as leveduras apresentam 6 a 9% de cinzas baseado em peso seco, sendo aproximadamente a metade constituída por fosfatos, encontrando-se também sais de Ca, K, Mg, Na e SO₄ (BRESSANI, 1968 e REED & PEPPLER, 1973). A composição química de microorganismos, de acordo com REED (1981) é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química de microorganismos unicelulares na base seca (%)

	Fungos	Leveduras	Bactérias	Algas
Proteína	31-50	47-56	72-93	47-63
Ácidos nucleicos	9,2	6-15	8-16	3-8
Cinzas	9-14	5-9,5	3-7	8-10
Lípidos	2-8	2-6	1,5-3	7-20

Fonte: REED (1981)

Segundo CHEN & PEPPLER (1990), as células secas podem ser usadas diretamente sem processamentos posteriores. Mas se o concentrado ou isolado de SCP é para ser usado como ingrediente alimentício, a célula microbiana deve ser tratada para extração da proteína e/ou outros componentes seja por meios físicos ou químicos. A presença de componentes fisiologicamente ativos indesejáveis, o alto teor de ácidos nucleicos e o efeito prejudicial do material da parede celular diminuem a disponibilidade das proteínas. Além disso, a parede celular pode conter agentes alergênicos e fatores causadores de náuseas e perturbações gastrointestinais. Após a ruptura celular, diferentes técnicas de separação podem ser usadas dependendo do componente a ser produzido.

II.2- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA LEVEDURA

A desintegração da parede celular e a resultante liberação da proteína da célula são pré-requisitos para a digestibilidade e funcionalidade das proteínas unicelulares (LITCHFIELD, 1977). Segundo REED & PEPPLER (1973) a parede celular pode ser rompida por autólise, hidrólise enzimática, tratamento químico e desintegração

mecânica.

Na avaliação dos diferentes métodos de ruptura da célula uma etapa importante é a determinação da integridade das células de levedura. Para esse propósito a medida da solubilidade da proteína (INS) é largamente usada. A razão para que se use esse método é que há mais proteína solúvel disponível quando a parede celular é rompida (o solvente pode entrar na célula e solubilizar a proteína) (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

II.2.1- MÉTODOS FÍSICOS

A ruptura mecânica de células pode ser dividida em métodos baseados nas forças de atrito sólidos e líquidos. Segundo HEDENSKOG *et al.* (1970) o primeiro pode envolver uma ação de moagem, como em moinho de bolas ou extrusão de células congeladas através de fendas estreitas ou orifícios, sob alta pressão. O atrito sólido devido aos cristais de gelo é muito importante. A pressão por congelamento faz com que a membrana da parede celular permaneça praticamente intacta o que pode ser um bom método para o isolamento da membrana, associado ao método enzimático (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

LIMON-LASON (1979) estudou as propriedades do reator do moinho de bolas de alta velocidade para ruptura de células microbianas e achou que a maior dificuldade para operar com esse tipo de equipamento é o controle da temperatura no meio de ruptura. Em 1972, CURRIE *et al.* utilizaram o moinho industrial para romper as células de levedura de panificação e extrair proteína. Os resultados demonstraram que o aumento de temperatura de 5 para 42°C era acompanhado pela redução na eficiência de extração de 20% aproximadamente. VANANUVAT & KINSELLA (1975a) também apontam como outros problemas da ruptura mecânica a desnaturação protéica, a restrição à escala laboratorial e a ineficiência dos aparelhos. Segundo CHEN & PEPLER (1990) um bom trabalho a alta pressão

obtem-se sómente num laboratório ou em escala piloto e, tratamento de congelamento-descongelamento é demasiadamente caro para aplicação comercial. A sonificação não é efetiva para bactérias gram-positivas e muitas leveduras por causa da rigidez da parede celular. Fricção acima de 500psi, não causa nenhuma ruptura das células da levedura. Então, pelo processo de eliminação, a moagem em moinho de bolas e homogeneização a alta pressão tornou-se o método de escolha com as mais altas possibilidades de aplicação industrial, apesar do alto investimento e custo operacional envolvidos (HEDENSKOG, 1970).

II.2.2- MÉTODOS QUÍMICOS

O método químico para extração de proteínas pode incluir o tratamento das células com várias substâncias como uréia, guanidina, hidróxido de sódio (MITSUDA *et al.*, 1969), ácido acético, ácido oxálico, ácido cítrico (EUA Pat.3,585,179, 1971) e outros.

O uso de altas concentrações de álcalis ou ácidos resulta na degradação química da parede celular. O tratamento das células de levedura com álcali (pH= 11) enfraquece a parede celular e facilita a ruptura por métodos mecânicos. Segundo HASLÁZ & LÁSZTITY (1991) este é um procedimento comum usado para a recuperação de proteínas da levedura.

Na patente europeia (European Pat.0,050,831, 1986), a base preferida, usada para extração da proteína solúvel foi o hidróxido de amónia. Outras bases adequadas incluem o hidróxido de potássio, sódio, cálcio, carbonato de potássio e outros. Contudo, HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) apontam algumas desvantagens se o propósito for a produção de proteínas para a indústria alimentar, pois o tratamento alcalino pode causar hidrólise da proteína, despolimerização, racemização de aminoácidos, reações de beta-eliminação e desnaturação. Das mudanças que ocorrem nas proteínas a formação de lisinoalanina (LAL) atraíu considerável atenção por causa do efeito

nefrotóxico (nefrocitomegália, nefrocariomegália e nefrocalcinose) em ratos e camundongos (DWORSCHÁK *et al.*, 1981). Segundo o mesmo autor, um interesse nutricional é que a LAL se forma às custas de amionoácidos essenciais como a lisina, cistina e em menor extensão a treonina; a serina também é afectada. A susceptibilidade para a formação da LAL varia de uma proteína para outra afectando a composição das proteínas em diferentes formas (CHUNG *et al.*, 1986). É frequente que o valor nutricional das proteínas em que se formaram estas uniões covalentes resulte inferior ao das proteínas naturais. Com efeito diversos experimentos demonstraram que o Coeficiente de Eficiência Protéica (CEP), a Utilização Neta das Proteínas (UNP) e algumas vezes o Valor Biológico (VB) das proteínas são inferiores quando o tratamento aplicado (alcalinização, temperatura, duração) é enérgico (CHEFTEL *et al.*, 1989). Segundo a patente anterior (European Pat.0.050,831, 1986), o hidróxido de amónia parece diminuir grandemente a formação de lisinoalanina e o excesso de amónia pode ser removido da proteína solúvel durante a etapa de secagem.

II.2.3 - MÉTODOS ENZIMÁTICOS

A digestão enzimática da parede celular é um método atrativo por causa do baixo requerimento de energia e maior eficiência comparada com os métodos mecânicos. REED & PEPPLER (1973) reportaram o uso de enzimas para romper as células de levedura e ajudar na degradação proteolítica durante a autólise.

Segundo KNORR *et al.* (1979), a lise enzimática da parede celular, usando enzimas exógenas, é bastante efetiva pois elas ativam as proteases endógenas. Ao associarem as enzimas zimolase/lisozima seguido de extração a pH 9 obtiveram um rendimento superior a 80% do nitrogénio total da célula de levedura.

FEDOROVA & NEKLYUDOV (1985) estudaram a influência de enzimas proteolíticas exógenas (papaina, pepsina, pronase E e

protosubtilisina) no processo de autólise da levedura de panificação. Um fato interessante foi que com a adição de diferentes enzimas eles obtiveram sempre o mesmos resultados, isto é, o efeito das enzimas não dependeu da especificidade de seu substrato. Eles concluíram que o mecanismo do efeito das enzimas proteolíticas exógenas sobre o processo de autólise da levedura de panificação não é uma simples combinação de hidrólise das proteínas pelas enzimas inatas das leveduras e de proteólise pelas enzimas introduzidas. É possível que as enzimas exógenas decomponham os inibidores das enzimas inatas da levedura.

O processo de autólise de levedura é uma reação lenta. É induzido pelo aquecimento de uma pasta aquosa de células de levedura até uma temperatura em que as células são mortas mas a atividade das enzimas endógenas ainda é alta. A temperatura varia entre 40 a 60°C, sendo preferível de 50 a 55°C pois corresponde a mais alta taxa de reação sem danificação da atividade das enzimas (EUA Pat.4,285,976, 1981 e EUA Pat.4,218,481, 1980).

Para acelerar a autólise se empregam vários agentes plasmolisantes como o sal e solventes orgânicos: acetato de etila, acetato de amila, clorofórmio, etanol, etc.(NAUMENKO & GORDIENKO, 1985, SUGIMOTO, 1974, EUA Pat.4,285,976, 1981). Na patente americana (EUA Pat.4,264,628, 1981) sugere-se que a adição de alguns agentes não é desejável se for para serem incorporados em produtos alimentícios. Nela se relata um processo para a produção de um autoliasado de levedura, na presença de um material selecionado de um grupo de ácidos graxos, tendo de 4- 14 átomos de carbono e seus mono, di ou triglicerídeos.

Na patente americana (EUA Pat.4,285,976, 1981) descobriram que a autólise pode ser acelerada pela presença de tiamina e/ou piridoxina, à concentrações no mínimo de 0,01% do peso da levedura. Também concluíram que o aumento gradual da temperatura de incubação de 20 até 180 minutos aumenta a taxa de autólise.

CHRENOVA *et al.* (1981) para determinarem as condições ótimas de ativação das endoenzimas da levedura (nucleases, proteases) investigaram o efeito de vários cations metálicos (Mg, Ca e Zn usando 0,1 a 0,6% de concentração dos sais) sobre a autólise da levedura de panificação, na faixa de temperatura de 45 a 60°C. Critérios para avaliação do processo incluíam a taxa inicial de autólise, rendimento de produtos de degradação de proteínas e constituintes de ácidos nucléicos. Os resultados mostraram que a adição de íons tem pouco efeito na estrutura da célula, mas tem um efeito estabilizador sobre as endoenzimas. O rendimento de constituintes de proteínas e de ácidos nucléicos aumentou.

KOJIN, segundo HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) patenteou um processo de obtenção de extrato protéico com sabor melhorado combinando um solvente orgânico miscível em água, preferivelmente etanol, *n*-propanol ou *n*-butanol, com uma solução de extrato de levedura comestível e decantando para remover componentes solúveis. O extrato viscoso de levedura final, é desidratado num secador a vácuo até eliminação do solvente e é adicionada água para formar uma pasta ou continua para secagem em "spray drier" para obtenção de um pó.

A patente americana (EUA Pat. 4,303,680, 1981) apresenta um outro processo para melhorar o sabor do extrato de levedura em que este contém o aromatizante 5'-nucleosídeo e aroma mais encorpado. As células de levedura são suspensas na presença de estimuladores da autólise num pH de 6,0 a 6,6. A suspensão autolisada é aquecida para 90 a 110°C durante 1 a 3 horas para extrair o RNA intracelular e as seguintes etapas foram efetuadas: (1) hidrólise do RNA extraído com 5'-fosfodiesterase e (2) separação do extrato resultante do resíduo insolúvel. O produto final pode ser usado como um componente em formulações de temperos.

II.3- TEOR DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DOS EXTRATOS

Um dos maiores problemas que limitam o consumo de células microbianas ou de suas proteínas isoladas é o alto nível de contaminação dessas preparações por ácidos nucleicos (VANANUVAT & KINSELLA, 1975a; SINSKEY & TANNEMBAUM, 1975). O teor varia de 8 a 25 g de ácidos nucleicos/100 g de proteína em várias células, grande parte presente como RNA (ácido ribonucleico).

Sob o ponto de vista nutricional, o consumo de altos níveis de ácidos nucleicos na dieta, acima de 2 g/dia, causa desordens como: uricemia, gota e formação de pedras nos rins (WASLIEN *et al.*, 1970). Por isso, antes da proteína da levedura ser usada como fonte protéica para consumo humano, o teor de ácidos nucleicos deve ser reduzido para níveis seguros. Existem vários métodos disponíveis para tal fim (Tabela 2), que envolvem um tratamento químico ou enzimático das células de levedura homogeneizada (NEWELL *et al.*, 1975; SHETTY & KINSELLA, 1979).

O teor de ácidos nucleicos é regulado pela taxa de crescimento das células da levedura. A redução dessa taxa seria economicamente inviável, pois, ao contrário o que se pretende sempre é um processo rápido de crescimento celular (HEDENSKOG & EBBINGHAUS, 1972).

Um apreciável número de processos para redução dos ácidos nucleicos tem sido publicado. Essa variedade é uma indicação do constante interesse no assunto, mas também sugere que muitos procedimentos são aplicáveis somente a um tipo particular de microorganismo.

A extração alcalina sob condições drásticas é um método clássico, bastante efetivo e largamente usado para reduzir o teor de ácidos nucleicos especialmente a temperaturas elevadas (HEDENSKOG & MOGREN, 1973). HEDENSKOG & EBBINGHAUS (1972) constataram que a

presença de cloreto de sódio durante o aquecimento influenciou positivamente os resultados, aumentando a faixa de pH alcalino na qual ocorre um aumento na remoção de RNA. A desvantagem deste método é, como já foi anteriormente mencionado, a alteração das proteínas com conseqüente perda do valor nutritivo e propriedades funcionais (HEDENSKOG & MOGREN, 1973). A patente americana (EUA Pat. 4,135,000, 1979) apresenta um processo para redução dos ácidos nucleicos baseado na adição de zinco na levedura. O metal age como um fator protetor da RNase durante o tratamento alcalino para extração da proteína. Alcançou-se melhores resultados incubando a 60°C e pH 6.

LINDBLOM & MOGREN (1974) adicionaram 4% de NaCl a uma solução de células homogeneizadas e notaram uma extraordinária redução entre 48 e 62°C e pH 5 a 9. Para LINDBLOM (1977) o cloreto de sódio melhora a degradação dos ácidos nucleicos pelas RNase endógenas. Extração com álcali ou solução salina tem a vantagem que o RNA pode ser recuperado como um subproduto.

Segundo TREVELYAN (1975) os ácidos nucleicos podem ser extraídos da proteína unicelular pelos ácidos perclórico e tricloroacético (0,5-1,0 M), sendo ambos precipitantes da proteína, uma propriedade que é aplicada para propósitos analíticos. A redução de RNA com ácido não é comercialmente atrativa por causa do custo do equipamento que tem que ser ácido-resistente, e por causa do problema do despejo dos efluentes, sempre presente em indústrias de fermentação.

Embora a redução de ácidos nucleicos seja possível usando-se ácido clorídrico, esse procedimento não é comumente usado em laboratório e produção em larga escala. Em experimentos recentes TREVELYAN (1976a) encontrou que ácido clorídrico (concentração 0,5 a 0,1 N) extraiu RNA de levedura, a temperatura ambiente, com relativamente pequena perda de sólidos.

Num experimento seguinte, TREVELYAN (1978) mostrou que o sal (NaCl) potencializou a ação do ácido clorídrico. Operando a 60- 80°C a concentração do ácido requerido podia ser consideravelmente reduzida. Baseado nesses resultados o autor reportou um procedimento para redução dos ácidos nucléicos que usa cloreto de sódio, contém uma solução de ácido clorídrico e o tratamento térmico é moderado.

KINSELLA & SHETTY (1978) desenvolveram um novo método para extração de proteína da levedura para produção de isolados e concentrados protéicos de levedura a partir da succinilação da proteína. Este procedimento resultou num alto rendimento protéico acompanhado de uma redução efetiva do teor de ácidos nucléicos. A desvantagem deste método é que o produto final é uma proteína succinilada e não pode ser removida sob condições moderadas. É indesejável que essa proteína seja usada como principal fonte protéica na dieta. De acordo com CHEFTEL *et al.* (1989) do ponto de vista nutricional, um alto grau de succinilação reduz a disponibilidade biológica dos resíduos de lisina.

Recentemente descobriram-se vários agentes modificadores reversíveis (anidrido citracónico e anidrido maléico) e aplicaram-se em diferentes proteínas, incluindo proteínas de leveduras (SHETTY & KINSELLA, 1980, 1982). Esses agentes rompem as interações eletrostáticas e separam as proteínas dos ácidos nucléicos e subsequentemente removem-se os grupos modificadores sob condições moderadas. Como com a succinilação a adição de cargas negativas ao grupo *épsilon*-NH₂ da lisina desestabiliza o complexo nucleoprotéico supramolecular pela ruptura das ligações não covalentes. Isso facilita a separação dos derivados protéicos aniônicos do RNA pela precipitação isoeletrica a pH 4,2. A citraconilação é tão efetiva quanto a succinilação na preparação de isolados protéicos com baixa contaminação por ácidos nucléicos (menos de 2% de RNA) e alto rendimento. A desacilação das proteínas foi realizada por incubação das proteínas citraconiladas (maleinatadas) numa dispersão ligeiramente ácida a 30-50°C (SHETTY & KINSELLA, 1979).

DAMODARAN & KINSELLA (1984) e HUANG & KINSELLA (1985, 1986) devido ao baixo custo e segurança da acilação reversível resolveram estudar a fosforilação como método de separação do RNA. A fosforilação das nucleoproteínas da levedura via grupos *epsilon*-NH₂ da lisina usando oxicloreto de fósforo (POCl₃) a pH 9, reduziu progressivamente o teor dos ácidos nucleicos e, quando 30% dos grupos *epsilon*-NH₂ disponíveis foram fosforilados obteve-se 90% de redução do teor de RNA na proteína isoeletricamente precipitada. CHEN *et al.* (1986) reportaram o uso de trimetafosfato de sódio (STMP) na fosforilação das proteínas de levedura com bons resultados.

Outra metodologia usada para remover os ácidos nucleicos da suspensão das células de levedura é a utilização das próprias enzimas ribonucleases (RNases) endógenas. TANNENBAUM *et al.* (1975) concluíram que a RNase pode ser ativada por choque térmico a 68°C durante poucos segundos, seguido de um período de incubação de 2 horas a 52,5°C. Com esse tratamento, o teor de ácidos nucleicos pode ser reduzido de 7 a 8% para 1 a 2%. Variações aproximadas foram reportadas por CANEPA *et al.* (1972) e SINSKEY & TANNENBAUM (1975). Infelizmente o processo é associado com o aumento de atividade das enzimas proteolíticas e com perda de proteína. Sob essas condições descritas pelos autores, o teor de ácidos nucleicos pode ser reduzido de 7,5 a 9,0% para 1,5 a 2,0%, sem perda de proteína nas células da levedura *Candida*.

LINDBLOM (1977) constatou que o choque térmico não pode ser usado para redução de ácidos nucleicos na *Saccharomyces cerevisiae*. HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) ao estudarem o efeito do choque térmico na atividade de vários tipos de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *C. guilliermondii* e *Rhodoturula glutinis*, também constataram que a RNase da *Saccharomyces cerevisiae* também não é ativada. Tratamento térmico acima de 45°C causou sempre uma diminuição da atividade da RNase. No caso da *Rhodoturula glutinis* e *Candida guilliermondii* a ativação de RNase foi observada a 60 e

68°C, respectivamente. O autor sugeriu que a ativação pelo choque térmico provavelmente seja associada com a rápida inativação de proteínas inibidoras de RNase sensíveis ao calor, presentes em diferentes quantidades nas diferentes espécies de leveduras ou então com uma desnaturação do substrato, que o torna mais disponível ao ataque enzimático. Ele achou que com base nessa hipótese se explica as diferenças observadas nas diferentes espécies de levedura.

Nas células de levedura, o RNA está localizado no núcleo, mitocôndria, ribossoma e citoplasma. RNase tem sido encontrada nos vacúolos e associada com os ribossomas (DANNER & MORGAN, 1963; OHTAKA & UCHIDA, 1963). LINDBLOM & MOGREN (1974) num trabalho em que investigam a eficiência da desintegração mecânica associada a presença de NaCl, opinam que a desintegração mecânica provavelmente causa uma destruição da organização subcelular conduzindo a novas possibilidades para a RNase atuar sobre o RNA. Para o NaCl, DANNER & MORGAN (1963) encontraram que a RNase ribossomal em extratos livres de células da *Saccharomyces cerevisiae* é ativada na presença de 3% de NaCl. OHTAKA & UCHIDA (1963) também observaram o mesmo quando as células foram incubadas em soluções de 3% de NaCl e temperaturas superiores a 20°C. Em adição, sob estas condições o RNA ribossomal foi desnaturado e se tornou sensível a RNase. Segundo LINDBLOM & MOGREN (1974) estas observações podem explicar até certo ponto, o papel do NaCl na degradação enzimática do RNA. Para SINSKEY & TANNENBAUM (1975) a adição de anions carboxílicos durante o processo de choque térmico facilita a redução de ácidos nucleicos.

O uso de enzimas exógenas para remoção dos ácidos nucleicos também é possível. No entanto, essa metodologia exige preparações enzimáticas livres de outras enzimas, principalmente proteases, e adequadas para uso alimentar, o que eleva seu custo. Na patente americana (EUA Pat.4.135.000, 1979) reportou-se que RNase pancreática exógena podia ser usada. CASTRO *et al.* (1971) também relatou o uso de ribonuclease pancreática bovina A para hidrolisar RNA, depois do choque térmico inicial. Devido ao alto custo dos

preparados de enzimas exógenas, procedimentos baseados em RNases exógenas não são práticos para uso em produção em larga escala.

A redução do teor de ácidos nucléicos é importante não só na levedura inteira mas também no seu isolado protéico se é para ser usado como um ingrediente alimentar. Quando a proteína solúvel é precipitada a pH 4,3-4,5, o ácido nucléico é co-precipitado, resultando num isolado protéico com alto teor de ácido nucléico. LINDBLOM & MOGREN (1974) reportaram que incubando uma pasta de levedura homogeneizada a pH 5,6 e 50°C na presença de 3% de NaCl durante 20 minutos, o teor de ácidos nucléicos pode ser reduzido para 1,4%.

LANFORD *et al.* (1979) desenvolveram um procedimento interessante para reduzir o teor de ácidos nucléicos de isolados protéicos. Nele a proteína é solubilizada em uma solução tampão de citrato-fosfato (pH=7 a concentração de 0,1M) e brometo de acetil-trimetil-amônio é acrescentado. O RNA forma um complexo insolúvel com este reagente e o precipitado pode ser removido. Após o tratamento o teor de ácidos nucléicos do isolado protéico é reduzido a um valor inferior a 3%.

Tabela 2: Resumo de alguns métodos investigados para redução de RNA nos isolados protéicos de levedura

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Diminuição da taxa de crescimento durante a fermentação.	Projeto apropriado do fermentador.	Redução limitada do RNA, baixa produção de proteína.
Hidrólise alcalina pH 10-10.5, 90°C, 1-4 horas pH 11.5, 60°C, 1-2 horas	Simples, rápido	Perda de proteína (30%), destruição de aminoácidos, formação de lisinoalana, desnaturação da proteína.
Ribonuclease exógena, 56°C, pH 6.7-8.0	Simples, rápido	Custo da enzima, proteólise reduz o rendimento protéico.
RNAase endógena, choque térmico a 68°C, incubação a 52,5°C durante 2 horas.	Simples, econômico	Processo lento, proteólise reduz rendimento protéico.
Succinilação	Alto rendimento, boas propriedades	Grupo succinil, segurança, custo.
Citraconilação, descitraconilação	Alto rendimento, nenhum resíduo químico. Propriedades funcionais.	Reação química complicada, custo, segurança.
Sais caotrópicos	Extração simples	Desnaturação de algumas proteínas.
Fosforilação	Reação simples, aceitável nutricionalmente, boas propriedades funcionais	Custos, químicos corrosivos
Sulfitólise	Simples, efetivo	

Fonte: KINSELLA, J.E. (1976)

II. 4- PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Na produção de alimentos as palavras propriedades funcionais da proteína são fortemente ligadas com as operações incluídas no processamento do alimento e também com as propriedades físicas do produto final.

Alguns autores como KINSELLA (1976), KINSELLA (1981), WOLF (1970) têm relacionado o conceito de propriedade funcional com as características físico-químicas mais relevantes das proteínas, as quais influem notoriamente nos processamentos de alimentos. Este conceito enquadra as proteínas em relação a sua função utilitária para a indústria.

As diferentes propriedades funcionais têm sido classificadas de acordo com as características e propriedades físico-químicas das proteínas. São várias as propriedades funcionais que intervêm habitualmente em cada alimento (Tabelas 3 e 4). O objetivo dos investigadores é encontrar uma explicação mecânica do comportamento funcional, mas o estado atual dos conhecimentos, assim como a complexidade dos diversos sistemas alimentícios, não permite compreender de forma clara, como uma estrutura protéica concreta condicionará, por exemplo, a textura final de um alimento. Precisamente, uma das dificuldades surge porque frequentemente, se modifica a estrutura inicial da proteína, quando o ingrediente protéico ou a proteína alimentícia se transforma no complexo alimentício final (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Tabela 3: Classes gerais de propriedades funcionais de proteínas importante para aplicação em alimentos.

Propriedade geral	Propriedade funcional específica
Organolética	Cor, sabor, textura
Ligante	Solubilidade, dispersibilidade, absorção de água, capacidade de retenção de água, inchação, gelatinização, formação de de massa de farinha, absorção de gordura
Texturização	Formação de fibra, extrusão, plasticidade
Propriedades de superfície	Propriedades de emulsificação e de formação de espuma

Fonte: CHEFTEL et al. (1989).

Tabela 4: Propriedades funcionais típicas de preparações protéicas

Propriedade funcional	Modo de ação	Alimento
Hidratação, absorção de água, ligação de água	Ligação de água com hidrogênio	Carne, produtos cárneos e de panificação
Solubilidade	Solubilização de proteínas	Bebidas
Viscosidade	Espessamento, ligação de água	Sopas, molhos, condimentos
Gelatinização	Formação de matriz protéica	Carne, coalho, queijo, produtos de panificação
Emulsificação	Formação e estabilização de emulsões de gordura	Crems, produtos cárneos, sopas, condimentos, bolos alimentos de bebê
Formação de espuma	Formação de filmes estáveis, imobilização de gases	Doces aerados
Coesividade, Adesividade	Proteína como material aderente	Carne, produtos cárneos e de panificação
Elasticidade	Ligação hidrofóbica, ligações S-S em gel	Carne, produtos de panificação
Absorção de gordura	Ligação de gordura livre	Bolos, Produtos cárneos
Absorção de aroma	Adsorção, absorção	Todos alimentos
Mudanças de fase durante aquecimento	Desnaturação	Produtos cárneos

Fonte: HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

O melhor conhecimento da funcionalidade de uma proteína pode obter-se quando o constituinte protéico do sistema teórico a ensaiar é uma proteína única, purificada e de estrutura conhecida. No entanto, a maior parte dos ingredientes protéicos disponíveis para uso industrial, são misturas de proteínas que contêm quantidades apreciáveis de glicídeos, lipídeos, sais minerais, polifenóis, etc. Ainda que os isolados protéicos contenham menos constituintes não protéicos, como foram expostos a tratamentos importantes (métodos de extração, precipitação, concentração, pH, força iônica e temperatura), sua estrutura inicial e funcionalidade podem resultar afetados (KNORR, 1980).

Além disso, a falta de padronização da metodologia empregada no estudo da propriedade funcional de uma nova proteína dificulta a avaliação por comparação de resultados. Diversos autores (KINSELLA, 1976, SCHOEN, 1977) têm revisado métodos utilizados para determinação da funcionalidade das proteínas, e insistem na necessidade de melhorar e padronizar os testes realizados.

Como os ensaios de utilização são custosos e exigem muito tempo, cada dia se utilizam mais as provas com sistemas teóricos, mas os problemas inerentes a esta aproximação são duplos: 1) estas provas não estão suficientemente normatizadas e 2) frequentemente ocorre que os resultados das provas com sistemas teóricos não são equivalentes com os obtidos sobre sistemas reais (ensaios de utilização) (CHEFTEL *et al.*, 1989).

As propriedades funcionais das proteínas alimentícias podem ser classificadas em três grupos principais:

- 1) propriedades de hidratação (dependente das interações proteína-água)
- 2) propriedades dependentes das interações proteína-proteína
- 3) propriedades de superfície.

Vários fatores como a concentração protéica, pH, temperatura, tempo, força iônica e presença de outros componentes afetam essas interações. A maioria das propriedades funcionais são determinadas pelas inter-relações entre essas forças (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Na pesquisa de uma nova proteína, as propriedades de hidratação ou hidrofílicas, principalmente a solubilidade, são as primeiras a serem avaliadas, uma vez que constituem uma indicação do potencial de aplicação em alimentos, além de indicar a viabilidade da extração, determinando se a fonte é ou não viável, uma vez que dados de solubilidade representam o próprio rendimento da extração (HUTTON & CAMPBELL, 1977).

BETSCHART (1974) e LAWHON & CATER (1971) descreveram os passos básicos na determinação da solubilidade de uma proteína que consistem na dispersão da proteína em água, no ajuste do pH com HCl ou NaOH até o pH desejado, centrifugação da solução ou dispersão e determinação do teor de nitrogênio no sobrenadante. Diferentes autores têm usado concentrações de proteína de 0,2%; 0,5% e 1%, sendo 1% a mais usada. Os resultados podem ser expressos em IPD (índice de Proteína Dispersível) ou INS (índice de Nitrogênio Solúvel). Normalmente se usa o INS como método para caracterizar a solubilidade de isolados e concentrados protéicos (McWATTERS & HOLMES, 1979).

A solubilidade de proteínas da levedura, especialmente em pH comum nos alimentos, é muitas vezes inferior ao de outras proteínas, como da soja. Contudo, proteínas solúveis na água e sal ou a maior parte das proteínas de leveduras nativas, o processo de extração, precipitação e secagem, podem mudar estas propriedades e aumentar a parte insolúvel das proteínas. Tratamento térmico e tratamento alcalino a altas temperaturas diminui a solubilidade (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Um perfil típico da solubilidade das proteínas da levedura é mostrado na Figura 1.

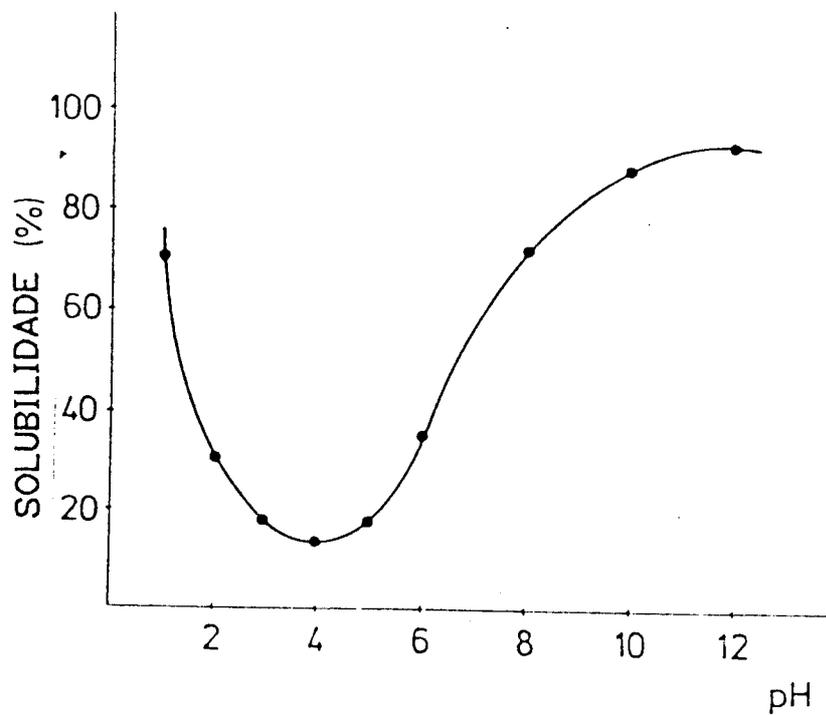


Figura 1: Perfil típico da solubilidade das proteínas de levedura
Fonte: HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991.

Como se pode ver na Figura 1, a mínima solubilidade é observada a pH 4-4,5 e a maior solubilidade pode ser obtida a pH alcalino.

Vários métodos têm sido estudados para modificar a estrutura de novas proteínas para melhorar suas propriedades funcionais para aplicação específica no alimento. Um deles tem sido a modificação química das proteínas mediante a acetilação ou succinilação e, estudos têm sido realizados em proteínas de soja (FRANZEN & KINSELLA, 1976b), farinha de semente de algodão (CHILDS & PARK, 1976), proteínas foliares (FRANZEN & KINSELLA, 1976a), proteína de peixe (GRONINGER, 1973) e proteínas de leveduras (KINSELLA & SHETTY, 1979).

Em geral, as propriedades funcionais como solubilidade e capacidade de emulsificação, foram melhoradas pela acetilação e succinilação. Diferentes reagentes podem ser usados para acilação, entre eles, anidrido acético e anidrido succínico são largamente usados. Contudo não é somente possível a acetilação e succinilação, mas também a formilação, propionilação, etc. Alguns anidridos ácidos causam modificações reversíveis de ambos *alfa* e *épsilon* amino-grupos (NEURATH & HILL, 1976). Segundo SCHNEIDER *et al.* (1986) na prática da acilação de preparações de proteína para serem usadas com propósitos alimentícios a acetilação tem sido investigada mais profundamente. Geralmente a acetilação melhora a estabilidade térmica e reduz a coagulação térmica e precipitação. Algumas outras propriedades funcionais podem ser modificadas. A succinilação também pode modificar ambos *alfa* e *épsilon* amino-grupos das proteínas. Devido ao fato de o ácido succínico possuir dois grupos carboxílicos, após a acilação um novo grupo negativamente carregado será introduzido na proteína. Repulsões electrotáticas resultantes de aniões succinato alteram a conformação da proteína e então a penetração de moléculas de água se torna fisicamente mais fácil por causa do estado desenrolado (estendido) dos polipéptidos.

CANELLA *et al.* (1979) estudaram recentemente os efeitos da acetilação e succinilação sobre as propriedades funcionais do concentrado protéico de girassol que havia sido tratado com ácido e etanol para remover o ácido clorogénico (o maior problema no uso de

proteína de girassol em alimentos é a presença deste ácido que causa descoloração e o alto teor de globulinas que possuem baixa solubilidade em água a pH inferior a 8). Eles constataram que os derivados acil incrementaram a solubilidade, emulsificação e propriedade espumante mas diminuíram a absorção de água. No entanto estes resultados não podem ser generalizados e assumidos para todas as proteínas de girassol pois o tratamento etanol-ácido causa isoladamente perda de certas propriedades funcionais (CANELLA, 1978).

Para VANANUVAT & KINSELLA (1978) o perfil de pH de solubilidade de proteínas de levedura succinilada revelou um aumento típico de solubilidade entre pH 4 e 6. As amostras succiniladas tornaram-se insolúveis abaixo do ponto isoelétrico a medida que o grau de succinilação aumentou. Significativamente proteínas de leveduras succiniladas foram muito estáveis a precipitação térmica acima do pH 5, isto é, elas permanecem solúveis a temperaturas acima de 100°C. A medida em que o grau de succinilação aumentou, a taxa de precipitação de proteínas derivadas aumentou na vizinhança do ponto isoelétrico e obtiveram-se flocos maiores de proteínas, facilitando a sua recuperação (McELWAIN *et al.*, 1975).

SCHNEIDER *et al.* (1986) ao investigarem isolados protéicos acetilados de (broad bean) feijão comum observaram um aumento da capacidade emulsificante e propriedade gelificante do isolado. As mudanças eram dependentes do grau de acetilação. Eles constataram também que a acetilação de isolados protéicos de levedura aumentou a solubilidade da preparação protéica. Foram observadas alterações muito ligeiras nas outras propriedades funcionais. Como foi mencionado anteriormente (ítens II.2.2. e III) a succinilação também é um bom método de extração de proteínas da levedura e para a produção de preparados protéicos com baixo teor de ácidos nucleicos.

Outra importante propriedade funcional relacionada à interação de proteínas com água é sua capacidade de absorção ou

retenção de água.

A absorção de água de isolados e concentrados protéicos de células de levedura varia na faixa de 3,0 a 4,0mL/g de amostra. Estes valores são comparáveis ou inferiores a capacidade de retenção de água de proteína de soja não aquecida (KINSELLA, 1976). HUMPHRIES (1982) explica que a propriedade de absorver água pode variar de acordo com o método de obtenção e concluiu que os tratamentos com solventes orgânicos para extrair ou fracionar as proteínas, resultam num decréscimo da capacidade de absorver água.

Nem sempre é correto afirmar que as proteínas devem ter uma elevada solubilidade inicial para que as outras propriedades funcionais sejam boas. A absorção de água de um ingrediente protéico pode, algumas vezes, melhorar com uma prévia desnaturação e insolubilização. Mesmo assim, algumas vezes, após a desnaturação e insolubilização parcial se mantém a gelificação (CHEFTEL *et al.*, 1989). Segundo o mesmo autor, tudo isso está de acordo com o fato de que a formação de emulsões, espumas e géis, pressupõe diversos graus de desdobramento, agregação e insolubilização da proteína.

O estudo da capacidade gelificante das proteínas alimentícias é muito importante. Denomina-se gelificação quando as moléculas desnaturadas se agregam para formar uma rede protéica ordenada (HERMANSSON, 1978). Segundo FERRY (1948) os géis de proteínas só podem ser formados quando o balanço de forças atrativas e repulsivas atingir o equilíbrio. Ele divide o processo de gelificação em duas etapas: 1) desnaturação parcial da proteína nativa, abrindo suas cadeias polipeptídicas e 2) associação gradual para formação da matriz do gel, desde que as forças atrativas e repulsivas, e as condições termodinâmicas o permitam.

A gelificação protéica não se aplica sómente para formação de géis sólidos viscoelásticos, mas também para melhorar a absorção de água, o espessamento, a união de partículas (adesão) e para

estabilizar emulsões e espumas (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Proteínas globulares podem formar géis sómente a altas temperaturas e esses géis são muito fracos. Na maioria dos casos é indispensável um tratamento térmico para conseguir a gelificação. Pode necessitar-se um esfriamento posterior e às vezes, resulta aconselhável uma acidificação ligeira. Em alguns casos pode necessitar-se de adição de sais, concretamente cálcio, o que aumenta a velocidade de gelificação e/ou firmeza do gel (caso das proteínas de soja, soro de leite e albumina). No entanto, várias proteínas podem gelificar-se sem aquecimento, com unicamente uma hidrólise enzimática moderada (micelas de caseína, clara de ovo, fibrina), uma simples adição de cálcio, (micelas de caseína) ou alcalinização seguida de um retorno a neutralidade ou ao ponto isoeléctrico (proteínas de soja) (CHEFTEL *et al.*, 1989).

A dissociação e desdobramento das moléculas protéicas geralmente aumenta a exposição de grupos reativos, especialmente grupos hidrofóbicos de proteínas globulares. Interações proteína-proteína são contudo favorecidas e são normalmente a principal causa da subsequente agregação. No entanto, proteínas com alto peso molecular e alta percentagem de aminoácidos hidrofóbicos tendem a estabelecer fortes redes. Interações hidrofóbicas são melhoradas a altas temperaturas e a formação de ligações de hidrogênio é favorecida pelo arrefecimento. O aquecimento pode expor também os grupos internos tiol a formação ou troca de ligações S-S. A presença de um grande número de grupos SH e S-S forçará a rede intermolecular e terá tendência a fazer o gel térmicamente irreversível (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Diferentes alimentos requerem diferentes propriedades funcionais. Por exemplo em sistemas alimentares de carnes cominuidas boas propriedades adesivas, capacidade de retenção de água, estabilidade da emulsão e gelificação durante o cozimento são propriedades importantes das proteínas constituintes. Mas nenhuma

proteína alimentar possui todas as propriedades requisitadas, e a proteína da levedura não constitui exceção (KINSELLA, 1976).

Proteínas obtidas por métodos de ruptura e extração convencional das células tendem a desnaturar, possuem pobre solubilidade e tem uso limitado em alimentos (VANNUVAT & KINSELLA, 1975b). Métodos melhorados de isolamento de proteínas microbianas com boas propriedades funcionais são necessários. SCHNEIDER *et al.* (1986) investigando isolados de proteína acetilada de feijão notaram um aumento da capacidade gelificante do isolado. Ao experimentarem o mesmo método no isolado protéico de levedura acetilada o melhoramento foi muito ligeiro.

HUANG & KINSELLA (1986) investigaram intensivamente algumas propriedades funcionais da proteína fosforilada de levedura em vários pHs (5-8). Acima do pH 6.0 observaram um gel semi-transparente semelhante a uma pelota ("pellet") quando dispersões de proteína de levedura fosforilada foram centrifugadas. A adição de sal causou um decréscimo acentuado da quantidade de água ligada.

Devido a importante função na estabilidade de emulsões em alimentos normalmente se estudam as suas propriedades de emulsificação (VANANUVAT & KINSELLA, 1975b; KINSELLA, 1976; HUANG & KINSELLA, 1987). Para se comparar as propriedades emulsionantes das proteínas utiliza-se fundamentalmente dois testes:

1) Capacidade de emulsificação (CE) que é o volume de óleo (mL) que se pode emulsionar por grama de proteína até que se produza a inversão de fase. Para esta prova agita-se uma solução ou dispersão aquosa (ou salina) de proteína, enquanto se adiciona continuamente e a velocidade constante, o óleo ou gordura fundida. A inversão de fase se nota pela diminuição acusada da viscosidade, a mudança de cor (especialmente se está presente um corante lipossolúvel) ou pelo aumento da resistência elétrica.

2) Estabilidade de emulsão (EE) se expressa, frequentemente, por:

$$\frac{\text{Volume da emulsão final}}{\text{Volume da emulsão inicial}} \times 100$$

depois de centrifugar a emulsão a baixa velocidade ou depois da decantação depois de várias horas (precedidas ou não de um aquecimento). O teor de óleo liberado nessas condições é reportado como índice de estabilidade da emulsão.

YATSUMATSU *et al.* (1972) desenvolveram um indicador, Atividade de emulsão, que envolve o mesmo procedimento adotado na determinação da Estabilidade da emulsão, e tem sido usado em várias pesquisas (WANG & KINSELLA, 1976; HUANG & KINSELLA, 1987).

Numerosos produtos alimentícios são emulsões (leite, cremes, gelados, queijo fundido, maioneses, carnes finamente picadas como as utilizadas para salsichas, etc) onde os constituintes protéicos têm, frequentemente, um papel preponderante na estabilização destes sistemas coloidais (HALLING, 1981). As proteínas atuam como agentes emulsificantes devido a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis tornando possível a mistura dos dois. O que possibilita esse fenômeno é o fato de a proteína ter natureza anfotérica e flexível, apresentando regiões hidrofóbicas e hidrofílicas com localizações distintas em sua estrutura.

Segundo FENNEMA (1985) proteínas da carne e peixe, isolados protéicos de soja, micelas de caseína, globina do plasma e sangue, são exemplos de proteínas com boa ação emulsificante. Caseinatos possuem uma estrutura dissociada e não compactada, alta solubilidade e regiões hidrofílicas e hidrofóbicas bem separadas nos polipeptídeos, o que lhes confere boa ação emulsificante. No entanto, proteínas globulares, como lisozima, proteínas do soro de leite, ovoalbumina com estrutura compacta e estável apresentando alto poder hidrofílico, não produzem emulsão, a menos que sejam submetidas a algum tratamento para que sejam dissociadas sem perda

da solubilidade.

VANANUVAT & KINSELLA (1978) ao estudarem as propriedades funcionais dos isolados protéicos de levedura succinilada, observaram que a atividade emulsificante melhorou significativamente em relação a proteína da levedura não modificada. Para McELWAIN *et al.* (1975) a succinilação aumentou a viscosidade da emulsão das proteínas da levedura e diminuiu a estabilidade da emulsão. SUNG *et al.* (1983) ao testarem os isolados protéicos de levedura com baixos teores de ácidos nucléicos, obtidos por fosforilação química (Trimetafosfato de sódio), registraram uma melhoria na capacidade emulsificante.

São numerosos os fatores que influenciam as características das emulsões e os resultados dos ensaios de emulsificado: tipo e desenho do equipamento, intensidade do aporte energético, velocidade de adição do óleo, volume da fase lipídica, temperatura, pH, força iônica, presença de açúcares, presença de surfactantes de baixo peso molecular, exposição ao oxigênio, características do óleo (ponto de fusão), concentração em proteína solúvel e propriedades emulsionantes da proteína. Estes fatores explicam, que a comparação de dados obtidos pelos pesquisadores da área é muito difícil, devido a não padronização das condições de determinação (HALLING, 1981; KINSELLA, 1976).

KINSELLA (1976) e COONEY *et al.* (1980) ao estudarem algumas propriedades funcionais das proteínas concordaram que as características emulsificantes dos preparados protéicos de levedura variam numa larga faixa dependendo do procedimento de produção. Quando extraídas em meio alcalino e precipitadas por um ácido, mostraram comportamento similar ao isolado de soja.

VANANUVAT & KINSELLA (1975a) estudaram proteínas de levedura *Saccharomyces fragilis* crescida em lactose e rompida por homogeneização em moinho de bolas. Extraíram a proteína com uma

solução de NaOH 0.4% ou água e a seguir precipitaram-na a pH=4 e temperatura de 26°C, ou por aquecimento a 80°C e pH=6. Seguidamente agitaram uma suspensão aquosa de 7% de proteína, adicionaram óleo vegetal, centrifugaram a 20°C e determinaram a atividade emulsificante. Para diferentes preparações protéicas de levedura obtiveram 51-59% de atividade emulsificante, comparando com valores de 46% conseguidos para isolados protéicos comerciais de soja. A proteína extraída com álcali e precipitada por tratamento térmico (80°C) não demonstrou nenhuma atividade emulsificante.

II.5- USO DE AUTOLISADOS E HIDROLISADOS DE LEVEDURA NA FORMULAÇÃO DE ALIMENTOS

A história do uso de hidrolisados protéicos como aromatizantes data de centenas de anos. O processo original surgiu na China. Mais recentemente se espalhou por outros países do Extremo Oriente e, por influência Chinesa e Japonesa, na Europa e América do Norte. O aromatizante original era produzido usando enzimas presentes no seu estado natural. O desenvolvimento da hidrólise de proteínas usando ácidos iniciou-se somente no século passado e atualmente a proteína vegetal hidrolisada é somente produzida desse modo (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

A importância do extrato de carne como fonte de aroma tem declinado rapidamente não somente por causa da melhoria dos métodos de armazenamento e transporte da carne e conseqüentemente, o decréscimo da disponibilidade do extrato de carne, mas também, por causa do desenvolvimento gradual de aromas de carne. Enquanto o uso de extrato de carne tem declinado, o papel dos autolisados de levedura tem crescido em importância. Os produtos se tornam cada vez mais sofisticados; devido ao desenvolvimento de variedades de leveduras com melhoramento do sabor também devido à maior compreensão de quais componentes são importantes em paralelo com o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo e de autólise de

leveduras com o máximo de retenção desses componentes (SCHMIDT, 1987 e TULEY, 1986).

Autolisado de levedura é usado não sómente como material aromatizante mas em alguns casos também como um ingrediente melhorador das propriedades físicas e nutricionais dos produtos alimentícios (TISOVSKI *et al.*, 1985). Também pode ser usado como precursor do sabor em formulações de temperos para produtos processados de carne (SCHMIDT, 1987).

A Bovril Food Ingredients Company tem um processo para a produção de diferentes autolisados de levedura, com o nome comercial Yatex, em que a levedura de cerveja é usada como matéria prima (TULEY, 1986).

Um grande número de patentes concorda com a produção de autolisados de levedura baseada na preparação de aromas. HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) relata um trabalho em que ANDRES descreve seu uso como realçante do aroma em alimentos contendo queijo. A preparação pode ser pasteurizada sem perda do aroma. No mesmo trabalho HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) descrevem o processo em que KONRAD & LIESHE patentearam a preparação de um material com aroma de frango. Ele é recomendado para uso em sopas, molhos, temperos, produtos de padaria e "snacks".

MURRAY (1983) discutiu o uso de vários autolisados de levedura como aromatizantes (Zyest), para reduzir o amargor do KCl, usado como substituto do NaCl, e para melhorar o gosto do alimento. Ele dá vários exemplos de alimentos em que esses produtos são efetivos: linguiça, margarina, snacks, presunto, misturas de sopa, etc.

Produtos autolisados de levedura (Zyest-70, Zyest-45, etc; produzidos por Pure Culture, Inc.) preparados a partir da levedura *Candida utilis* são recomendados para vários propósitos (AUTOLYSED

YEAST ENHANCE...., 1981). Produtos Z yeast são adequados para alimentos com baixo teor de sal. Z yeast-70 é recomendado para melhorar o sabor de alimentos que contêm carne de frango e suíno e outras carnes. Z yeast-45 é recomendado para uso em alimentos de aves com baixo teor de sódio e outras carnes com alto teor de sal. Z yeast-FM confere um sabor grosseiro adequado para uso em produtos de cogumelos e queijos.

PARKS *et al.* (1986) investigaram o efeito dos autolisados na firmeza, aroma e rendimento de salsichas frankfurter. Salsichas defumadas em laboratório não foram significativamente afetadas pela adição de 1% de autolisado. Salsichas produzidas comercialmente contendo 0 a 1,5% de autolisado foram sujeitas a avaliação sensorial e de rendimento. Produtos com 0,75 a 1% de autolisado foram mais firmes que o control. As salsichas embaladas à vácuo contendo autolisado, e penduradas durante 2 a 6 semanas a 2- 5°C, mostraram menos acumulação de umidade na embalagem que o grupo controle.

SLYUSARENKO *et al.* (citados por HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991), usaram extrato de levedura para substituir a carne na produção de salsichas. As propriedades nutricionais dos autolisados foram aceitáveis tanto sob o ponto de vista do valor biológico, como das propriedades organoléticas. O extrato de levedura pode ser adicionado em vários tipos de produtos defumados. O nível ótimo de adição depende do produto, mas geralmente se usa 1 a 2%. O extrato pode aumentar o teor de proteína de alguns produtos.

LÁSZTITY (citado por HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991) observou em experimentos em planta piloto que a adição de autolisado de levedura à carne antes de congelar previne as mudanças indesejáveis de extratibilidade de proteínas da carne que ocorrem durante a armazenagem no estado congelado. Não só a solubilidade e extratibilidade das proteínas permanecem inalteráveis, como também se verifica um certo aumento na capacidade de retenção de água.

III- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Geral de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

III.1- MATÉRIAS PRIMAS

- Levedura *Saccharomyces cerevisiae*: A levedura usada no presente trabalho foi fermento de panificação da marca Fleischmann, obtida em padarias comuns.

A escolha deste microrganismo foi ditada principalmente pelo fato de ser um produto bem definido, disponível no comércio, e relativamente barato. Além disso, tem-se conhecimento através de estudos laboratoriais que a levedura de panificação tem uma estrutura difícil de se romper.

- Levedura *Saccharomyces carlsbergensis*: Foi obtida do resíduo de cervejaria procedente da cervejaria Kaiser.

III.2- REAGENTES

Para o desenvolvimento do trabalho foram usados reagentes com o grau de pureza P.A. (Para Análise), de diferentes procedências (Merck, J.T. Becker, Sigma).

III.3- EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos - Tecnal, TE 162

Agitador Magnético - Fanem, 257

Agitador Orbital - Lab-Line, 3527

Aagitador Orbital - New Brunswick scientific, G-25
Autoanalisador de aminoácidos - Dionex, DX 300
Balança analítica - Mettler, AE 200
Balança semi-analítica - Mettler, P 1000
Centrífuga Fanem- 216
Centrífuga refrigerada - Fanem, FR 22
Espectrofotômetro - Beckman, DU-70
Multímetro electrónico - Hioki, 3080
pH-metro- Micronal, B 374
Liquidificador - Arno, LIR-C
Refractômetro ABBE - Carl Zeiss Jena, 32-G 110d

III.4- MÉTODOS EXPERIMENTAIS

III.4.1- DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* POR AUTÓLISE

Durante a investigação foram avaliados os efeitos dos solventes: clorofórmio, metanol e etanol; e cloreto de sódio, como agentes plasmolíticos a diferentes concentrações e temperaturas (Tabela 5). O clorofórmio foi utilizado de forma comparativa somente, uma vez que não é permitido o seu uso em alimentos, pela Legislação Brasileira.

A significância entre as médias para os diferentes tratamentos foi testada por Análise de variança. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de DUNCAN (1988) usando-se o procedimento ANOVA do Software estatístico SAS.

Tabela 5: Condições gerais de extração da proteína da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) por autólise.

NaCl %	SOLVENTE* %	TEMPO h	TEMPERATURA (°C)
0	3	5	20°C
	7		
	10		
2	3		
	7		
	10		
5	3		
	7		
	10		
10	3		
	7		
	10		

* Solvente: Clorofórmio, Metanol e Etanol (v/v).

III.4.1.1- PREPARO DO EXTRATO DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

O fluxograma da Figura 2 mostra a sequência de operações para a obtenção dos extratos que serviram de base para definir as melhores condições de processamento.

Num erlenmeyer foram suspensas 10 gramas de levedura *S.cerevisiae* (base úmida) em solução de 10 ml de água destilada com 0, 2, 5 ou 10% (p/p) de NaCl e 3, 7 ou 10% (v/v) de solvente (etanol, metanol ou clorofórmio). Misturou-se o conteúdo que a seguir foi colocado em um Agitador tipo orbital, Lab-line Modelo 3527, com velocidade de 150 rpm, a diferentes temperaturas (20, 45, 50, 55° ou 60°C) durante 5 horas.

Após a autólise obteve-se o extrato (sobrenadante) por centrifugação à 1950 g, durante 10 min, em uma centrífuga FANEM modelo 216 de bancada. Completou-se o volume do extrato em balão volumétrico de 50 mL, com solução salina, de acordo com a percentagem de sal inicialmente usada. Determinou-se o teor protéico pelo método de Biureto (LEGGET BAILEY, 1967).

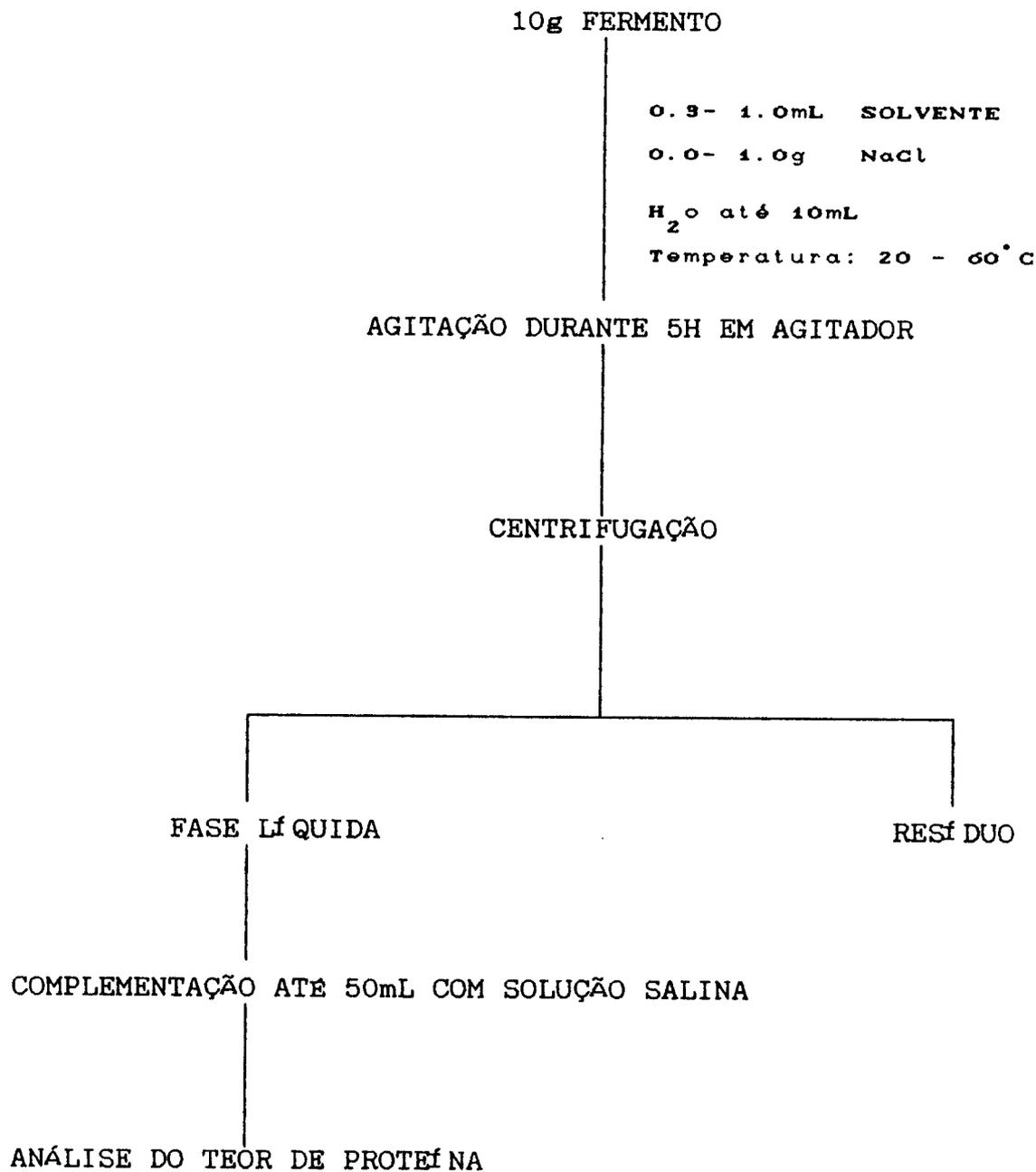


Figura 2: Fluxograma da obtenção de extrato de levedura.

III.4.1.2- EFEITO DO pH

Uma vez determinados os melhores parâmetros de extração ajustou-se o pH a 3, 4, 5, 6, 7 e 8 pela suspensão de células de levedura *S.cerevisiae* numa solução tampão de McIlvaine (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972), composta de 0.2M de Fosfato dissódico e 0.1M de ácido cítrico. Solução de NaOH 5% foi adicionada para manter o pH constante nos extratos a pH 7 e 8.

III.4.1.3- EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA DA LEVEDURA

Durante o experimento trabalhamos com concentração de 20, 50 e 100% de biomassa (base úmida) suspensa em 100ml de solução tampão de McIlvaine acrescida de 7% de etanol (V/V) e 5% de cloreto de sódio (P/P). As demais operações para obtenção do extrato foram idênticas às descritas para o preparo do extrato de levedura.

III.4.2- OBTENÇÃO DO EXTRATO DA LEVEDURA *Saccharomyces carlsbergensis*

Centrifugou-se o creme de levedura de cerveja a 5.000 g em centrífuga refrigerada FANEM, modelo SR22. Desprezou-se o sobrenadante e o resíduo foi ressuspense em água destilada resfriada, novamente centrifugado e o sobrenadante novamente desprezado.

As leveduras lavadas foram suspensas em 100mL de solução de McIlvaine a pH5, 7% de Etanol e 5% de cloreto de sódio, numa concentração de 20% em peso e temperatura de 55°C. As demais operações foram idênticas as já descritas no item III.4.1.1.. Esse método foi utilizado pois foi o de maior rendimento para *Saccharomyces cerevisiae*, no presente trabalho.

III.4.3- CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces carlsbergensis*

Após se separar o extrato do sedimento, por centrifugação, ele foi concentrado à vácuo, a 56°C até se obter uma pasta com cerca de 80[±]2°Brix. O teor de sólidos foi medido em Refractômetro Abbe, Carl Zeiss Jena, modelo 32-G 110d. A pasta obtida de cor marron foi guardada em refrigeração para estudos posteriores.

III.5- MÉTODOS ANALÍTICOS

III.5.1- DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A umidade foi determinada segundo o procedimento 24.058 da AOAC (1975).

III.5.2- DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Foi determinado o conteúdo de cinzas utilizando o método 24.059 da AOAC (1975).

III.5.3- DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Determinados pelo método de BLIGH & DYER (1959).

III.5.4- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA

Foi determinado o conteúdo de nitrogênio total pelo método de micro Kjeldahl 24.062 descrito no AOAC (1975). O teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 para obter o conteúdo de proteína bruta.

III.5.5- DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Os carboidratos foram determinados por diferença da soma das determinações anteriores em porcentagem.

III.5.6- DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS

Ao fazer-se o estudo da influência de alguns fatores (temperatura, efeito combinado de sal e solventes e pH) na extração das proteínas, empregou-se o método de Biureto descrito por LEGGET BAILEY (1967), para dosagem das mesmas. Usou-se como padrão uma curva de calibração preparada com albumina de soro bovino.

III.5.7- DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS DO EXTRATO CONCENTRADO DE *Saccharomyces cerevisiae*

As determinações de aminoácidos das amostras de extrato de levedura *S. cerevisiae* foram realizadas em Autoanalisador de aminoácidos Dionex, mod. DX 300, segundo o método de SPACKMAN *et al.* (1958).

As áreas dos aminogramas foram integradas e correlacionadas com padrões, para os picos característicos de cada aminoácido.

III.5.8- DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO

O triptofano do extrato de *Saccharomyces cerevisiae* foi analisado de acordo com o método proposto por CONTRERAS (1989).

III.5.9- DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO DOS EXTRATOS DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces carlsbergensis*

Determinou-se o cloreto somente nos extratos concentrados finais. Usou-se o método de MOHOR (LANARA, 1981), que quantifica o íon cloreto através da titulação com AgNO₃.

III.5.10- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Para determinar-se o teor de ácidos nucléicos nos extratos concentrados das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*, utilizou-se a reação de orcinol para RNA, de acordo com o procedimento descrito por HERBERT *et al.* (1971). A percentagem de ácidos nucléicos foi calculada através de uma curva padrão obtida com RNA puro. Para a matéria prima consideraram-se os dados da literatura (10% de RNA).

III.6- DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO EXTRATO CONCENTRADO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

III.6.1- SOLUBILIDADE- ÍNDICE DE NITROGENIO SOLÚVEL

O método utilizado para determinação do índice de nitrogênio solúvel foi o descrito por BETSCHART & KINSELLA (1973).

O índice de nitrogênio solúvel (INS) a diferentes pH foi calculado pela relação:

$$\%INS = \frac{\text{nitrogênio solúvel da amostra}}{\text{nitrogênio total da amostra}} \times 100$$

III.6.2- CAPACIDADE GELIFICANTE

Para esta determinação baseou-se no método descrito por SCHMIDT et al (1978), com algumas modificações, para o qual prepararam-se dispersões do extrato final a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80° Brix.

Transferiram-se 10 g das dispersões para tubos de ensaio que foram levados ao banho de água em ebulição, mantidos por 15 minutos, a seguir resfriados em banho de gelo e colocados em geladeira (+4°C) até o momento de avaliação, que foi feita em termos da força do gel, tendo como referência a seguinte escala (SCHMIDT et al, 1978).

- 0 - nenhum gel era formado
- 1 - gel muito fraco
- 2 - gel fraco
- 3 - gel médio
- 4 - bom gel
- 5 - gel forte

III.6.3- CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO

Foi determinada pelo método de CHOI et al (1981) e HUFFMAN et al. (1975) com algumas modificações. Foram preparadas suspensões de 50mL dos extratos concentrados calculados para dar uma concentração final de 1, 3 e 5% de proteína.

As suspensões foram colocadas num liquidificador ARNO em sua velocidade inicial (16.500 RPM) e imediatamente iniciou-se a adição, mediante uma bureta graduada, de óleo puro de milho a uma velocidade de 1,0mL por segundo até a quebra da emulsão. Suspendeu-se a incorporação de óleo no momento em que foi observada a quebra da emulsão, percebida pela súbita redução da resistência eléctrica que era monitorada por um Multímetro electrónico HIOKI, modelo 3080,

através de eletrodos de cobre colocados no fundo do copo do liquidificador (WEEBB *et al.*, 1970).

A capacidade de emulsificação foi calculada pela máxima quantidade de mililitros de óleo utilizados para romper a emulsão em relação a 1 g de proteína.

III.7- ANÁLISE SENSORIAL DE CALDOS FORMULADOS NA BASE DE EXTRATO DE LEVEDURA POR SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE CARNE

A avaliação dos concentrados finais foi feita pela adição do autolisado na formulação do caldo de carne, em níveis crescentes de acordo com IFF (1965) e o produto final foi avaliado sensorialmente para determinar-se o nível máximo de utilização permissível sem afetar as características organolépticas do produto final.

A análise sensorial do caldo formulado com substituição de 0, 20, 50 e 100% de extrato de carne por extrato de levedura (Tabela 6) foi feita por 25 provadores não treinados de ambos os sexos, de idade entre 20 e 40 anos, que costumavam consumir o produto e com experiência anterior em testes sensoriais.

As amostras foram apresentadas aos provadores à temperatura de 60°C, em béquers de 50 mL, codificados com três dígitos, colocados em aquecedor elétrico apropriado, para manter a temperatura. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz vermelha, para que a cor não interferisse na avaliação.

Para todas as amostras, foi aplicado o teste de preferência utilizando escala hedônica semi-estruturada de 09 pontos, onde (1) representava "gostei muitíssimo" e (9) "desgostei muitíssimo". Pedia-se ao provador que justificasse a preferência. A ficha utilizada para a análise pode ser visualizada na Tabela 7.

Em cada sessão foram avaliadas quatro amostras, utilizando-se o delineamento estatístico de blocos completos balanceados, para variar a ordem de apresentação das amostras aos provadores. A análise dos resultados da avaliação sensorial foi realizada utilizando-se análise de variância e o teste de Tukey para a comparação de médias.

Tabela 6 - Composição dos caldos de carne utilizando extrato de levedura (*S.cerevisiae* e *S.carlsbergensis*)

INGREDIENTES	PERCENTAGEM DE SUBSTITUIÇÃO DE EXTRATO DE CARNE POR LEVEDURA			
	0% (g)	20% (g)	50% (g)	100% (g)
Extrato de levedura a 80 [±] 2° Brix	0,00	0,80	2,00	4,00
Extrato de carne Swift	4,00	3,20	2,00	0,00
Sal	12,00	12,00	12,00	12,00
MSG (glutamato monosódico)	2,96	2,96	2,96	2,96
Gordura vegetal (Anderson Clayton)	0,40	0,40	0,40	0,40
Cebola em pó	0,6	0,6	0,6	0,60
Pimenta branca em pó	0,04	0,04	0,04	0,04
TOTAL	20	20	20	20

TABELA 7: Ficha para análise sensorial do caldo de carne

NOME:----- DATA:-----

Por favor, prove as amostras e indique para cada uma delas o quanto você gostou.

Nº
Amostra:

-----	-----	-----	-----
Gostei Muitíssimo	Gostei Muitíssimo	Gostei Muitíssimo	Gostei Muitíssimo
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
---	---	---	---
-----	-----	-----	-----
Desgostei Muitíssimo	Desgostei Muitíssimo	Desgostei Muitíssimo	Desgostei Muitíssimo

Responda em relação à amostra que você mais gostou, por que gostou.

Menor amargor----- Melhor sabor-----
Melhor odor----- Melhor teor de sal-----
Outros-----

Responda em relação à amostra que você menos gostou, o motivo.

Maior amargor----- Pior sabor-----
Pior odor----- Pior teor de sal-----
Outros-----

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1- COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Na Tabela 8 é mostrada a composição centesimal da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e na Tabela 9 a composição da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* (em base seca e em base úmida). Verificamos que tais valores, estão em concordância com os dados da literatura descritos no início do presente trabalho.

A maioria dos valores protéicos se baseia na determinação do teor de nitrogênio total e usa o fator de correção 6,25. Contudo esses dados estão sujeitos a erro devido ao teor variável de nitrogênio não protéico (ácidos nucleicos, N-acetil-glucosamina, etc). A parede celular contém 5 a 15% dessa proteína total (PHAFF, 1971) presente na forma de complexos com polissacarídeos.

O teor de carboidratos varia numa larga faixa dependendo das condições de crescimento da levedura. ABD ALLAH *et al.* (1986) ao investigarem o efeito da intensidade da aeração no teor de carboidratos das leveduras concluíram que este é altamente afetado pela concentração de oxigênio no meio. Quanto maior a aeração melhor a capacidade das células da levedura de armazenarem mais carboidratos e conseqüentemente, aumenta a estabilidade da levedura.

Na maioria das leveduras as reservas de energia consistem largamente de carboidratos, sendo a maioria compreendidos pelo glicogênio e trealose (SOLS *et al.*, 1971). Uma grande parte dos carboidratos se localiza na parede celular na forma de diferentes polissacarídeos. De acordo com SOLS *et al.* (1971) a levedura de panificação normalmente contém 16 a 20% de glicogênio e 6 a 10% de trealose, enquanto que a levedura de cerveja tem menores quantidades. As condições de fermentação (aeróbica ou anaeróbica) e o estado metabólico da célula são os principais fatores que influenciam o teor de glicogênio. Pelas Tabelas 8 e 9 se pode ver

que a biomassa da levedura de panificação apresentou teor de carboidratos inferior ao da levedura de cerveja.

Tabela 8- Composição centesimal da levedura *S.cerevisiae*

	Base úmida %	Base seca %
Umidade	66,85	-----
Proteína bruta (N x 6,25)	18,00	54,30
Gordura	0,23	0,69
Cinzas	3,15	9,50
Carboidratos*	11,77	35,51

(*) Calculado por diferença

Tabela 9- Composição centesimal da levedura *S. carlsbergensis*

	Base úmida %	Base seca %
Umidade	77,10	-----
Proteína Bruta (N x 6,25)	12,00	52,40
Gordura	0,22	0,96
Cinzas	1,52	6,64
Carboidratos*	9,16	40,00

*) Calculado por diferença

IV.2- EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE *S.cerevisiae*

As Tabelas 10 11 e 12 mostram os resultados do rendimento de extração de proteína da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a 20, 45, 50, 55 e 60°C, quando submetida à autólise, usando-se várias concentrações de solventes e cloreto de sódio. O rendimento da proteína extraída (método de Biureto) foi calculado em relação à quantidade de proteína bruta (N x 6,25) existente na levedura (método de Kjeldahl).

Pode-se observar um aumento gradual do rendimento protéico até 55°C, mas em geral a 60°C há queda no rendimento, exceto quando o solvente foi o clorofórmio. O efeito da temperatura a 60°C pode ter desnaturado a proteína provocando a queda até mais da metade do valor obtido a 55°C. Pela análise de variância as diferenças encontradas entre os dois tratamentos foram altamente significativas. Nem o aumento da concentração do solvente de 3 para 10% ou do cloreto de sódio de 0 para 10% influenciaram no rendimento da extração a 60°C.

Fenômeno análogo foi relatado por BABAYAN et al (1981) ao estudarem as mudanças na estrutura interna da célula da levedura *S.cerevisiae* e acumulação de proteína e componentes nucleicos no fluido extracelular, numa faixa de temperatura de 40 a 75°C sob o efeito de vários aditivos (aditivos hidrofílicos: etanol e acetato de etila, e aditivos hidrofóbicos: lecitina e ácido láurico). Os autores concluíram que a temperatura ótima para a atividade das proteases do grupo controle (sem aditivos) foi 60°C e a de nucleases 70°C. A melhor temperatura de extração para todos os aditivos foi 55°C e a presença de aditivos reduziu a temperatura ótima de atividade endoenzimática.

Na patente americana (EUA Pat.4,218,481, 1980) conclue-se que a autólise de leveduras em geral ocorre a temperaturas variando de 30 a 60°C. Em geral o processo, extremamente lento a baixas

temperaturas, pode requerer de 3 a 7 dias para se completar. A 50-55°C, a digestão total pode ocorrer em 3 dias mas, na prática, tem-se encurtado o tempo de duração do processo com redução do rendimento da autólise.

Observa-se pelas Tabelas 10 11 e 12 que a 20°C se obtiveram os níveis mínimos de extração não se registrando diferenças significativas a nível de 5% com as variações dos solventes de 3 a 7% e do sal de 0 a 5%. Pelo Teste de DUNCAN também se concluiu que não existem diferenças entre as médias. Esses resultados estão em concordância com o obtido nas patentes EUA Pat.4,285,976 (1981) e EUA Pat.4,218,481 (1980), NAUMENKO & GORDIENKO (1985) e SUGIMOTO (1974) segundo os quais a autólise da levedura é um processo lento induzido pelo aquecimento e que para acelerá-lo são necessários agentes plasmolisantes.

Os resultados com *Saccharomyces cerevisiae* no presente trabalho mostraram que é preferível usar 55°C, pois corresponde à mais alta faixa de rendimento da autólise.

IV.3- EFEITO DO TIPO DE SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DA LEVEDURA *S.cerevisiae* E SEU SINERGISMO COM O CLORETO DE SÓDIO

Industrialmente é muitas vezes usado um processo no qual leveduras são induzidas à plasmólise pela adição de um agente ativador de autólise, um solvente orgânico não polar como o toluol, clorofórmio, acetato de etila, etanol, acetato de amila; ou um sal inorgânico como o cloreto de sódio para encurtar o processo (CURRIE et al, 1972; GUAMONA & MOCREN, 1973). A adição de alguns solventes como o clorofórmio e o toluol, não é permitida pela Legislação Brasileira, se o autolisado for para ser usado em produtos alimentícios (PEPPLER, 1970). Do ponto de vista de processamento, a escolha do solvente é feita pela eficiência da extração dos componentes de interesse.

Na investigação sobre o efeito do clorofórmio, metanol e etanol combinados com o uso de cloreto de sódio, os dados foram submetidos a análise de variância e os tratamentos de 60°C, 7% de clorofórmio e 10% de cloreto de sódio e 45°C, 10% de clorofórmio e 10% de cloreto de sódio que proporcionaram maior recuperação da proteína, não diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade. O clorofórmio foi o mais eficiente pois a 45°C obteve-se altos rendimentos que não foram praticamente alterados com o aumento da concentração do solvente ou do sal, o que foi confirmado pelo teste de DUNCAN. Essa característica ativadora do solvente concorda com os resultados obtidos por NAUMENKO & GORDIENKO (1985) quando testaram o efeito do clorofórmio, tolueno, etanol e formol no encurtamento do tempo de autólise. No presente estudo, o clorofórmio foi usado sómente para efeitos comparativos.

A contribuição dos solventes para a liberação da proteína foi aparentemente nula quando o cloreto de sódio estava abaixo de 2%. Pela análise de variância dos dados dos tratamentos com 3% metanol a 50 e 55°C, 0 e 2% de cloreto de sódio não existiram diferenças significativas a nível de 5%. O teste de DUNCAN confirma os resultados. A adição de mais de 5% de sal conduziu a uma rápida extração de proteína. Esse efeito foi mais notório quando se usaram baixas concentrações de solvente (3%) a 55°C. Nessa faixa, o acréscimo de sal de 0 para 10% provocou o rendimento de 9.6% a 15,0% e de 11.9% a 21.1% para o metanol e etanol, respectivamente. Mas com a concentração do álcool a 7% ou mais, o acréscimo do teor de sal de 5 para 10% teve pouca influência na autólise. O cloreto de sódio apesar de ser um excelente plasmolisador age como um inibidor de reações enzimáticas autolíticas. Assim, é difícil evitar um baixo rendimento de proteína dos extratos de levedura (SUGIMOTO, 1974). Segundo TREVELYAN (1976a) quando uma grande quantidade de cloreto de sódio está presente num extrato contendo proteínas de células microbianas, ocorre a redissolução da proteína, pelo que, o rendimento protéico é reduzido.

O acréscimo de 3 para 7% de solvente no geral duplicou o rendimento de extração, enquanto que a 10% não se obteve aumento no rendimento. Segundo GRAY (1941), a levedura é inibida em concentração de álcool acima de 9.5% (V/V). Pelos resultados obtidos neste trabalho, em que solventes e o cloreto de sódio são usados simultaneamente como plasmolisadores, num processo autolítico que durou 5 horas, alcançou-se a máxima atividade com 7% de etanol e 5% de cloreto de sódio à 55°C obtendo-se 25,18% de rendimento protéico (Tabela 10). A diferença em relação a outros tratamentos foi altamente significativa. Pelo teste de DUNCAN a diferença entre as médias também foi altamente significativa.

Tabela 10: Rendimento de extração da proteína da levedura *Saccharomyces cerevisiae* usando-se o metanol como solvente

% Metanol (v/v)	% Sal (p/p)	Temperatura (°C)				
		20	45	50	55	60
3	0	2,86	4,50	6,96	9,64	10,87
	2	3,21	4,25	7,00	9,64	13,21
	5	4,11	5,60	7,86	11,07	13,21
	10	5,36	8,50	8,75	8,77	13,37
7	0	4,11	4,20	10,00	13,93	11,07
	2	4,11	5,50	11,07	13,39	12,37
	5	5,00	7,30	10,89	15,71	13,21
	10	5,89	8,90	11,07	19,11	14,28
10	0	4,46	5,50	14,11	14,64	11,78
	2	3,93	7,70	14,29	16,43	12,11
	5	6,25	9,50	16,61	17,32	13,75
	10	6,96	9,50	14,64	20,71	14,61

Tabela 11: Rendimento de extração da proteína da levedura *Saccharomyces cerevisiae* usando-se o etanol como solvente.

% Etanol (v/v)	% Sal (p/p)	Temperatura (°C)				
		20	45	50	55	60
3	0	2,70	4,64	8,57	11,89	10,71
	2	3,75	5,18	8,93	15,89	12,50
	5	2,70	5,89	10,71	17,00	13,57
	10	3,25	5,89	10,00	21,10	14,47
7	0	3,90	6,96	10,89	24,11	11,97
	2	5,00	8,57	10,54	22,50	12,50
	5	4,82	11,79	11,00	25,18	13,98
	10	5,00	13,39	12,86	23,39	14,61
10	0	4,70	15,71	11,67	19,29	11,48
	2	6,00	18,21	11,79	23,18	12,37
	5	6,00	18,89	12,68	23,75	13,37
	10	6,25	15,05	14,64	23,39	15,38

Tabela 12: Rendimento de extração da proteína da levedura *Saccharomyces cerevisiae* usando-se como solvente o clorofórmio.

% Clorofórmio (v/v)	% Sal (P/P)	Temperatura (°C)				
		20	45	50	55	60
3	0	12,35	25,05	26,25	21,42	26,43
	2	12,11	28,20	24,11	24,64	27,50
	5	15,63	30,38	23,93	25,89	26,43
	10	15,71	30,00	21,61	24,11	23,21
7	0	9,00	29,61	15,89	23,57	28,30
	2	10,83	28,57	19,64	25,36	28,93
	5	14,18	31,48	22,14	27,86	29,46
	10	16,41	30,70	20,54	24,82	32,86
10	0	9,00	31,07	23,21	20,18	20,00
	2	11,00	31,48	17,14	26,61	24,11
	5	14,10	30,55	21,43	25,71	25,54
	10	15,38	32,50	19,11	23,75	25,71

IV.4- EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DA LEVEDURA NA EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA

Mantendo a temperatura a 55°C, na presença de 100g de biomassa suspensa (base úmida) em 100mL de solução tampão de McIlvaine com 7% de etanol e 5% de cloreto de sódio (100% de concentração de biomassa) investigou-se o efeito do pH, na faixa de 3 a 8, em relação ao rendimento da autólise. Os resultados mostraram que o aumento do pH de 6 para 8, diminuiu o rendimento protéico de 17% para 11%. O aumento do pH de 3 para 5 elevou o rendimento protéico de 22% para 41,07%. Na faixa de concentração de biomassa de 50% houve um ligeiro aumento percentual de rendimento (2%) em todas as faixas de pH, em relação a 100% de concentração. No pH 5 o aumento foi de 41,07% para 45,36%.

Ao reduzir a concentração da biomassa para 20% o aumento do rendimento foi significativo, sendo mais notório a pH 5 onde se alcançou o valor de 51% do rendimento em proteína-Biureto e 79,5% de proteína total-Kjeldahal (Tabela 12). Segundo TREVELYAN (1976a), para uma maior eficiência, é preferível usar-se uma dispersão de células de 6- 15% em água ou qualquer outro meio aquoso. FEDOROVA & NEKLYUDOV (1985) também concordam que a intensidade da autólise também aumenta com o decréscimo da concentração de células de levedura no autolisado, e, segundo eles, se o máximo de proteína obtida após 20 horas foi 60% com 4% de concentração celular, poder-se-ia alcançar 93-95% de rendimento (N- Kjeldahl) durante 10-12 horas, com 1% de concentração.

Tabela 13: Percentagem de proteína e de rendimento de extração de *Saccharomyces cerevisiae* determinada pelos métodos de Biureto e de Kjeldahl, em diferentes pHs.

pH	Proteína(%)		Rendimento(%)	
	Biureto	Kjeldahl	Biureto	Kjeldahl
3	4.68	7.80	26.0	43.5
4	8.46	12.69	47.0	70.0
5	9.18	14.31	51.0	79.5
6	4.05	7.71	22.5	42.8
7	3.78	6.31	21.0	35.1
8	3.24	6.05	18.0	33.6

$$\% \text{ RENDIMENTO} = \frac{\text{QUANTIDADE DE PROTEÍNA EXTRAÍDA}}{\% \text{ PROTEÍNA NA AMOSTRA}} \times 100$$

A Figura 3 mostra que quando a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* é suspensa em solução tampão próximo do pH 5 há uma substancial liberação de proteínas das células. Suspensões na faixa de pH de 4- 6 mantiveram o pH relativamente constante ao longo das 5 horas de autólise. Por outro lado nos pH 7 e 8 tornou-se necessário adicionar-se um álcali para manter o pH constante. TREVELYAN (1976b) numa investigação em que incubou uma suspensão de levedura em água a 50°C e manteve o pH a 5 pela adição controlada de ácido clorídrico, notou um rápido aumento do pH, o que indicou uma alteração na permeabilidade celular, e a adição de ácido diminuiu para níveis mínimos depois de 4 horas. Por outro lado, a pH 8 a necessidade de se adicionar um álcali para manter o pH mostrou que houve rompimento gradual da barreira entre o conteúdo celular (pH 6,5- 7,0) e o meio extracelular. No presente estudo, sem nenhum ajustamento do pH, a mistura de reação autolítica tinha pH 7,08 no início da incubação e 6,08 no final das 5 horas de autólise. SUGIMOTO (1974) ao autolisar 500g de levedura de panificação numa solução de 5% de cloreto de sódio e 5% de etanol, obteve um pH de 5,3 no início da incubação e pH 5,6 ao final de 2 dias.

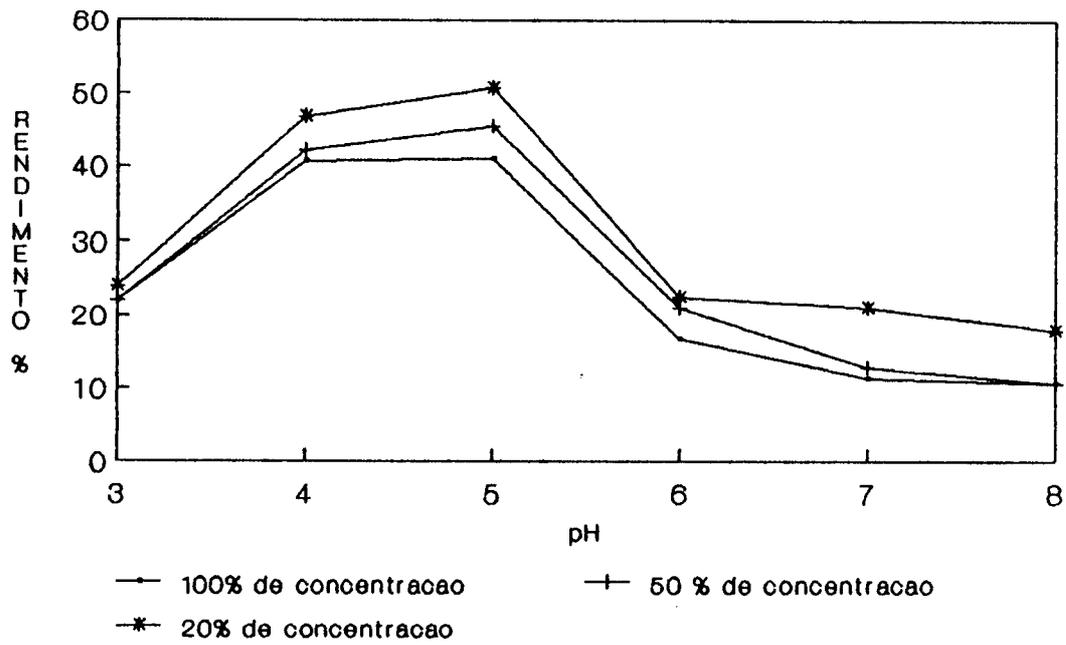


Figura 3: Efeito do pH e da concentração da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no rendimento da autólise

IV.5- AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS AUTOLISADOS CONCENTRADOS DAS LEVEDURAS

IV.5.1- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS EXTRATOS AUTOLISADOS CONCENTRADOS DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces carlsbergensis*

A composição química dos extratos de levedura (autolisados) é de uma natureza complexa e depende da matéria prima, do processo de hidrólise e do processamento final após a autólise. A Tabela 14 mostra a composição centesimal e o conteúdo de ácidos nucleicos dos extratos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* concentrados até 78,4°B e 77,7°Brix, respectivamente.

Segundo HOUGH & MADDOX (1970) a liberação de proteína e aminoácidos é considerada o aspecto mais importante da autólise. REED & PEPLER (1973) conseguiram obter, a partir da levedura *S. cerevisiae*, após 12 a 24 horas, um extrato que concentrado até 80% de sólidos totais tinha, 15% de sal, 6% de cinzas, 6,5-7,5% de nitrogênio total e pH 5-6.

Durante a autólise a liberação de carboidratos da célula para o extrato é reduzida se comparada com a de proteína e de ácidos nucleicos (HOUGH & MADDOX, 1970). BEHALOVÁ *et al.* (1991) observaram que somando o fato da grande dificuldade de se extrair os ácidos nucleicos, a estrutura compacta da parede celular da levedura *S.cerevisiae* parece ser responsável pelo aumento do teor de carboidratos no extrato; estes componentes podem ser parcialmente liberados da superfície da estrutura celular. Ele observou também no seu trabalho que, o fato de a parede celular da levedura *Candida utilis* ser mais permeável foi comprovado pela presença de cadeias de polímeros de ácidos nucleicos no extrato.

A redução do teor de gordura nos extratos talvez se deva ao fato de, segundo HALÁSZ & LÁSZTITY (1991), a pH 5-6, os lípidos se agregarem na forma de grandes gotas e não atravessarem para o meio

extracelular.

A influência do período de incubação na hidrólise do RNA pela ativação da ribonuclease endógena foi avaliada nos extratos. Se tomarmos em conta os dados da literatura (TREVELYAN, 1976a, REED, 1981) de 10% de RNA nas leveduras (base seca) no nosso trabalho encontramos 2,30 e 2,00% do teor de RNA, o que corresponde a 77% e de 80% de redução nas leveduras *S.cerevisiae* e *S.carlsbergensis*, respectivamente (Tabela 14).

LINDBLOM & MOGREN (1974) ao estudarem a influência de diferentes parâmetros na RNase de células de levedura *S.cerevisiae* rompidas para a produção de concentrado protéico encontraram que incubando uma suspensão de 5% de matéria prima seca e 3% de cloreto de sódio, a 50°C durante 20 minutos, cerca de 85% do RNA foi degradado. A concentração de RNA no concentrado foi de 1,5%. Nenhuma atividade da RNase foi observada quando a suspensão de leveduras mecanicamente desintegradas foi submetida a 50°C durante 2 horas. Mas, de acordo com OHTA *et al.* (1971) o teor de ácidos nucleicos nas células de *Cândida utilis* não rompida pode ser reduzido pela RNase endógena quando as células forem expostas a choque térmico seguido de incubação a 52°C durante 2 horas. Os autores supõem que a função do choque térmico seja a iniciação da hidrólise enzimática.

Durante a incubação o RNA é degradado pela RNase e os nucleótidos se difundem através das células. TREVELYAN (1976b) ao estudar a autólise como método de redução do RNA constatou que a permeabilidade da barreira celular da levedura poderia ser destruída por outros meios que não fosse o choque térmico, como a ação de certos solventes orgânicos. Ele investigou o uso do acetato de etila a 50°C e observou que em 2 horas o RNA quase desapareceu. Em 1977, TREVELYAN testou o efeito do etanol e do cloreto de sódio na aceleração da autólise e obteve com sucesso a quebra do RNA. KNORR *et al.* (1980) afirmam que a hidrólise do RNA se eleva com o aumento do período de incubação.

CANEPA *et al.* (1972) afirmam que não ocorre nenhuma redução do RNA na levedura *S.cerevisiae* não rompida se o choque térmico for usado, mas, em contrapartida, também não se observa nenhuma redução do mesmo quando um homogeneizado da levedura obtido por desintegração mecânica for incubado a 50°C. Segundo LINDBLOM & MOGREN (1974) no mínimo é necessário que a levedura seja mecanicamente desintegrada e que seja adicionado cloreto de sódio para se obter a redução de RNA por incubação.

Os autores acharam melhores resultados na faixa de pH 5,0-5,6 (LINDBLOM & MOGREN, 1974; TREVELYAN, 1976; TREVELYAN, 1977) o que coincide com os valores selecionados para a presente pesquisa, e concluíram que acima do pH 6 diminui a redução do RNA.

A temperatura aqui selecionada para a autólise (55°C) também está dentro da faixa que eles determinaram como ótima para a redução do RNA, que foi 50-60°C. Os autores também concluíram que aumentando o cloreto de sódio acima de 3% não melhora os resultados de redução.

Tabela 14: Composição centesimal dos extratos concentrados das leveduras estudadas *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Umidade	23,400	27,000
Proteína Total	33,000	20,000
Gordura	0,090	0,045
Carboidratos*	20,610	17,955
Cinzas	22,900	35,000
NaCl	2,300	7,250
RNA**	2,320	2,000

(*) Calculado por diferença

(**) resultados na base seca

Concentração dos extratos: *S. cerevisiae* = 78,4° Brix

S. carlsbergensis = 77,7° Brix

IV.5.2- COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DO EXTRATO AUTOLISADO
DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Tabela 15: Teor de aminoácidos no extrato proteico da levedura *S.cerevisiae* em g de aminoácido/100 g de proteína.

Aminoácido	EACSC	Prot.Ovo	Escore Quim.	Prot.da FAO	Escore Quim.
Lis	9,103	6,40	142,23	5,50	165,50
Hist	1,889				
Arg	6,304				
Asp	10,543				
Tre	4,994	5,10	97,92	4,00	124,85
Ser	4,933				
Glu	17,436				
Pro	0,277				
Gli	6,185				
Ala	8,010				
Met	0,537	3,10	17,32		
1/2 Cis	0,946	2,40	39,42		
Met+Cis	1,483	5,50	26,96	3,50	42,37
Val	6,838	7,30	93,67	5,00	136,76
Ile	5,830	6,60	88,33	4,00	145,75
Leu	8,171	8,80	92,85	7,00	124,43
Tir	3,928	4,20	93,52		
Fen	4,794	5,80	82,66		
Tir+Fen	8,722	10,00	87,22	6,00	145,37
Trp ^(a)	0,706	1,60	44,13	1,00	70,60
Amônia	0,866				
Total de a.a. essenciais	45,847	51,30		36,00	

(a)

- Método colorimétrico de Contreras, 1992.
- EACSC: Extrato Autolisado Concentrado de *S.cerevisiae*

A qualidade de uma proteína deve ser medida através de diferentes indicadores. Um deles é aquele que leva à determinação do escore protéico que nada mais é que um estudo do perfil dos seus aminoácidos e respectiva comparação de cada um com o aminoácido correspondente de uma proteína tomada como padrão (OLIVEIRA, 1978b). Estudamos o escore químico dos aminoácidos essenciais presentes no extrato autolisado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na tentativa de verificar os fatores limitantes em relação à proteína do ovo e à da FAO (FAO/WHO, 1973).

Observando os dados da Tabela 15 verificamos que o estudo comparativo da proteína do extrato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com a proteína do ovo mostrou acentuada limitação representada pelos aminoácidos sulfurados totais, 73,0% e secundariamente pelo triptofano, 59,7%. Comparando com o padrão da FAO também constatamos limitações nos sulfurados totais em 57,6% e no triptofano em 35,4%. Em ambas comparações a lisina obteve o maior escore químico. Devido ao alto teor de lisina na proteína da levedura vários autores (KIHLBERG, 1972 e LINDBLOM, 1977) sugerem que ela seja um excelente complemento protéico para produtos de panificação.

A análise da Tabela 15 demonstra que os resultados obtidos encontram-se dentro dos parâmetros previstos para esta fonte alimentar. O total de aminoácidos essenciais da proteína do extrato é 45,847 comparado com 52g de aminoácidos essenciais por 100g de proteína do ovo preconizados por VANANUVAT & KINSELLA (1975c). O ácido glutâmico é o aminoácido sempre presente em maior quantidade em hidrolisados.

Embora existam bastantes dados acerca da composição em aminoácidos da proteína da levedura HÁLASZ & LÁSZTITY (1991) apontam alguns problemas na avaliação desses dados:

1) Falta de dados acerca do teor de triptofano (a determinação do triptofano necessita de uma hidrólise separada , o

que nem sempre é feito pelos pesquisadores)

2) Meticulosidade insatisfatória na determinação de aminoácidos sulfurados (para esta determinação é preciso um procedimento separado).

3) Cálculo do teor de proteína através de dados de nitrogênio incorretos por inclusão do teor de ácidos nucleicos.

4) Indicação insatisfatória acerca do tipo de levedura ou produto de levedura (levedura ativa, levedura comprimida, levedura ativa seca, levedura inativa, proteína extraída de levedura, etc.)

5) Negligência sobre o efeito das diferentes condições de crescimento na composição da levedura e o efeito do processamento (secagem, condições de extração da proteína e redução do teor de ácidos nucleicos, etc.) sobre os aminoácidos e sua biodisponibilidade.

NAUMENKO & GORDIENKO (1985) num trabalho em que estudaram a influência das condições da autólise na composição do autolisado, mostraram que o teor do triptofano depende do tempo da autólise (5, 10, 15, 20, 25 ou 30 horas) e do agente ativador usado (etanol, clorofórmio ou formol). Eles obtiveram a máxima acumulação de triptofano depois de 20 horas de autólise com o uso do clorofórmio (4,84mg/g) e igual valor com o uso de tolueno após 15 horas de autólise. No controle, esses valores só foram alcançados após 30 horas de autólise. Com o uso de ativadores, a partir de 20 horas, o teor de triptofano começou a diminuir. Comparando com o valor obtido na presente pesquisa (7,06mg/g) podemos concluir que o nosso método de autólise é eficiente para o triptofano, que segundo NAUMENKO & GORDIENKO (1985) é um aminoácido limitante quando se obtém uma mistura de aminoácidos.

IV.5.3- AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO EXTRATO CONCENTRADO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

IV.5.3.1- SOLUBILIDADE

Os valores de índices de nitrogênio solúvel para os extratos autolisados concentrados da levedura *S.cerevisiae* estão apresentados na Figura 4. Pelo perfil de solubilidade dos materiais testados pode se presumir que as proteínas foram fortemente desnaturadas. Não se observou nenhum ponto isoelétrico.

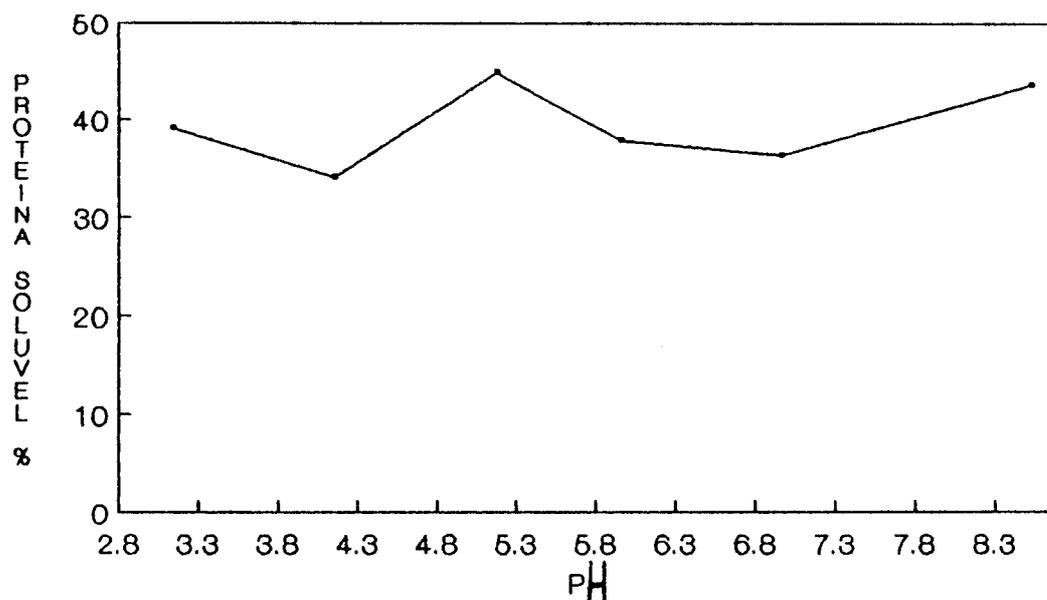


FIGURA 4: Curva de solubilidade da proteína do extrato autolisado concentrado de *Saccharomyces cerevisiae*

Ainda que as modificações estruturais e hidrólise limitada das ligações peptídicas devido a tratamentos térmicos suaves, não afetem o valor nutritivo das proteínas, podem afetar drasticamente suas propriedades funcionais. A solubilidade (a pH 3 ou 5,5) de isolados de proteínas desnaturadas de soja, pode passar de 10 a 50 ou 80%, quando o grau de hidrólise alcança 3 ou 8% respectivamente (ALDER-NISSEN & OLSEN, 1979). Geralmente o perfil de solubilidade de uma proteína parcialmente hidrolisada, melhora em toda a escala de pH, porque não forma agregados volumosos mesmo no pH isoelétrico, fenômeno esse que pode ter ocorrido na nossa proteína extraída por autólise.

Segundo ALDER-NISSEN & OLSEN (1979) o aumento da solubilidade obtido por proteólise limitada se atribui a formação de unidades polipeptídicas menores, mais hidrófilas e mais solvatadas. Estes hidrolisados parciais se utilizam para enriquecer a base de proteínas, bebidas acidificadas e/ou que vão sofrer tratamento térmico. Frequentemente, uma proteólise lenta, origina a liberação de peptídeos hidrófobos amargos, com resíduos de leucina ou fenilalanina terminais. Não obstante, estes hidrolisados podem resultar apropriados para pacientes que sofram insuficiência digestiva ou que são alérgicos as proteínas do leite ou do glúten. A proteólise parcial se utilizou para melhorar as propriedades emulsificantes e espumantes das proteínas desnaturadas pelo calor. Estes efeitos provêm, provavelmente, do aumento da solubilidade do hidrolisado, que facilita a difusão e extensão nas interfaces óleo/água e ar/água. No entanto, quando a viscosidade e espessura das películas protéicas adsorvidas resultam, aparentemente, insuficientes para estabilizar as emulsões e espumas; essas propriedades são prejudicadas. A diminuição do tamanho molecular por proteólise, resulta claramente desfavorável para as propriedades gelificantes e viscoelásticas das proteínas. No entanto, uma proteólise limitada das proteínas do glúten, pode aumentar a expansão da massa durante a fabricação de pão.

IV.5.3.2- CAPACIDADE DE GELIFICAÇÃO

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para a capacidade de gelificação das amostras de extrato autolisado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, variando-se a concentração protéica e com aquecimento à ebulição durante 15 minutos. As amostras foram concentradas a 8,97, 11,64, 15,27, 19,08, 22,90, 26,71 e 30,00% de proteína. Nas concentrações de 8,97 a 15,27% de proteína não houve formação de gel; na concentração de 19,08% de proteína formou-se gel fraco e a 22,90, 26,71 e 30,00% de proteína obteve-se gel bom.

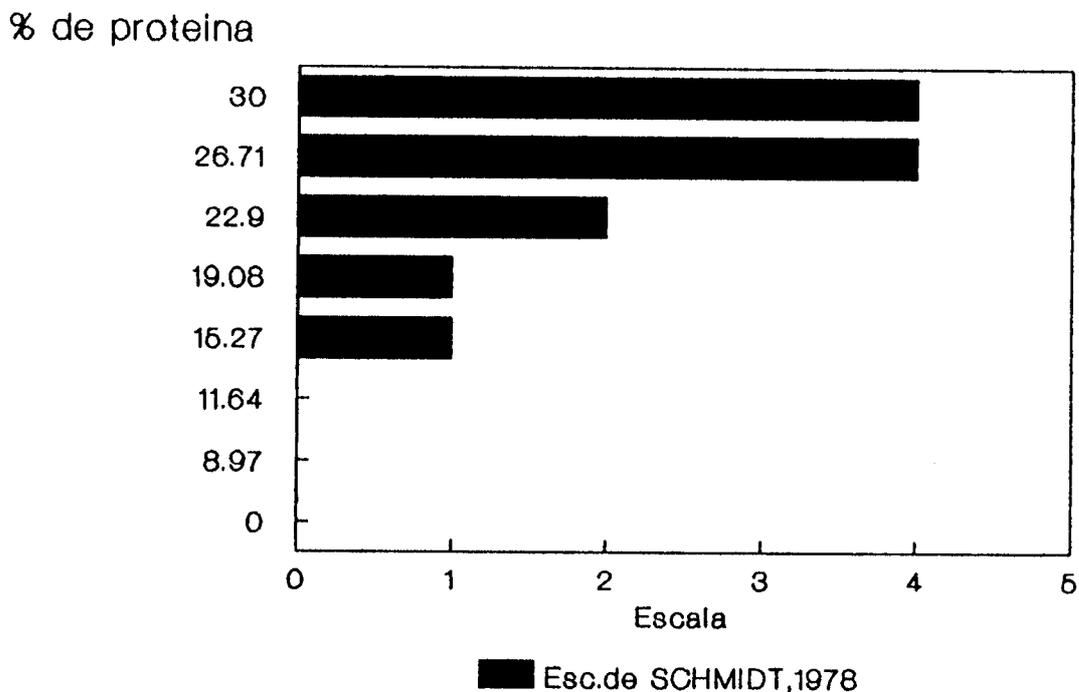


FIGURA 5: Gelificação das proteínas do extrato de *Saccharomyces cerevisiae* à várias concentrações protéicas

Pode-se observar que com o aumento do teor de proteína acima de 19,08% de proteína há um aumento da capacidade de gelificação. Segundo CHEFTEL *et al.* (1989) as atrações protéicas intermoleculares (e a gelificação) se produzem mais rapidamente com concentrações protéicas elevadas, dada sua maior probabilidade de contatos intermoleculares. Tem-se sugerido que as pontes dissulfito e grupos sulfidril são importantes para as ligações cruzadas das proteínas. As leveduras são deficientes em aminoácidos sulfurados. A mioglobina também não contém pontes dissulfito ou grupos sulfidril livres (MAHLER & CORDES, citados por HEGG, 1982) mas HEGG (1982) numa pesquisa realizada com várias proteínas encontrou um forte poder gelificante da mioglobina indicando que esses parâmetros não são importantes na formação do gel dessas proteínas. Conforme já mencionado no item II.4 as forças que mantêm a rede de gel junta são as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

O gel formado pelos extratos apresentou aparência uniforme, coágulo firme e estável, frente a sinéresis e exudação (Figuras 6 e 7). CHEFTEL *et al.* (1989) explicam que isso ocorre quando a etapa de agregação é mais lenta com relação a desnaturação, o que permite que os polipeptídeos parcialmente desdobrados se orientem mais facilmente antes da agregação. Como o método de avaliação da força do gel empregado neste trabalho é essencialmente subjectivo, podemos estar considerando gel fraco, o que outros autores considerariam gel firme. Ao se testar possíveis alterações do gel guardado em geladeira por 30 dias não se observou dessora ou qualquer outra alteração visível.

Pela avaliação feita pode-se concluir que existe boa possibilidade de uso dos extratos autolisados em "baby foods", purês, salsichas, etc., onde pelo aquecimento, há formação de gel e manutenção da estrutura desses alimentos.

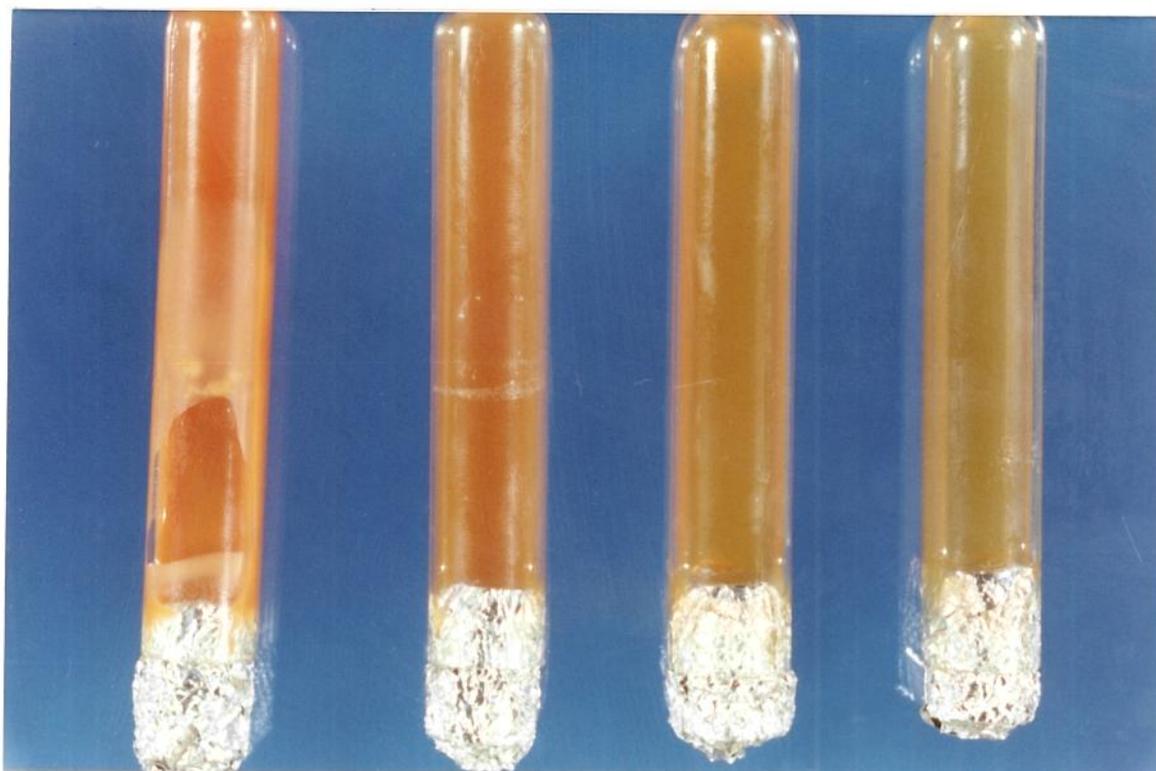


FIGURA 6: Gelificação das proteínas do extrato autolisado de *Saccharomyces cerevisiae* concentradas a 8.97, 11.64, 15.27 e 19.08% (da direita para a esquerda)

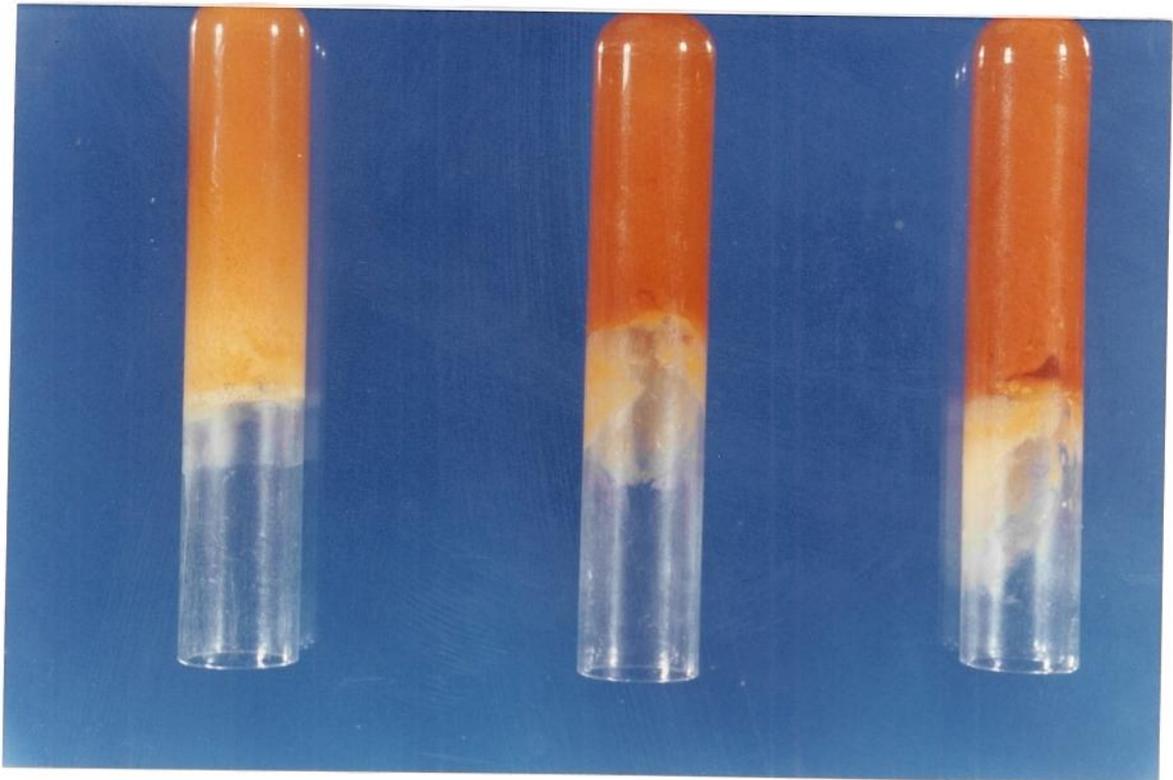


FIGURA 7: Gelificação das proteínas do extrato autolisado de *Saccharomyces cerevisiae* concentradas a 22.90, 26.71 e 30,0% (da esquerda para a direita)

IV.5.3.3- CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para a capacidade de emulsificação dos extratos protéicos concentrados da levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 16: Capacidade de Emulsificação das proteínas do extrato concentrado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

P (%)	V1 (mL)	V2 (mL)	V3 (mL)	E1	E2	E3	E mL/g
				(mL de óleo/g de prot.)			
1	53	53	54	106	106	108	106,7
3	150	149	155	100	99,3	103,3	100,9
5	208	206	200	83,2	82,4	80	81,9

Onde:

P - Concentração de proteína da amostra (%)

V - Volume máximo de óleo (mL) incorporado nas amostras

E - Capacidade de Emulsificação das amostras (mL/g).

O teste foi realizado em pH 5,45[±] 0,10, que corresponde a um dos picos de máxima solubilidade encontrados para a proteína da levedura. Segundo SWIFT *et al.* (1969) somente a fração de proteína solúvel funciona como emulsificante. YATSUMATSU *et al.* (1972) encontraram uma correlação positiva entre a percentagem de atividade de emulsão e índice de nitrogênio solúvel para proteínas de diferentes produtos de soja. Para KINSELLA (1976) a diminuição do pH causa a insolubilização das proteínas e diminuição da capacidade de emulsificação, assim como o aumento do pH a 8,5 (pH da clara do ovo) melhora esta propriedade funcional. A adição de sais necessários para ajustar o pH e mudar a força iônica, também têm efeito na capacidade emulsificante (CATER & LAWHON, 1974).

LINDBLOM (1974) submeteu um concentrado protéico de levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtido por precipitação térmica da proteína em pH alcalino (método adaptado por HEDENSKOG & MOGREN, 1973), a um tratamento alcalino sob condições controladas e achou para uma suspensão de 0,3% do concentrado protéico modificado uma capacidade de emulsificação de 320 g de óleo/g do concentrado protéico. Ele adicionou o óleo a uma taxa constante de 40 mL/minuto até ao colapso da emulsão que foi detectada pela mudança rápida de som do motor. Os 5% de solubilidade do concentrado protéico não modificado não foram suficientes para que este funcionasse como um efetivo agente emulsificante. Contudo o concentrado modificado, com solubilidade de 34%, apresentou boa capacidade emulsificante. VANANUVAT & KINSELLA (1975b) também afirmam que a proteína extraída com álcali e precipitada por tratamento térmico (80°C) não apresentou nenhuma capacidade de emulsificação.

SCHARF *et al.* (citado por HÁSLASZ & LÁSZTITY, 1991) patenteou um processo para produção de proteínas microbianas hidrolizadas mantendo as propriedades funcionais em que a capacidade de emulsificação se manteve entre 300 a 500 mL/g de proteína.

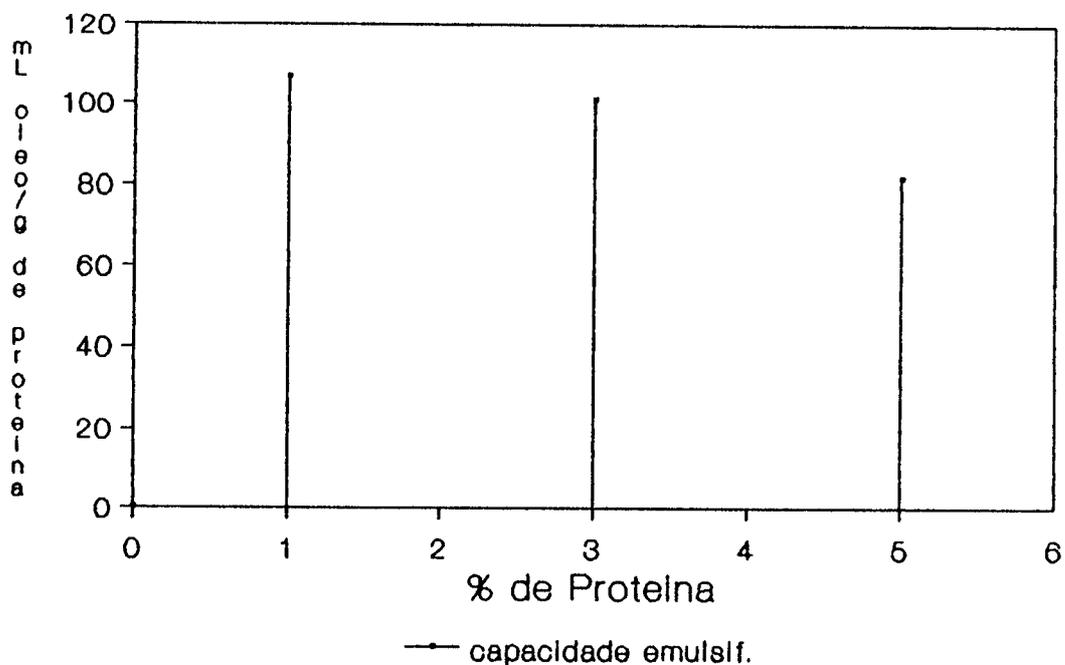


Figura 8: Variação da capacidade de emulsificação das proteínas do extrato concentrado de *Saccharomyces cerevisiae*, com o aumento da concentração protéica.

Como pode ser observado na Figura 8, a capacidade de emulsificação, expressa em mL de óleo por grama de proteína, diminuiu com o aumento da percentagem de proteínas de 1, 3 e 5% para 106.7, 100.9 e 81.9 mL/g de proteína. Isto também foi observado por IVEY *et al.* (1970) para proteína de carne bovina. Segundo os mesmos autores isso ocorre porque o aumento da concentração protéica exige

maior quantidade de fase contínua (solução protéica) para separação das gotículas de óleo. Para KINSELLA (1976) quando a concentração protéica diminui, ocorre um maior grau de exposição de polipeptídeos durante o cisalhamento envolvido no processo de emulsificação. Também ocorre uma maior associação hidrofóbica das cadeias peptídicas com as gotas de lipídeos resultando num maior volume de área superficial da proteína disponível e, portanto a eficiência do poder de emulsificação é melhorada.

A capacidade emulsificante dos nossos extratos autolisados se apresentou inferior a dos autores acima referidos pois, as condições de determinação da capacidade de emulsificação, tais como: concentração protéica, quantidade inicial da solução, quantidade inicial de óleo, pH, taxa de adição de óleo e velocidade de agitação foram diferentes. A ausência de padronização dessas condições torna muito difícil a comparação dos dados por diferentes pesquisadores. Ao adoptarmos uma velocidade de agitação de 16500 RPM, superior a usada por LINDBLOM (1974) que foi de 10000 RPM, obtivemos valores inferiores de capacidade de emulsificação. Altas velocidades de mistura diminuem a capacidade de emulsificação, como resultado da formação de glóbulos de gordura menores, aumentando área superficial exponencialmente e, conseqüentemente, a necessidade demais proteína como agente emulsificante.

HUFFMAN et al (1975) ao estudarem o efeito da velocidade de mistura na torta de óleo de girassol (*Helianthus annuus*) encontraram que o aumento da velocidade diminui a capacidade de emulsificação da torta desengordurada. A viscosidade da emulsão também aumentou com o aumento da velocidade de agitação. BECHER, mencionado por HUFFMAN et al. (1975) mostrou que o aumento da viscosidade da emulsão óleo-água com o aumento da força de cisalhamento se associam ao decréscimo do tamanho da partícula de óleo, aumentando, portanto, a área superficial a ser emulsificada por uma mesma quantidade de proteína solúvel.

Além dessas considerações, nossos dados relativos a diminuição da capacidade de emulsificação com o aumento da taxa de adição de óleo (90mL/minuto contra 40mL/minuto usados por LINDBLOM, 1974) estão de acordo com vários autores. HUFFMAN *et al.* (1975) também constataram que aumentando a taxa de adição de óleo acima de uma certa velocidade de mistura diminuiu a capacidade de emulsificação, sugerindo que membranas protéicas são formadas quase instantaneamente a altas taxas de adição de óleo. SWIFT *et al.* (1961) também encontraram o mesmo fenômeno em proteína da carne.

O efeito da velocidade de agitação, isoladamente, pouco diz sobre as condições ótimas de formação de emulsões. É necessário proceder à otimização do processo de emulsificação associando-se este fator às melhores condições de pH e concentração protéica para formação de emulsão.

O método utilizado para determinação da capacidade de emulsificação apresentou boa precisão já que não se verificaram variações da capacidade de emulsificação superiores a 4mL para uma mesma amostra.

IV.5.4- ANÁLISE SENSORIAL DOS EXTRATOS CONCENTRADOS

Na comparação entre as formulações para caldo de carne, para ambos os tipos de extrato de levedura foram obtidas médias muito próximas entre si (Tabela 17), não sendo encontradas diferenças significativas na preferência ($p < 0,05$) entre as várias percentagens de substituição de extrato de carne por extrato de levedura.

Tabela 17: Resultados da avaliação sensorial das amostras com substituições de extrato de carne por extrato de levedura nas formulações para caldo de carne⁽¹⁾

EXTRATO DE LEVEDURA	PERCENTAGEM DE SUBSTITUIÇÃO DE EXTRATO DE CARNE POR EXTRATO DE LEVEDURA			
	0	20	50	100
<i>S. cerevisiae</i>	5,31	5,90	6,02	6,05
<i>S. carlsbergensis</i>	5,25	5,45	5,45	5,25

(1) Médias obtidas em escala pontos.

Tabela 18: Frequência das razões para preferir ou rejeitar as formulações de caldo de carne com extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*

	RAZAO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
	menor amargor	----	01
PARA	melhor odor	02	01
PREFERIR	melhor sabor	14	14
	melhor teor de sal	08	09
	outros	01	----
	maior amargor	----	03
PARA	pior odor	02	01
REJEITAR	pior sabor	14	14
	pior teor de sal	07	07
	outros	02	----

Como pode ser observado na Tabela 18, a principal razão para atribuição do maior valor ou menor valor às amostras na escala hedônica, foi referente ao sabor e a seguir o teor de sal. Segundo ALBRECHT & DEINDOERFER (1966), os extratos apresentam a propriedade de enaltecer os sabores dos alimentos, porquanto contêm os agentes potenciadores como o glutamato monossódico, nucleotídeos e outros compostos aromáticos não identificados. Essas substâncias intensificam os aromas de carne, como também tornam sensíveis os aromas não perceptíveis normalmente, aumentando portanto os teores mínimos perceptíveis pelos sentidos ("threshold value"). Ademais o extrato de levedura contribui com o seu próprio sabor. Na nossa avaliação sensorial houve uma mínima referência ao amargor em relação ao caldo com extrato da levedura *Saccharomyces carlsbergensis*. Segundo os mesmos autores, o extrato contém, além dos componentes mencionados, apenas pequena quantidade do ácido aminobutírico que fornece uma sensação aromática picante. O aroma de uma espécie de proteína unicelular é função da espécie de microrganismo e do substrato sobre o qual ela se desenvolve (TANNENBAUM, 1975).

ALBRECHT & DEINDOERFER (1966) consideram que as propriedades aromáticas dos extratos são influenciadas pela concentração do extrato e pela natureza de outros ingredientes na fórmula. No presente estudo os provadores do caldo com a adição de teores crescentes de extrato de levedura, praticamente não encontraram diferença no gosto. Para ambos os tipos de levedura a partir de 20% de substituição as amostras atingiram médias mais altas que do caldo com 100% de extrato de carne. Essa conclusão é importante porque mostra que mesmo a substituição total do extrato de carne pelo extrato de levedura na formulação de caldos não provoca rejeição por parte do consumidor e torna viável a utilização de resíduo industrial de levedura de cerveja na alimentação humana.

V. CONCLUSÕES

1. Dentre os 3 tipos de solvente pesquisados, o clorofórmio é o que permite maior extração de proteína de levedura, mas a sua utilização não é permitida pela Legislação Brasileira.

2. O extrato autolisado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtido a pH 5, 7% de Etanol, 5% de cloreto de sódio e 55°C apresentou maior rendimento de extração do nitrogênio total da levedura (79,5%).

3. Na extração das proteínas da levedura *S. cerevisiae*, quanto menor a concentração da biomassa celular maior o rendimento.

4. Na extrapolação dos parâmetros de extração da levedura *S. cerevisiae* para a *S. carlsbergensis* obtiveram-se extratos protéicos de composição química semelhantes.

5. O método desenvolvido para obtenção dos extratos de *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis* apresentou teor de ácidos nucléicos de acordo com o mínimo permitido pela legislação.

6. Os extratos protéicos autolisados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram propriedades funcionais atrativas em relação a sua capacidade de gelificação e propriedades emulsificantes.

7. A comparação sensorial de caldos com extrato de carne e de caldos com substituição de até 100% do extrato de carne, mostrou preferência pelo extrato de levedura sem adição do extrato de carne.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLAH, M.A.; RIZK, I.R.S.; RAMADAN, E.M.; ABU SALEM, F.M. - Reserved carbohydrates of different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Die Nahrung*. 30(5):507-518, 1986.
- ACRAMAN, A.R. - Methods of yeast autolysis. *Proc.Biochem.*1(9):313-1966.
- ALBRECHT, J.J. & DEINDOERFER, F.H. - Autolysed Yeast Extract Make Foods Flavorful. *Food Eng.* 38(10):92-95, 1966.
- ALDER-NISSEN, J. & OLSEN, H.S. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In: *Functionality and protein structure*. A. POUR-EL, ed. 1979. p.125-146.
- AOAC. - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12 ed. Washington, D.C., 1975.
- ASPECTOS de nutricion y seguridad de las nuevas fuentes de proteínas para alimentacion de animales. *Bol. GAP* 4(3):12-20, 1974. (Norma nº15).
- AUTOLYSED yeast enhance flavors in low-sodium foods. *Food Dev.* 15(9):52, 1981.
- AUTRET, M. - World protein supply and needs. In: LAURIE, R.A.. *Proteins as human food*. Westport, AVI, 1970. p.3-19.
- BABAYAN, T.L.; BEZRUKOV, M.G.; LATOV, V.K. - Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Current Microbiol.*5:163-168, 1981.

- BEHALOVÁ, B.; BLÁHOVÁ, M.; SILLINGER, V.; MACHEK, F.- Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Acta Biotechnol.* 11(6):547-552, 1991.
- BETSCHART, A.A. - Nitrogen solubility of alfafa protein concentrate as influenced by various factors. *J. Food Sci.* 39:1110-1115, 1974.
- BETSCHART, A. & KINSELLA, J.E. - Extractibility of leaf protein. *J. Agric. Food Chem.* 21(1):60-65, 1973.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917, 1959.
- BRESSANI, R. The use of yeast in human foods. In: MATELES, R.I. & TANNENBAUM, S.R. *Single-cell protein.* Massachussets, M.I.T. Press, 1968. p.90-121.J
- BURNOW, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H. *Economic microbiology.* London, Academic press, 1979. V.4, p.32-35.
- CANELLA, M. - Whipping properties of sunflower protein dispersions. *Lebensm-Wiss Technol.* 11(5):259-263, 1978.
- CANELLA, M; CASTRIOTTA, G.; BERNARDI, A. - Functional and physicochemical properties of succinylated and acetylated sunflower protein. *Lebensm-Wiss. Technol.* 12(2):95-101, 1979.
- CANEPA, A.; PIEBER, M.; ROMERO, C.; TOHA, J.C. - A method for large reduction of the nucleic acid content of yeast. *Biotech. and Bioeng.* 14:173-177, 1972.
- CASTRO, A.C.; SINSKEY, A.J.; TANNENBAUM, S.R. - Reduction of nucleic acid content in yeast cells by bovine pancreatic ribonuclease treatment. *Appl. Microbiol.* 22:422-427, 1971.

- CATER, C.M. & LAWHON, J.T. - Utilization of cottonseed whey protein concentrates production by ultrafiltration. *J. Food Sci.* 39(1):183-187, 1974.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. - Proteínas alimentarias: bioquímica- propiedades funcionais- valor nutricional- modificaciones químicas. Zaragoza, Ed. ACRIBIA, 1989. 346p.
- CHEN, S.H.; CHEN, H.J.; SUNG, H.Y. - Studies on the protein isolates and nucleic acids from brewer's yeast. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* 23(3/4):318-327, 1985.
- CHEN, S.L. & PEPPLER, H.J. - Single cell protein in food applications. *Dev. Ind. Microbiol.* 19:79-94, 1977.
- CHEN, S.L. & PEPPLER, H.J. - Single cell protein in food applications. In: *Microbial Products in Foods*. 1990.
- CHILDS, E.A. & PARK, K.K. - Functional properties of acylated glandless cottonseed flour. *J. Food Sci.* 41:713-714, 1976.
- CHOI, Y.R.; LUSAS, E.W.; RHEE, K.C. - Effect of succinylation cottonseed flour during protein extraction on the yield and some of the properties of protein isolates. *J. Food Sci.* 46(3):954-955, 1981.
- CHRENOVA, N.M.; BEZRUKOV, M.G.; KOGAN, A.S.; SERGEEV, W.A. - Autolyse der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, induziert durch Metalkationen. *Die Nahrung.* 25:837-844, 1981.
- CHUNG, S.Y. - Effects of alkali treatment and heat treatment *J. Agric. Food Chem.* 34:579-84, 1986.
- CONTRERAS, E.G.; GUIMARÃES, J.G.L. - Determinação rápida de triptófano por reação com antrona; LIVRO DE RESUMOS DO CONGRESSO

- BRASILEIRO E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 12. Rio de Janeiro, p.100, 1989.
- COONEY, C.L.; RHA, C.K.; TANNENBAUM, S.R. - Single Cell Protein: engineering economics and utilization in food. *Adv. Food Res.* 26:1, 1980.
- CURRIE, J.A.; DUNNILL, P. ; LILLY, M.D. - Release of protein from bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an Industrial Agitador Mill. *Biotechnol. Bioeng.* 14:725-736, 1972.
- DAMODARAN, S. & KINSELLA, J.E. - Dissociation of yeast nucleoprotein complexes by chemical phosphorylation. *J. Agric. Food Chem.* 32:1030-1032, 1984.
- DANNER, J. & MORGAN, S.- *Biochim. Biophys. Acta* 76:652-57, 1963.
- DUNCAN - S.A.S. Institute Inc. *SAS/Stat user's Guide*, Release 6.03 Edition (Cary, NC: SAS Institute Inc.), 1988.
- DWORSCHÁK, E., ÖRSI, F., ZSIGMOND, A., TRÉZL, L., RUSZNÁK, I. - Factors influencing the formation of lysinoalanine in alkali-treated proteins. *Die Nahrung* 25(5):441-46, 1981.
- DZIEZAK, J.A. - Yeast and yeast derivatives: Applications. *Food Technol.* 41(2): 122-125, 1987.
- ENSAYOS pré-clínicos de nuevas fuentes de proteínas. *Bol. GAP* 4(3):20-35, 1974. (Norma nº6).
- E.U.A. Pat. 1,099,711 IFF - 1965.
- E.U.A. Pat. 4,285,976 C. AKIN & R.M.MURPHY *Methods for accelerating autolysis of yeast.* 25 Aug. 25, 1981.

- E.U.A. Pat. 4,218,481. K.C. CHAO; E.F. Mc CARTHY; G.A., Mc CONEGHY.
Yeast autolysis process. 19 Aug. 1980.
- E.U.A. Pat. 4,264,628. F.F. HILL. - Process for the production of a
yeast autolysate. 28 Apr., 1981.
- E.U.A. Pat. 3,867,555. J.A. NEWELL; E.A. ROBBINS; R.D. SEELEY -
Manufacture of yeast protein isolate having reduced nucleic acid
content by an alkali process. 1975.
- E.U.A. Pat. 3,585,179, H. SAMEJIMA; H. TERANISHI; T. DEGUSHI
Process for extracting proteins from microorganisms. 1971.
- E.U.A. Pat. 3,991,215. E.A. ROBBINS Manufacture of yeast protein
isolate having reduced nucleic acid content by a thermal
process. 1976.
- E.U.A. Pat. 4,135,000. E.H. SCHULDT Process for RNA reduction in
yeast involving the addition of Zn to yeast. 1979.
- E.U.A. Pat. 3,961,080. H. SUGIMOTO & T. YOKOTSUKO. Yeast extracts.
1 Jun. 1976.
- E.U.A. Pat. 4,303,680. T. TANEKWA; H. TAKASHIMA; T. HACHIYA, T.
Production of yeast extract containing flavouring . 1981.
- European Pat. 0,050,831. T.R. HOPKINS Production of protein with
reduced nucleic acid. 1986.
- FAO/WHO. - Energy and protein requirements: a report. Geneva, WHO,
1973, 118p. (WHO Technical report series, 522)
- FEDOROVA, N.V. & NEKLYUDOV, A.D. - Influence of concentration of
yeast biomass and exogenous proteolytic enzymes on intensity of
process of autolysis in Bakers' yeasts Appl. Bioch 21(6):573-577,

1985.

- FENNEMA, O.R. - Food chemistry. New York, Marcel Dekker, 1985. 991p
- FERRY, J.D. - Protein gels. *Adv. Protein Chem.* 4:1-5, 1948.
- FRANZEN, K.L. & KINSELLA, J.E. - Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. *J. Agric. Food Chem.* 24(5):914-919, 1976a.
- FRANZEN, K.L. & KINSELLA, J.E. - Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.* 24:788-795, 1976b.
- FRIEDMAN, M. & FINLEY, J.W. Evaluation of methods for tryptofan analysis in proteins. In: FRIEDMAN, M. Protein nutritional quality of foods and feeds, part I. assay methods- biological, biochemical and chemical. New York, Marcel Dekker, 1975. p.423-452.
- GRAY, W.D. - Studies on the alcohol tolerance of yeasts. *J. Bacteriol.* 42:561-574, 1941.
- GRONINGER, H.S.Jr - Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar protein. *J. Agric. Food Chem.* 21(6):978-981, 1983.
- GUAMONA, H. & MOCREN, H. - Some methods for processing of single-cell protein. *Biotechnol. Bioeng.* 15:129-142, 1973.
- GUIDELINE for human testin of supplementary food mixtures. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. Single cell protein II. Massachusetts, M.I.T. Press, 1975. p655-69.
- GUIDELINE on the production of single-cell protein for human consumption. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. Single cell

- protein II. Massachussets, M.I.T. Press, 1975. p655-69.
- HALÁSZ, A. - Biochemical and biotechnological principles of use of yeast biomass in food industri. Budapest, 1988. Thesis (Doct.Sci)- Hungarian Academy of Sciences.
- HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Budapest, Hungary: CRC Press, 1991. 305p.
- HALLING, P.J. - Protein stabilized foams and emulsions. C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15:155-203, 1981.
- HEDENSKOG, G.; MOGREN, H.; ENEBO, L.A. - A method for obtaining protein concentrates from microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 12:947-52, 1970.
- HEDENSKOG, G. & EBBINGHAUS, L. - Reduction of the nucleic acid content of single cell protein concentrates. Biotechnol. Bioeng. 14:447-457, 1972.
- HEDENSKOG, G. & MOGREN, H. - Some methods for procrssing of single cell protein. Biotechnol. Bioeng. 25:126-142, 1973.
- HEGG, PER-OLOF - Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins. J. Food Sci. 47(4):1241-1244, 1982.
- HERBERT, D.; PHILLIPS, P.J.; STRANGE, R.E. Methods Microbiology. 1971, 5B, 247p.
- HERMANSSON, A.M. - Physico-Chemical aspects of soy proteins structure formation. J. Texture Stud. 9:33-58, 1978.
- HOBSON, J.C. - Yeasts. Food Flavour., Ingredients Packg. Proc. 7(1):41-42, 1985.

- HOUGH, J.S. & MADDOX, I.S. - Yeast autolysis. Proc. Biochem. 5:50-52, 1970.
- HUANG, Y.T. & KINSELLA, J.E. - Functional properties of phosphorylated yeast protein: solubility, water-holding capacity, and viscosity. J. Agric. Food Chem. 34:670-674, 1986.
- HUANG, Y.T. & KINSELLA, J.E. - Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein. J. Food Sci. 52(6):1684-1688, 1987.
- HUFFMAN, V.L.; LEE, C.K.; BURNS, E.E. - Selected functional properties of sunflower meal (*Helianthus annuus*). J. Food Sci. 40(1):70-74, 1975.
- HUMPHRIES, C. Towards leaf protein as a human food. In: HUDSON, B.J.F.. Food protein I. London. 1982. p.263-268.
- HUTTON, C.W. & CAMPBELL, A.M. - Functional properties of soy concentrate and soy isolate in simple system and in a food system. Emulsion properties, thickening function and fat absorption. J. Food Sci. 42(2):457-460, 1977.
- IVEY, F.J.; WEBB, N.B.; JONES, V.A. -The effect of droplet size and interfacial film thickness on the emulsifying capacity of meat emulsions. Food Technol. 24:91-93, 1970.
- JOINT FAO/AD HOC EXPERT COMMITTEE - Energy and protein requirements: a report. Geneva, WHO, 1973. 118p. (WHO Technical report series 522).
- KILBERG, R. - The microbe as a source of food. Ann. Rev. Microbiol. 26:426-65, 1972.

- KIM, S.H. & KINSELLA, J.E. - Surface active properties of food proteins: effects of reduction of disulfide bonds on film properties and foam stability of glycinin. *J. Food Sci.* 52(1):128-131, 1987.
- KINSELLA, J.E. - Functional properties of proteins in foods: a Survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 4:219-81, 1976.
- KINSELLA, J.E. - Functional properties of proteins. Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* 7:273-288, 1981.
- KINSELLA, J.E. & SHETTY, H.J. - Yeast proteins recovery, nutritional and functional properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107:797-825, 1978.
- KINSELLA, J.E. & SHETTY, K.J. - Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. *Am. Chem. Symp.* 92:3-50, 1979.
- KNORR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. - An enzymatic method for yeast autolysis. *J. Food Sci.* 44(5):1362-1365, 1979.
- KNORR, D. - Effect of recovery methods on yield, quality and functional properties of potato protein concentrates. *J. Food Sci.* 45(6):1183-1186, 1980.
- LANARA (Lab. Nacional de Ref. Animal) *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: Métodos físicos e químicos.* Brasília-DF. 1981 v.2.
- LANFORD, G., KLINGERMAN, A., WILLIAMS, T. - Production of high quality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1163-65, 1979.

- LAWHON, J.T. & CATER, C.M. - Effect of processing method and pH precipitation from glandless cottonseed. *J. Food Sci.* 36:372-377, 1971.
- LEGGET BAILEY, J. *Miscellaneous Analytical Methods. Estimation of protein.* In: *Techniques in protein chemistry*. 2.ed. London, Elsevier, 1967. p.351.
- LIMON-LASON, J. - Reactor properties of a High-speed Bead Mill for microbial cell rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 21:745-74, 1979.
- LINBLUM, M. & MOGREN, H. - Enzymatic RNA reduction in desintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 16:1123-1133, 1974.
- LINDBLUM, M. - Properties of intracellular ribonuclease utilized for RNA reduction in desintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 19(2):188-210, 1977.
- LITCHFIELD, J.H. - Single cell proteins. *Food Technol.* 31(5):175-9, 1977.
- LOESECKE, H.W. - Controversal aspects: yeast in human nutrition. *J. Am. diet Ass.* 22:485-493, 1946.
- McWATTERS, K.H. & HOLMES, M.R. - Influence oh pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *J. Food Sci.* 44(3):770-781, 1979.
- MITCHELL, J.R. - Foaming and emulsifying properties of proteins. In: HUDSON, B.J.F. *Development in food proteins-4.* London, Elsevier Applied Science. 1986. p.291-338
- MITSUDA, H.; YASUMOTO, K.; NAKAMURA, H. - A new method for obtaining protein isolates from *Chlorella* algae, *Torula* yeasts and

- other microbial cells. Chem. Eng. Prog. Symp. 65(93):93-103, 1969.
- MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R.M.V. .Manual de soluções, reagentes & solventes: padronização-preparação-purificação. São Paulo, Ed. Edgard, Blucher, 1972. Cap. IV, p.275-7.
- MURRAY, D.G. - Flavoring for foods with reduced salt levels. Food Sanit. 3(9):331-334, 1983.
- NAUMENKO, N. I. & GORDIENKO, S. V. - Study of autolysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. Appl. Biochem. Microbiol. 21(6):577-580, 1985.
- NEURATH, H. & HILL, R.L. - The Proteins. 3.ed. New York, Academic Press, 1976. V.2.
- OHTA, S.; MAUL, S.; SINSKEY, A.J.; TANNENBAUM, S.R. - Reduction of the nucleic acid content of *Candida utilis*. Appl. Microbiol. 22:415- , 1971.
- OHTAKA, Y. & UCHIDA, K. - Biochim. Biophys. Acta 76:94- , 1963.
- OLIVEIRA, E.V. - Proteína derivada da cana de açúcar pelo desenvolvimento da *Saccharomyces cerevisiae* em melaço. Indústr. alim. 3(15):13-17, 1978a.
- OLIVEIRA, E.V. - Proteína derivada da cana de açúcar pelo desenvolvimento da *Saccharomyces cerevisiae* em melaço. Indústr. alim. 3(16):10-13, 1978b.
- PARKS, L.L.; CARPENTER, J.A.; REAGEN, J.O. - Effects of an autolysed yeast on physical and sensory properties of frankfurters. J. Food Qual. 9(4):225- , 1986.

- PEPPLER, H.J. - Uses of food yeast. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds. *The yeasts*. New York, Academic Press, 1970. v.1, p.440-446.
- PEPPLER, H.J. Production of yeast and products. In: PEPPLER, H.J.; PERLMAN, D. eds. *Microbial technology*. Orlando, Academic Press, 1979. v.2, p.157-62.
- PHAFF, H.J. - Structure and biosynthesis of the cell envelope. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds. *The yeast*. New York, Academic Press, 1971. v.2, p.135-210.
- REED, G. - Use of microbial cultures: yeast products. *Food Technol.* 35(1): 89-94, 1981.
- REED, G. & PEPPLER, H.J. - *Yeast technology*. Westport AVI, 1973. 378p.
- SCHMIDT, G. - Using yeast: bubbling over with yeast. *Food Flavour., Ingredients, Packg. Proc.* 9(5):25,27,29-30, 1987.
- SCHMIDT, R.H.; ILLINGWORTH, B.L.; AHMED, E.M. - Heat-induced gelation of peanut protein/whey protein blends. *J. Food Sci.* 43:613-621, 1978.
- SCHNEIDER, Ch.; MUSCHIOLIK, G.; SCHULTZ, M.; SCHMANDKE, H. - The influence of process conditions and acetylation on functional properties of protein isolates from broad beans *Die Nahrung* 30(3/4):429-431, 1986.
- SCHNELL, P.G.; AKIN, C. - Functional properties of yeast grown on ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56(1):82A-85A, 1979.
- SCHOEN, H.M. - Functional properties of protein and their measurement In: WHITAKERf, J.R. & TANNENBAUM, S.R. , eds *Food proteins*. Westport, Avi, 1977. p.387-400.

- SCRIMSHAW, N.S. Single cell protein for human consumption. An overview. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. Single cell protein II. Massachusetts, M.I.T. Press, 1975. p. 24-25.
- SHETTY, K.J. & KINSELLA, J.E. - Preparation of yeast protein isolate with low nucleic acid by succinilation. J. Food Sci. 44:633-638, 1979.
- SHETTY, J.K. & KINSELLA, J.E. - Ready separation of proteins from nucleoproteins by reversible modifications of lysine residues. Biochem. J. 191:269-72, 1980.
- SHETTY, J.K. & KINSELLA, J.E. - Isolation of yeast protein with reduced nucleic acids using reversible acylating agents. J. Agric. Food Chem. 30:1166-1171, 1982.
- SINSKEY, A.J. & TANNENBAUM, S.R. - Removal of nucleic acid in SCP. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. Single cell protein II. Massachusetts, M.I.T. Press, 1975. p.158-178.
- SISTA, V.R.; SRIVASTAVA, G.C. - SCP: its relevance in India context. Indian J. Microbiol. 21(3):259-64, 1981.
- SOBOLEVA, G.A.; POPOVA, E.A. - Fractional composition of the proteins of yeast grown on cellulosic hydrolysates. Prikl. Biochim. Mikrobiol. 22(3):368-71, 1988.
- SOLS, A.; GANCEDO, C.; DELA FUENTE, G. - Yielding metabolism. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds. The yeast. London, Academic Press, 1971. v.2, p.271-83.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. - Automatic recoding apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1190, 1958.

- SUGIMOTO, H. - Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of bakers yeast for preparing food-grade yeast extracts. *J. Food Sci.* 39:939-942, 1974.
- SUNG, H.Y.; CHEN, H.J.; CHUAN, S.J. - Preparation of yeast protein isolates with low nucleic acid content and improved functionality through chemical phosphorylation. In: International congress of food science and technology, 6. 1983. *Proceedings.* 2:7-9, 1983.
- SWIFT, C.E. - The emulsifying properties of meat proteins. In: *meat Ind. Res. Conf.*, 1965. *Proceedings...* - American Meat Institute, Chicago. p.78-98.
- TANNENBAUM, S.R. - Single cell protein, food of the future. *Food Technol.*, 25:962-6, 1971.
- TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.C.I. *Single cell Protein II.* Massachusetts, M.I.T. Press, 1975. p.564-588.
- TISOVSKI, S.; DURISIC, B.; STOJANOVIC, M. The use of yeast autolysate for augmentation of nutritive value of foods in modern conditions of nutrition. *Hrana Ishrana* 26(5/8):187-190, 1985.
- TREVELYAN, W.E. - Determination of uric acid precursors in dried yeast and other forms of single-cell protein. *J. Sci. Food Agric.* 26:1673, 1975.
- TREVELYAN, W.E. - Chemical methods for the reduction of the purine content of bakers' yeast, a form of SCP. *J. Sci. Food Agric.* 27:225-230, 1976a.
- TREVELYAN, W.E. - Autolytic methods for the reduction of purine content of baker's yeast, a form o SCP. *J. Sci. Food Agric.* 27:753-762, 1976b.

- TREVELYAN, W.E. - Induction of autolytic breakdown of RNA in yeast by addition of ethanol and by drying/rehydration. *J. Sci. Food Agric.* 28(6):579-588, 1977.
- TREVELYAN, W.E. - Effect of procedures for the reduction of the nucleic acid content of SCP on the DNA content of *S.cerevisiae*. *J. Sci. Food Agric.* 29(10):903-908, 1978.
- TULEY, L. Boostfor bovril. *Food Flavouring, Ingredients, Packg. Proc.* 8(8):20-21, 1986.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Extraction of protein, low in nucleic acid, from *Saccharomyces fragilis* grown continuously on crude lactose. *J. Agric. Food Chem.* 23(2):216-221, 1975a
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Some functional properties of protein isolates from yeast, *S. fragilis*. *J. Agric. Food Chem.* 23(4):613-6, 1975b.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. - Amino acid composition of protein isolates from *Saccharomyces fragilis*. *J. Agric. Food Chem.* 23(3):595-7, 1975c.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E.- Preparation of succinylated yeast protein: composition and solubility. *Biotechnol. Bioeng.* 20(9):1329-44, 1978.
- WANG, J.C. & KINSELLA, J.E. - Functional properties of novel proteins: alfafa leaf proteins. *J. Food Sci.* 41:286-292, 1976.
- 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.* 35:294-298, 1970.

WEBB, N.B.; IVEY, F.J.; CRAIG, H.B.; JONES, V.A.; MONROE, R.J. -
The measurement of emulsifying capacity by electrical resistance.
J. Food Sci. 35:501-504, 1970.

WOLF, J.W. - Soybeans proteins- their functional chemical and
physical properties. J. Agric. Food Chem. 18(6):969-976, 1970.

YATSUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MIRAKI, M.; TODA, J.;
WADA, T.; ISHII, K. - Whipping and emulsifying properties of
soybean products. Agric. Biol. Chem. 36(6):719-727, 1972.