



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

*"Modificações no processo de autólise de levedura (Saccharomyces sp)
visando melhorar a recuperação de
sólidos totais, a concentração de proteínas e o valor protéico do
extrato"*

Leonídia Leite Rosa

Nutricionista

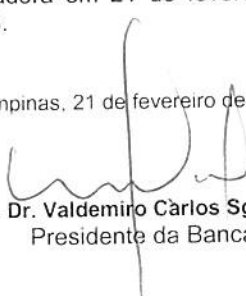
Orientador: *Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri*

Co-orientadora: *Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Leonídia Leite Rosa** aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de fevereiro de 2003.

Campinas, 21 de fevereiro de 2003.


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

Campinas/SP
2003

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição aplicada a Tecnologia de Alimentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	I/UNICAMP
	R71m
V	EX
TOMBO BC/	53342
PROC.	194103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/09/03
Nº CPD	

CM00181081-0

BIBID. 90690

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

R71m Rosa, Leonídia Leite
Modificações no processo de autólise de levedura (*Saccharomyces sp*) visando melhorar a recuperação de sólidos totais, a concentração de proteínas e o valor protéico do extrato / Leonídia Leite Rosa. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Co-orientador: Vera Lúcia Signoreli Baldini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

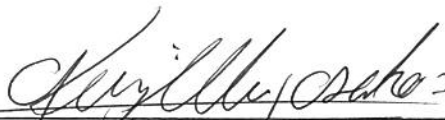
1.Leveduras. 2.Autólise. 3.*Saccharomyces cerevisiae*.
4.Extratos. 5.Enzimas. 6.Proteínas. I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II.Baldini, Vera Lúcia Signoreli. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

(Orientador) FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka

(membro) FEA/UNICAMP



Prof. Dra. Elisabeth Maria Macedo Viegas

(membro) FZEA/USP-Pirassununga

Dr. Flávio Luiz Schmidt

(membro suplente) ITAL

000813306

"As pessoas que nos compreendem são bênçãos que nos alimentam o ânimo de trabalhar, entretanto, aquelas outras que ainda não nos entendem são testes que a vida igualmente nos oferece, a fim de que aprendamos a compreender."

André Luiz

(mensagem psicografada)

*Dedico esta tese aos meus grandes
amores Tato e Rebeca os quais
serão sempre a razão de tudo...*

AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP,
especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição
pela oportunidade profissional.*

*Ao TATO e a CAPES
pelo auxílio financeiro indispensável
à realização desta pesquisa.*

*Ao ITAL,
Ao Centro de Química - Bioquímica,
pela disposição dos laboratórios e equipamentos
essenciais para a execução deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A DEUS, que em seu amor um dia me criou e por causa deste amor me concedeu voltar
e aprender mais uma lição nesta escola
“Terra.”*

Aos meus pais que me ensinaram a amar e acreditar que a vida é algo valioso.

*Agradeço com carinho meus irmãos Geraldo, Adriana e Rodrigo, aos meus sogros
Hélcio e Elizabeth e a minha família,
por fazerem parte da minha vida, os
quais sei que sempre poderei contar.*

*Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri,
que me acolheu e orientou, acreditando na minha capacidade para a realização deste
trabalho.*

*À pesquisadora do ITAL e minha co-orientadora Dra. Vera Lúcia S. Baldini que
contribuiu imensamente com suas
sugestões, deixando sua experiência
profissional nesta pesquisa.*

*Aos professores membros da banca,
pelas sugestões e contribuições apresentadas.*

*Ao Alexandre ,
pesquisador do CPQBA pela colaboração e a Prozyn e a Novo Nordisk pelas doações
das valiosas enzimas.*

*As amigas e “irmãzinhas desta e de muitas outras viagens” Janesca e Margareth,
pela profunda amizade e carinho que sempre me ofereceram.*

*Agradeço também a Beth Gomes pela amizade verdadeira e pelo apoio no laboratório,
estando sempre disposta a ajudar.*

*Muito obrigada à pesquisadora e amiga Dra. Maria Teresa B. Pacheco por sempre me
receber de forma carinhosa e com um
sorriso nos momentos de dúvidas, e por
ter lido e feito as primeiras correções e
sugestões do boneco.*

*A Alda e a Elza ambas pesquisadoras do TecnoLat (ITAL), pela gentileza do
empréstimo de suas instalações
laboratoriais para a execução deste
trabalho.*

*As amigas de pós-graduação,
Ana Silvia, Caroline Steel, Carolzinha, Denise, Helaine, Izabela, Leonice, Lidianne,
Miriam,
Nádia, Renatinha, Saula e Yara
pelo apoio durante a execução do trabalho
e pelos valiosos e divertidos momentos de convivência.*

*As meninas meigas e prestativas Elisvânia, Marfisa e Taciara que muito me ajudaram
no final do meu trabalho para a
obtenção do produto. Obrigada!*

*Aos amigos e funcionários do Centro de Química- Bioquímica,
Ana Rauen, Beth Lima, Cica, Ercília, Kátia,
Luzimara, Marjorie, Renato, Renatinho e Sandra.
pela amizade, paciência e atenção de sempre.*

*Às amigas do DEPAN,
Cida, Fátima, Farayde, Giovana, Ivonete, Lília Zago, Larissa, Susana, Soninha e Vera
pelo companheirismo e apoio. Ao
professor Carlos Grosso pela sua
simpatia e bom humor sempre presente.*

*Ao Cosme da Secretaria de Pós-Graduação pela gentileza, paciência e prestatividade
sempre presentes.*

*A copersucar e ao Karl pela atenção e incentivos
constantes.*

*A todos os amigos (as) que encontrei, mas que esqueci de citar seus nomes, minhas
sinceras desculpas e agradecimentos.*

ÍNDICE

RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 - Leveduras.....	03
2.2 - Rompimento celular.....	07
2.2.1 - Autólise.....	07
2.2.2. - Adição de Enzimas Exógenas.....	09
2.2.3 - Ação Mecânica	10
2.2.4 - Ação Química	10
2.3 - Aspectos nutricionais.....	11
2.4 - Aplicações industriais e funcionais tecnológicas.....	14
2.4 - Propriedades funcionais fisiológicas.....	15
3 - OBJETIVOS.....	18
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6 - CONCLUSÕES.....	53
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfil de aminoácidos essenciais de biomassa de levedura (BL) e concentrado protéico de levedura (CPL) comparado com perfil de referência FAO/WHO/UNU.....	12
Tabela 2.	Condições estabelecidas para obtenção do pré- autolisado.....	20
Tabela 3.	Representação esquemática dos ensaios preliminares realizados com diferentes células de levedura, combinações de enzimas e proteínas exógenas e parâmetros de autólise.....	23
Tabela 4.	Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G para ratos em crescimento.....	28
Tabela 5.	Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX.....	28
Tabela 6.	Mistura mineral AIN G-MX	29
Tabela 7.	Composição centesimal caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXP).....	44
Tabela 8.	Valores obtidos para os aminoácidos essenciais dos produtos: caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP), tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO (1990).....	46
Tabela 9.	Valores obtidos da ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso, quociente de eficiência protéica (PERop) e coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) na caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP).....	48

Tabela 10. Valores obtidos para digestibilidade verdadeira, nitrogênio ingerido e nitrogênio fecal para a caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP)..... **50**

Tabela 11. Características sensoriais do extrato de levedura (EX), extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE) e extrato de levedura com enzimas exógenas e coágulo de caseína (EXEP)..... **52**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da parede celular de levedura	05
Figura 2.	Fluxograma de obtenção da biomassa de levedura de preparo das células de levedura (lavagem).....	19
Figura 3.	Ilustração de “shaker” (New Brunswick).....	21
Figura 4.	Fluxograma de obtenção do extrato de levedura.....	21
Figura 5.	Influência da adição de enzimas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína no extrato seco (B) a partir de células BG de usina.....	35
Figura 6.	Influência da adição de enzimas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células BG de usina e cultivo (BG-lab).....	37
Figura 7.	Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células de BG usina e BG de cultivo (BG-lab).....	39
Figura 8.	Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células de BG usina.....	41
Figura 9.	Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) em extratos de células de BG usina.....	43
Figura 10.	Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 10% de proteína proveniente de caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas	

exógenas (EXEP) e dieta isenta de proteína (APRO).....	47
--	----

Figura 11. Ilustra o pó de extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE), extrato de levedura com enzimas exógenas e coágulo de caseína (EXEP) e extrato de levedura (EX).....	50
--	----

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a modificação do processo de autólise, da levedura *Saccharomyces sp*, através da introdução de enzimas e proteínas exógenas no meio autolisante, com vistas a melhoria da recuperação de sólidos totais, aumento da concentração de proteínas no produto final, melhoria do perfil de aminoácidos e propriedades nutritivas e possíveis alterações de características sensoriais. Três tipos diferentes de extratos foram produzidos: 1) extrato sem adição de enzimas e proteínas exógenas (Ex); 2) extrato com adição de enzimas exógenas (EXE); 3) extrato com adição de enzimas e proteínas exógenas (EXEP). De um modo geral conseguiu-se aumentos na recuperação de sólidos totais e da concentração de proteína, em várias modificações introduzidas. No estudo foram utilizadas leveduras de duas procedências: leveduras do tipo BG, proveniente de cultivo em meios artificiais (BG - cultivo) e levedura residual de destilaria (BG - usina). Em geral a recuperação de sólidos totais e as concentrações de proteína foram mais elevados para a (BG – cultivo). Para (BG – usina) o melhor resultado obtido foi com adição de 2% de flavourzyme e 0.6% alcalase, alcançando-se concentrações de proteína no extrato de 65% com 8 horas de incubação e da ordem de 70% com 24 horas. No mesmo tratamento a recuperação de sólidos totais com 4, 8, e 24 horas de incubação foi de 40% do autolisado e de 45% no tratamento usando as mesmas enzimas mais 10% de coágulo de caseína, com base na proteína total. De um modo geral a recuperação de sólidos não aumentou significativamente no período de 8 a 24 horas de autólise. Exceto para (EXE) que apresentou-se limitante em metionina e cistina, o perfil de aminoácidos essenciais atendeu perfeitamente o padrão recomendado pela FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos de idade. Quanto aos índices de valor protéico, o ganho de peso não diferiu para as dietas com caseína comercial (CC) e com o extrato (EXEP), que foi superior ao das dietas (EXE) e (EX), estatisticamente idênticos entre si. Em relação ao quociente de eficiência protéica operacional (PERop) e quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) os resultados foram os seguintes: os índices para CC foram superiores aos das demais dietas. As dietas contendo (EXE) e

(EXEP) não diferiram entre si sendo inferior à caseína, porém estatisticamente superior à dieta com (EX) cujos índices foram inferiores as demais dietas. Não se observou diferenças notáveis com relação ao perfil de sabor dos extratos analisados.

SUMMARY

The objective of this work was the modification of the yeast (*Saccharomyces sp.*) autolysis process by the introduction of exogenous enzymes and proteins in the autolysis media aiming at an increase in total solids yield, increase in protein concentration in the final product, improvement in the amino acid profile and nutritional property and possibly alterations the sensorial characteristics. Three different types of extracts were produced; 1) extract without addition of exogenous enzymes or proteins (EX); 2) extracts with addition of exogenous enzymes (EXE); 3) extracts with addition of exogenous enzymes and proteins (EXEP). In general an increase in total solids yields and protein concentration was observed in various modifications introduced. Yeast from two different origins were utilized: a BG type yeast originated directly from culture medium (BG – culture) and a BG type yeast from ethanol distillery (BG – usina). In general total solids yields and protein concentrations were higher from (BG – culture). Best results from the (BG – usina) was obtained with addition of 2% flavourzyme and 0.6% alcalase, where protein concentration reached 65% with 8h incubation and 70% with 24h. For the same treatment total solids yield at 4, 8 and 24h incubation reached 40% of the autolysate and of 45% in a treatment using the same enzymes plus 10% coagulated casein, on the basis of total protein. In general there was no significant improvement of total solids yield in the period of 8 to 24h of incubation. Except for the extract (EXE) which was limiting in methionine and cystine the essential amino acids profiles were adequate according to recommendation of FAO/WHO for children 2 to 5 years of age. As to protein nutritive value, body weight gain did not differ for the diets with commercial casein (CC) and with the extract (EXEP) which was superior to the diets containing (EXE) and (EX) which was statistically identical. Protein efficiency ratio (PER_{op}) and net protein ratio (NPR) were highest for (CC) followed by the diets containing (EXE) and (EXEP), with identical results, but superior to the diet containing (EX) which showed statistically inferior results. There were no important notable differences in the flavor profile of the analyzed extracts.

1. INTRODUÇÃO

A demanda de novas fontes de proteína levaram à busca de fontes alternativas que sejam de baixo custo e de alto valor nutritivo. Ao longo das duas últimas décadas, estudos têm demonstrado que os microorganismos apresentam-se como uma boa fonte para a obtenção de proteínas bem como de outras substâncias de interesse nutricional e industrial (enzimas, polissacarídeos, vitaminas, minerais).

Dentre os vários microorganismos existentes um dos mais utilizados para a produção de proteína e de outros compostos são as leveduras, conhecidas pela sua capacidade fermentativa, sendo utilizadas na panificação, produção de álcool e bebidas fermentadas. Segundo ICIDCA (1988), entre todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a que tem demonstrado maior valor industrial e comercial, devido ao seu alto teor de lisina.

As leveduras são consideradas ricas fontes de nutrientes, cuja composição apresenta em torno de 40-70% de proteína, com elevados teores de ácidos nucléicos e algumas vitaminas do complexo B (SGARBIERI, 1996). As leveduras e seus derivados possuem também propriedades funcionais de interesse industrial, dentre elas a capacidade de geleificação, capacidade de retenção de água e óleo, emulsificação, etc... (ALVIM, 2001).

Além do valor nutritivo, funcional tecnológico, a levedura apresenta também componentes com propriedades funcionais fisiológicas importantes tais como os nucleotídeos e nucleosídeos, glicanas e mananas e minerais como o zinco e selênio (CABALLERO-CÓRDOBA et al., 1997).

No entanto, para a obtenção destes componentes nutritivos é necessário que um tratamento prévio seja efetuado para que a parede celular desses microorganismos se rompa e libere tais nutrientes. O rompimento celular pode ser efetuado por métodos químicos (hidrólise), físicos (atrito mecânico) ou enzimáticos

(AMES & MACLEOD, 1985).

A biomassa de levedura pode ser utilizada em sua forma íntegra ou fracionada, tendo como seus principais derivados: o autolisado, o extrato protéico, o concentrado e o isolado protéico. Alguns desses produtos apresentam elevado valor nutritivo, baixo custo de produção e são amplamente utilizados como ingrediente na formulação de vários produtos alimentícios (GIESE, 1994).

O extrato de levedura, o qual é originado da biomassa de células de levedura frescas ou desidratadas, apresenta-se como uma fonte de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e outros componentes solúveis da célula. O extrato de levedura tem sido amplamente utilizado como agente flavorizante em sopas, molhos, "snacks" e alimentos enlatados, sendo reduzido o número de trabalhos direcionados para avaliação deste produto como fonte de proteína na alimentação animal (YORK & INGRAM, 1996; LAW, 2002).

Os derivados de levedura vêm sendo usados em alimentos formulados como complemento nutricional e como potencializadores de aromas e sabores, como agentes funcionais ou melhoradores de propriedades funcionais de outros produtos (OTERO et al., 1996; SOMMER, 1998).

Este trabalho foi parte de um projeto temático, que buscou viabilizar, tanto quanto possível o processamento e a utilização dos componentes da biomassa de levedura para o enriquecimento nutricional e sensorial de produtos alimentícios de uso geral ou específico, integrante da dieta diária da população.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leveduras

As leveduras são, sem dúvida alguma, o grupo mais importante de microorganismos explorado pelo homem no setor alimentício. Sua contribuição ao setor alimentício está relacionada, entre outras, com a capacidade de converter açúcares em álcool (STEWART & RUSSEL, 1983).

Estes microorganismos são encontrados amplamente na natureza, podendo na sua maioria, estar presentes em folhas, flores, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (KURTZMAN & FELL, 1998). As leveduras são definidas como fungos unicelulares, pertencentes às famílias *Ascomycota* e *Basidiomycota*, tendo a mesma estrutura subcelular dos animais e vegetais superiores (Osumi, 1998). Reproduzem-se tanto por via vegetativa quanto por via sexuada (WALKER, 1998).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada em fermentações industriais: na panificação, produção de vinho (incluindo cepas floculantes para produção de cidra), "sake", produção de álcool de amido ou cereal, produção de bebidas alcoólicas, além de servir como ferramenta para estudos de manipulação genética e fusão de protoplastos (KURTZMAN & FELL, 1998).

As leveduras podem ser classificadas em dois tipos: ativas e inativas. As que estão na forma ativa são usadas para fermentação, e as inativas são usadas como agentes flavorizantes ou como suplemento nutricional (Lee, 1996).

Alguns aspectos fisiológicos importantes na classificação das leveduras se referem à sua habilidade em fermentar a glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose, em utilizar determinados açúcares e alguns compostos nitrogenados. Em 1952, LODDER e KREGER-VAN RIJ escreveram a mais

extensa publicação sobre taxonomia de leveduras (KURTZMAN & PHAFF, 1987), revisada por LODDER (1970), BARNETT et al. (1983) e BARNETT et al. (1990).

Leveduras são tradicionalmente classificadas e identificadas em função de suas características morfológicas e fisiológicas. Para identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação, assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na identificação de leveduras. Esses microorganismos apresentam uma grande variação na habilidade de fermentar açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose, como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Kockovaella*, são estritamente não fermentativos (KURTZMAN & FELL, 1998).

Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies (WALKER, 1998), enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, trioses, hidrocarbonetos e lipídios são utilizados seletivamente por algumas espécies (PHAFF, 1990).

As leveduras se diferenciam dos protozoários por possuírem uma parede celular rígida (PELCZAR, 1980). A parede celular das leveduras é bastante espessa, cerca de 70 nm, o que corresponde à aproximadamente 10 vezes a espessura da membrana plasmática.

HOUGH (1990) atribui à parede celular uma espessura de 100-200 nm. Esta parede não apenas confere a proteção e estrutura, como também desempenha funções metabólicas importantes. Admite-se que a parede celular consiste de uma camada interna de glicana (provavelmente com funções estruturais) e uma camada externa de manana, havendo proteínas complexas entre as duas camadas (DZIEZAK, 1987).

A parede celular rígida das células de levedura apresenta estrutura complexa e dinâmica e essa estrutura falta às células animais. A parede celular está situada na superfície exterior da célula, e tem o papel importante no transporte de materiais para dentro e para fora das células (OSUMI, 1998).

De acordo com HUNTER & ANSEJO (1998), a parede celular de levedura, por ser uma estrutura complexa, é formada de diferentes polímeros, onde se incluem: proteínas, glicanas, mananas e pequena quantidade de quitina. A Figura 1 ilustra esquematicamente a parede celular de leveduras.

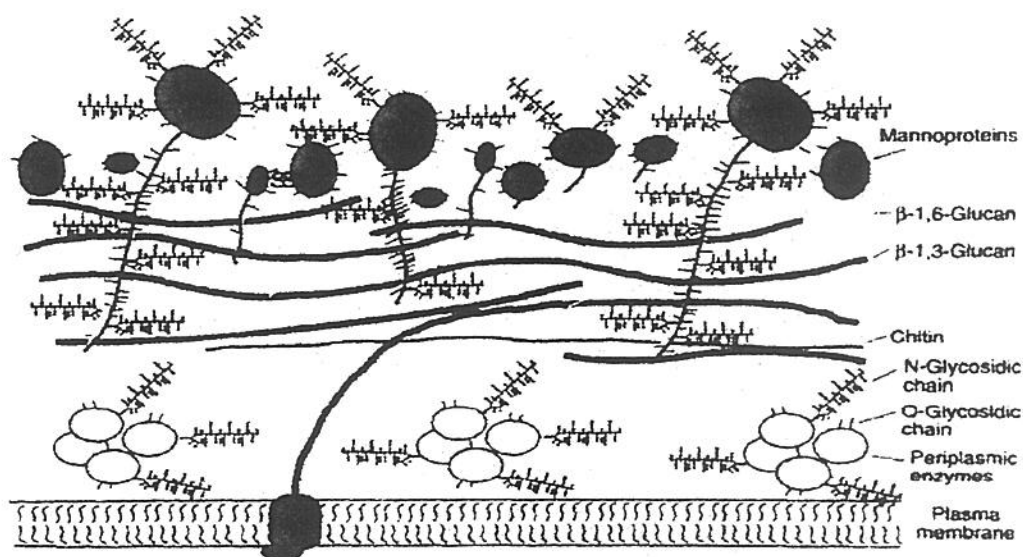


Figura 1. Representação esquemática da parede celular de levedura (OSUMI, 1998).

Um estudo relativo à arquitetura da parede da célula de *Saccharomyces cerevisiae* concluiu que ligações β 1,6 glicanas têm um papel central na organização da parede da célula de levedura. A β 1,6 glicana tem função importante nas interconexões das mananoproteínas, β 1,3 glicanas e quitina em *Saccharomyces cerevisiae* (OSUMI, 1998).

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contém cerca de 8% de proteína (HENDESKOG & MOGREN, 1973) podendo variar numa faixa entre 5 a 15% (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Todavia, a maioria destes dados foi baseada na determinação do nitrogênio total e uso do fator 5,8 para obter o teor de

proteína bruta. Esses valores estão sujeitos a erros devido a teores variáveis de nitrogênio não protéico, como N-acetil-glicosamina (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

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

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

Entre os estudos realizados sobre a morfogênese, tem sido dada grande atenção à biossíntese e estrutura dos componentes da parede celular. Com relação às paredes celulares de leveduras e fungos, foi verificado que elas apresentam estruturas complexas e dinâmicas, constituídas de múltiplas camadas compostas principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídios (GANDER, 1974). Os resultados obtidos sugerem que *S. cerevisiae* apresenta parede celular com estrutura em camadas, sendo as cadeias de mananas externas e as glicanas internas (VUKOVIC et al., 1994).

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

O método mais usual para extração da glicoproteína consiste na reidratação da parede celular (100 g) em 800 mL de solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), com homogeneização. Essa suspensão é autoclavada a 120° C por 30 minutos. Após resfriamento, é centrifugada a 13. 200 x g por 30 minutos a 5° C. O sobrenadante é concentrado à vácuo até 100 mL e adicionado a 300 mL de etanol 90° GL, sob agitação, e deixado 12 horas a 4° C para precipitação da glicoproteína, que é recuperada por centrifugação (LLOYD, 1970).

2.2. Rompimento celular

A levedura para ter seus componentes nutritivos intracelulares em especial as proteínas liberados, necessita ser fracionada para ter melhor aplicação tanto no setor alimentício quanto no farmacêutico (CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI, 2000).

Através do rompimento da parede da célula de levedura obtém-se uma maior digestibilidade das proteínas e de outros componentes nutritivos do meio intracelular.

A ruptura da parede celular pode-se dar por vários processos tais como: autólise, hidrólise, ação enzimática, ação química e ação mecânica (SGARBIERI, 1997).

2.2.1. Autólise

A autólise é o método de rompimento freqüentemente mais usado na produção de extrato de levedura. Durante este processo a célula é degradada pelas próprias enzimas endógenas (SOMMER, 1998). As enzimas proteolíticas intracelulares degradam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, e as nucleases atuam sobre os ácidos nucléicos para produzir nucleotídeos (SGARBIERI, 1996).

O processo de autólise é extremamente importante devido à presença da

parede celular rígida da célula de levedura, que é resistente à ação enzimática do trato digestivo humano (GALVEZ et al., 1990).

O processo de autólise pode ser iniciado com uma temperatura controlada ou choque osmótico. O pH controlado, a temperatura e o tempo de autólise são fatores decisivos para um bom desempenho do processo de autólise (SOMMER, 1998).

O tratamento térmico adequado para a autólise varia entre 40 e 65°C, que é a faixa de temperatura apropriada para a ativação das enzimas endógenas da célula de levedura.

O uso de agentes químicos ou também chamados de agentes plasmolizantes (NaCl e etanol), auxilia no processo de autólise por causar desarranjo do meio intracelular promovendo a lise da parede celular (HOUGH & MADDOX, 1970; SUGIMOTO, 1974). No entanto, as faixas de pH são muito diversificadas entre as citações feitas por vários pesquisadores, pois dependem do método de autólise a ser utilizado.

Em estudos realizados por CHAMPAGNE et al. (1999), demonstraram que o pH utilizado durante a autólise na produção de extratos de levedura é o fator principal que afeta o rendimento, proteólise e turbidez do produto. Frequentemente há interações entre pH e os promotores de autólise. Quando ocorre a redução do pH de 5,5 para 4,0 durante o curso da incubação, obtém-se extratos de levedura claros com limitado conteúdo de nitrogênio amínico. Por outro lado, uma troca de pH para 7,0 durante a incubação de autólise pode resultar em soluções turvas que possuem alta hidrólise de proteínas, o que é desejável como ingredientes em molhos.

Em outro estudo foi verificado que a adição de material previamente rompido (suspensão de pré-autolisado), contendo enzimas endógenas no meio

líquido extracelular da reação, melhora significativamente o tempo de incubação da autólise, obtendo-se melhores rendimentos e maior velocidade de hidrólises dos componentes nutritivos (NAGODAWITHANA, 1992).

Isto se deve ao fato de que, tais enzimas endógenas quando adicionadas em suspensão de levedura, irão também causar lise da superfície externa da parede celular de células íntegras, agindo como catalisadoras da reação (JIMENEZ et al., 1998; KOLLAR et al., 1992).

2.2.2. Adição de Enzimas Exógenas

Através de estudos de VERDUYN et al. (1999), verificaram que o rendimento em extrato pode ser melhorado com a adição de enzimas exógenas à suspensão de células de levedura.

CHAE et al. (2001), em seus estudos observaram que tratamentos enzimáticos em condições otimizadas produzem extratos de levedura que contêm principalmente peptídios de baixo peso molecular e aminoácidos livres, com uma recuperação de 55,1% dos sólidos totais.

SUPHANTHARIKA et al. (1999), verificaram que extratos protéicos de levedura podem ser modificados do ponto de vista organoléptico, dando novos sabores aos mesmos pela adição de enzimas exógenas. A adição de enzimas exógenas tem como objetivo reduzir o tempo de autólise e também a obtenção de produtos específicos pela lise da parede celular ou mesmo do material intracelular (CHAMPAGNE et al., 1999).

Geralmente pode-se notar que as enzimas mais comumente usadas no processo de autólise para produção de extratos são papaína, lisozima, zimolase, pancreatina, glucanex, protamex (KNORR et al., 1979; SUPHANTHARIKA, et al., 1999). Papaína hidrolisa preferencialmente ligações de peptídios de lisina,

arginina e fenilalanina, enquanto que a pancreatina hidrolisa ligações peptídicas do lado carboxil da arginina e resíduos de lisina (CONWAY et al., 2001). Glucanex hidrolisa ligações β 1,3 glicana e β 1,6 glicana da parede da célula de levedura.

Nos últimos anos, houve um aumento considerável, no uso de proteases como catalisadores. Essas enzimas oferecem vantagens de uso, sendo utilizadas em substituição aos catalisadores químicos convencionais por numerosas razões. As proteases exibem elevada atividade catalítica associada ao alto grau de especificidade pelo substrato, podem ser produzidas em grandes quantidades a custos economicamente viáveis e respondem a um quarto da produção total de enzimas comerciais (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998).

As enzimas glicanases possuem melhor capacidade para produzir lise da parede celular (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991), por atuarem nas ligações β -glicanas.

2.2.3. Ação Mecânica

O rompimento da célula de levedura também pode ser realizado através de atrito mecânico com o uso de um homogeneizador de alta pressão ou com o equipamento "Dynomill", que promove o rompimento pelo atrito entre as células de levedura em suspensão e esferas de vidro (OTERO et al., 2000; PACHECO, 1996). Este tipo de processamento é utilizado quando se quer obter proteína intacta, para que esta não perca sua conformação estrutural ou seja hidrolisada.

2.2.4. Ação Química

Os métodos químicos podem ser pelo uso de agentes plasmolizantes já citados anteriormente, mas também a hidrólise ácida feita com ácido forte concentrado, sendo usado geralmente o ácido clorídrico (RICCI-SILVA et al., 2000). A maior desvantagem é que a neutralização do ácido provoca um aumento no teor salino do hidrolisado ou do extrato (NAGODAWITHANA, 1992).

2.3. Aspectos nutricionais

As leveduras têm sido usadas na alimentação humana desde tempos remotos. São consideradas ricas fontes de nutrientes, cuja composição está em torno de 40 - 70% de proteína, elevado conteúdo de ácidos nucléicos e elevada concentração de algumas vitaminas do complexo B (SGARBIERI, 1996).

De acordo com a FAO/WHO/UNU (1985), uma proteína pode ser considerada de boa qualidade nutricional se, em sua composição, apresentar quantidade adequada e equilibrada de aminoácidos essenciais em relação ao que se considera como padrão, e possuir boa digestibilidade.

A Tabela 1 mostra uma comparação entre o perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) de biomassa de levedura (BL) e concentrado protéico de levedura (CPL) comparado com perfil de referência FAO/WHO/UNU.

Os autores consideram que a proteína de levedura apresenta um bom perfil e balanço de aminoácidos em relação ao padrão da FAO/WHO/UNU (CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI, 2000) sendo, no entanto, deficiente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Por outro lado, é rica em lisina. A quantidade encontrada de glicídios está em torno de 26 a 36%, lipídios varia entre 2 e 7%, e cinza entre 5 e 10% (OTERO et al., 1996).

Tabela 1. Perfil de aminoácidos essenciais de biomassa de levedura (BL) e concentrado protéico de levedura (CPL) comparado com perfil de referência FAO/WHO/UNU (1985).

Aminoácidos Essenciais (g/100g prot.)	BL	CPL	FAO/WHO/UNU
Lisina	7,13	8,78	5,8
Leucina	8,84	8,62	6,6
Isoleucina	5,64	5,09	2,8
Treonina	6,16	4,07	3,4
Triptofano	1,10	1,39	1,1
Valina	6,20	5,91	3,5
Metionina + cistina	2,84	2,30	2,5
Fenilalanina + tirosina	9,98	8,79	6,3
Histidina	2,06	2,77	1,9
Lisina (disponível)	5,69	5,06	-
Escore de Aminoácidos Essenciais*	98,10	87,24	-

*Baseado na lisina disponível (CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI, 2000).

Da quantidade total de proteína bruta, aproximadamente 20% do nitrogênio não é de origem protéica, sendo proveniente de ácidos nucléicos e outros componentes nitrogenados (BRESSANI, 1968; REED & PEPPLER, 1973).

Entretanto, com relação aos minerais, a suplementação com leveduras tem melhorado em muito as deficiências de selênio e cromo (REED & NAGODAWITHANA, 1991).

Em estudos microbiológicos, os lactobacilos mostram-se muito exigentes nutricionalmente, requerendo uma grande variedade de aminoácidos para o seu crescimento, sendo o conteúdo de nitrogênio presente no extrato de levedura um dos principais fatores para seu crescimento. Alguns lactobacilos usam para sua alimentação aminoácidos livres e outros preferem peptídios (CONWAY et al.,

2001).

As leveduras contêm em média 6 a 8% de RNA, os quais são degradados a nucleotídeos no processo de autólise. Os ácidos nucleicos são constituídos de bases purinas e pirimidinas que contêm nitrogênio em suas estruturas. As principais bases purínicas são adenina e guanina, e as de pirimidínicas tiamina, citosina e uracil. Os nucleotídeos constituem os blocos que formam o DNA e o RNA, e desempenham funções estruturais, metabólicas e energéticas que são essenciais à vida (ADJEI et al., 1995).

Deve-se levar em conta que o elevado conteúdo de ácidos nucleicos presentes na biomassa de levedura e os seus metabólitos podem levar o organismo à formação de cálculos renais e a uma doença chamada "gota" que consiste no acúmulo de ácido úrico nos tecidos e cartilagens (PACHECO, 1996).

Adicionalmente, o extrato de levedura possui propriedades antioxidantes provenientes das concentrações de glutathione, que é um tripeptídeo de ocorrência natural nas células. A levedura contém aproximadamente 0,65% de glutathione (SOMMER, 1998).

As fibras de levedura formam a fração insolúvel (parede celular) do autolisado, sendo composta principalmente por β -glicanas, e menores proporções de mananas e glicoproteínas (SUPHANTHARIKA et al., 1999).

A levedura e seus derivados têm sido considerados boas fontes de proteínas quando analisados seus índices nutricionais como, digestibilidade, PER e NPR (CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI, 2000).

Em seus estudos PACHECO et al. (1997), observaram que a biomassa de levedura tem a capacidade de promover crescimento e também de reter nitrogênio semelhantemente à caseína, comprovando ser uma excelente fonte de proteína.

2.4. Aplicações industriais e funcionais tecnológicas

A levedura tem uma excelente capacidade fermentativa sendo a aplicação mais antiga deste microorganismo sua utilização tanto em processos caseiros como industriais. Seu emprego mais tradicional é na indústria de panificação, na fermentação de pães e expansão das massas fermentáveis com produção de CO₂.

A obtenção de extrato e da parede celular de levedura é de extremo interesse, para serem usados como suplementos e/ou componentes nutritivos em alimentos realçando sabor, além do aumento do valor nutricional dos mesmos (KOLLAR et al., 1992). Autolisados e extratos de leveduras são principalmente usados como enaltecedores de sabor, ou até mesmo como sabor principal. O glutamato e os nucleotídeos são os componentes mais concentrados e importantes nos autolisados de levedura (SOMMER, 1998). Segundo VAN DAMME (1994), o extrato protéico de levedura pode conter nucleotídeos que irão enaltecer as características de sabor do produto. Nucleotídeos do tipo 5' (Guanosina - 5' - monofosfato, GMP e inosina - 5' - monofosfato, IMP) são de grande interesse para a indústria de alimentos, pois conferem sabor e estabilidade a produtos como '*snacks*' (IGUTI, 1996). Em combinação com o ácido glutâmico, o 5' nucleotídeos melhoram as propriedades de sabor que irão interagir e promover excitação contínua dos receptores nas papilas gustativas, que criam um maior potencial gustativo para o sabor (SOMMER, 1998).

O efeito flavorizante que as leveduras fracionadas confere aos produtos formulados simula sabor a queijo, carne, assado e, portanto, são de ampla aplicação na formulação de sopas, temperos, molhos, conservas alimentícias, produtos cárneos (embutidos), massas e panificação (NÓBREGA, 1985; NELSON & BISHOP, 1998).

Dentre os metabólitos sintetizados pelas leveduras, o etanol é o produzido em maior quantidade. As principais bebidas produzidas por fermentação alcoólica, em todo mundo, são a cerveja, vinho, cidra e as destiladas, aguardente, rum e uísque (WALKER, 1998).

As mananoproteínas extraídas da parede celular das células de *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram ser bioemulsificantes ativos, pois formam emulsões espessas e viscosas. Sendo assim, a produção de bioemulsificante é economicamente atrativa pois o processo gera um alto rendimento e possui elevado valor como produto (BARRIGA et al., 1999).

Pode-se notar também, um elevado teor da capacidade emulsificante do isolado protéico de levedura em diversas faixas de pH, quando comparado com o isolado protéico de soja. O mesmo fato aplica-se quando se analisa a capacidade de retenção de água do concentrado protéico de levedura e da proteína da parede celular, que são superiores à capacidade de retenção de água do isolado protéico de soja. Da mesma forma resultados satisfatórios são atribuídos aos estudos referentes à capacidade de absorção de óleo comprovando que produtos derivados de levedura possuem boas propriedades funcionais tecnológicas (OTERO et al., 1996).

Em relação à solubilidade, as proteínas de levedura apresentam uma maior solubilidade em pH alcalino (PACHECO et al., 1998).

2.5. Propriedades funcionais fisiológicas

Segundo CARVER et al., (1991), não é totalmente conhecido o mecanismo preciso da ação dos nucleotídeos no processo de imunidade celular em ratos, os dados disponíveis até o momento sugerem que a suplementação com nucleotídeos pode contribuir para o aumento do “pool” de nucleotídeos disponíveis para formação de leucócitos. Em estado de estresse ou deficiência nutricional, a

maturação e a ativação dos linfócitos T ficam comprometidas KULKARNI et al., (1994).

PIZZINI et al., (1990), demonstraram em modelo animal (ratos Wistar machos), que a suplementação da dieta com nucleotídeos restaurou o sistema imune durante o período de estresse nutricional.

A ativação dos linfócitos T causa um rápido aumento na síntese de nucleotídeos que são imediatamente requeridos para aumentar e cobrir a energia necessária no metabolismo e, posteriormente, para a síntese dos ácidos nucleicos em ratos (VAN BUREN et al., 1994).

A adição de derivados dos ácidos nucleicos na dieta normal ou na dieta quimicamente definida, pode ser benéfica à saúde, melhorando completamente as funções imunológicas do organismo de ratos (ADJEI et al., 1995).

Em estudos realizados com ratos que sofriam de diarreia crônica, foi observado que o intestino destes animais foi recuperado com nucleotídeos do tipo AMP, CMP, GMP, UMP, IMP que atuam em todo o sistema gastrointestinal destes animais (NUNEZ et al., 1990).

A proteína de levedura *Saccharomyces cerevisiae* do gene VMA1 foi recombinada com uma proteína do hormônio da paratireóide humana (hPTHrP) (1-139), criando-se então uma proteína recombinante que anulou os efeitos inibitórios do fator de crescimento. Isto vem confirmar que peptídios quando manipulados geneticamente podem promover mudanças nas células e conseqüentemente em suas funções biológicas (WU et al., 2000).

Em seus estudos in vitro JYONOUGH et al., (1992), demonstraram que a suplementação com RNA de levedura, em meio de cultura, melhorou a produção e a função dos linfócitos de seres humanos.

Pacheco et al. (1999), realizaram testes onde se estudou a capacidade de ligação de íons cálcio com isolado protéico de levedura após tratamento com trimetafosfato de sódio, em que se observou um grande número de sítios de ligações para interagirem com esses íons, conseguindo então um produto com boas características nutricionais, além de contribuir com a absorção de íons cálcio na dieta.

Atualmente existe grande interesse no uso de fibras na rotina dietética dos indivíduos, devido ao efeito hipocolesterolêmico que a fibra solúvel oferece. As glicanas de levedura podem ser utilizadas como fibra dietética segundo HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

Mananas e glicanas de levedura apresentam propriedades gustativas semelhantes à gordura líquida ou óleo e, portanto, podem ser usadas como substituto da gordura, em dietas de baixas calorias (BAIRD & PETTIT, 1991).

Efeito estimulatório na restauração de células da medula do fêmur em camundongos foi atribuído as mananas extraídas de levedura (CHERNYSHEVA et al., 1991). Polímeros sulfatados de glicana derivados de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser considerados imunologicamente ativos, pois estimulam a proliferação de células na medula óssea, exercendo atividade terapêutica antitumoral por via intravenosa, em animais de laboratório (WILLIAMS et al., 1992).

De acordo com IDOTA et al., (1994), os oligossacarídeos têm sido bastante estudados como ingrediente funcional na alimentação, pois agem no organismo como bioingredientes inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, como *Salmonella* e *Escherichia coli* e estimulam o crescimento de *Bifidobacterium* sp. os quais são considerados probióticos no intestino do homem e de animais.

3. OBJETIVOS

3.1. Aumentar a concentração de proteína do extrato de levedura obtido após o processo de lise por meio da adição de enzimas exógenas (proteases e carboidrases) a fim de promover maior hidrólise, lise da parede celular e melhorar a qualidade da proteína solúvel quanto à composição de aminoácidos do produto final.

3.2. Obter características modificadas de sabor que sejam bem aceitas em relação à análise sensorial do extrato produzido.

3.3. Aumentar a qualidade nutricional do extrato protéico através de melhoria do perfil de aminoácidos

3.4. Comparar a recuperação e a qualidade do extrato obtido com ou sem adição de enzimas exógenas, da levedura residual da destilaria de álcool e de uma levedura selecionada de cultivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA-PRIMA

A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizada na pesquisa foi proveniente da fermentação alcoólica procedente da usina São José associada a Coopersucar, com sede em Piracicaba-SP. O material foi obtido da produção de álcool no fim do processo de fermentação alcoólica, quando a levedura decanta e é feita a coleta de parte da suspensão de levedura (sangria). A levedura foi coletada na usina em recipientes de 200L e transportada até o ITAL, onde foi mantida sob refrigeração a 5°C até o processamento. Inicialmente foi submetida a procedimentos de lavagem para a retirada de resíduos de mosto e de álcool, sendo em seguida seca em spray dryer, seguindo o procedimento descrito no fluxograma da Figura 2.

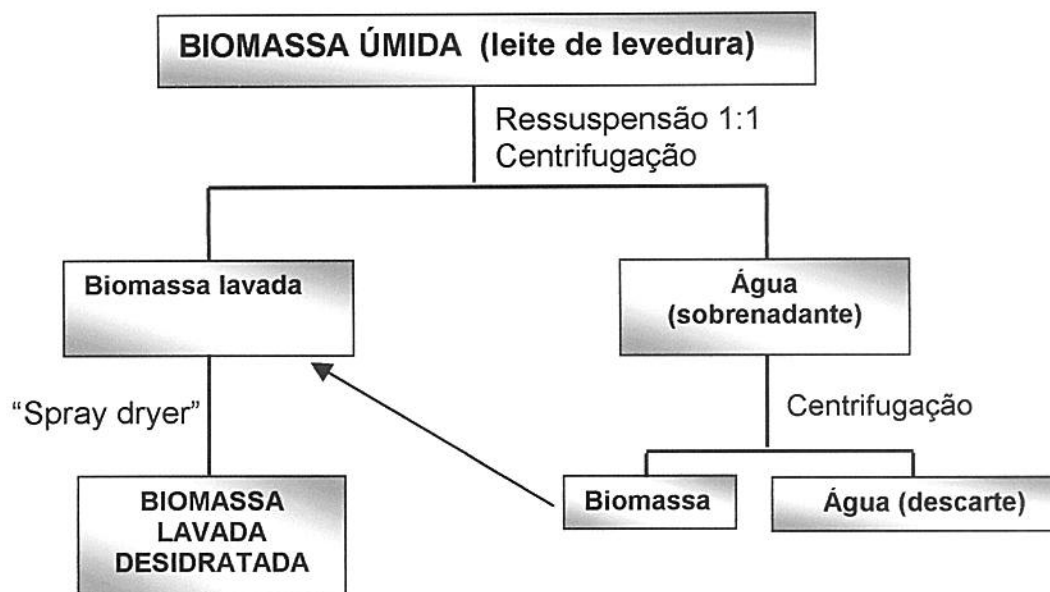


Figura 2. Fluxograma de obtenção da biomassa de levedura de preparo das células de levedura (lavagem).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtenção do extrato de levedura desidratado

O pré-autolisado foi produzido a partir de uma suspensão de levedura preparada nas condições descritas na Figura 2. As condições de preparo do pré-autolisado são apresentadas na Tabela 2. Após o período de incubação (6-8 horas), o pré-autolisado foi recolhido e armazenado sob refrigeração a 5°C até a adição da suspensão de levedura a ser autolisada.

Tabela 2. Condições estabelecidas para obtenção do pré-autolisado

Condições Experimentais	Parâmetros
Suspensão de levedura	15% v/v
Cloreto de sódio (NaCl)	2% p/p
Temperatura	55 ± 2°C
Tempo de incubação	6 a 8 h
pH	6,0 – 6,5

Segundo KOLLAR et al. (1992) o uso de um pré-autolisado é muito importante, porque age como um ativador no processo de autólise, pois contém enzimas endógenas liberadas no meio extracelular, que auxiliam no rompimento de novas células.

4.2.2. Obtenção de autolisado

Foram feitas suspensões contendo 15% (p/v) de células de levedura desidratada procedente da fermentação alcoólica (célula BG usina), em água com 2% de cloreto de sódio (p/v). A esta mistura foi adicionado o material pré – autolisado, previamente preparado (Tabela 2) na proporção de 15% (v/v), e o pH ajustado para 6,5. Logo a seguir, esta suspensão foi incubada em “shaker” (New Brunswick, figura 3) com agitação (200 rpm) à temperatura de 55°C.



Figura 3. Ilustração de "shaker" (New Brunswick).

O processo foi monitorado com termômetro calibrado, onde alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos, no período de 0-24h. Após a autólise, as enzimas foram inativadas por tratamento térmico a 85°C durante 20 minutos, e posteriormente o autolisado foi submetido a um resfriamento rápido em banho de gelo. A obtenção do extrato de levedura pode ser visualizada na figura 4.

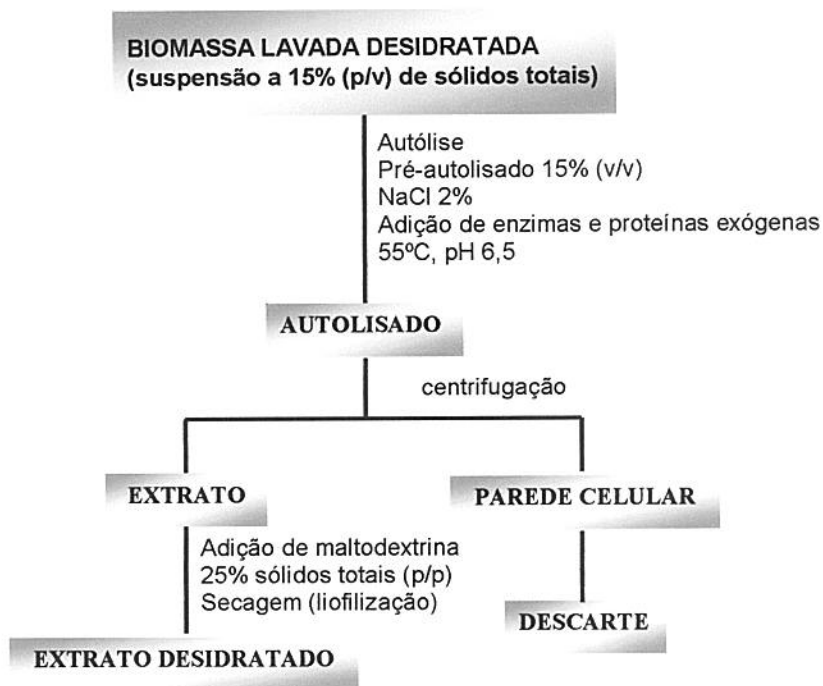


Figura 4. Fluxograma de obtenção do extrato de levedura

As amostras de autolisado foram centrifugadas a 12000 rpm durante 20 minutos com temperatura de 5 -10°C em centrífuga RC 26 Plus Sorvall (rotor pequeno para tubos de 50 mililitros). A fração solúvel (extrato) e o autolisado total após 24h de incubação foram utilizados para avaliar a recuperação de sólidos totais e a concentração de proteína no extrato, a fração insolúvel (parede celular) foi descartada.

Autólise com adição de enzimas e proteínas.

Na autólise com enzimas e proteínas exógenas, utilizou-se a metodologia para a produção de autolisado descrita acima, onde além dos procedimentos efetuados, foram adicionadas à suspensão as enzimas e proteínas exógenas com a finalidade de melhorar a recuperação de sólidos totais e o teor de recuperação e hidrólise da proteína no extrato. Foram realizados vários testes preliminares com distintos tratamentos enzimáticos. As enzimas utilizadas foram proteases e carboidrases e as proteínas foram coágulo de caseína obtido por coagulação enzimática e soro de leite desidratado.

A Tabela 3 resume as condições em que foram realizados os ensaios preliminares, a fim de se conhecer os melhores parâmetros de autólise, possibilitando a escolha de dois extratos para a produção de dietas que foram testadas em ensaio biológico.

Tabela 3. Resumo dos ensaios realizados com diferentes células de levedura, combinações de enzimas e proteínas exógenas e parâmetros de autólise.

Ensaio	Célula de Levedura	Enzima utilizada	Proteína Exógena	Parâmetros de Autólise
Experimento I (figura 5 AB)	BG-usina	Papaína (pa) (0,25%) Papaína Brauzyn p.p (0,5; 1,0 e 1,5%) Papaína Brauzyn 100 (0,25; 0,50%) Pancreatina (4mg e 8mg/g substrato)	(sem adição)	pH= 5,5 temperatura= 50°C Tempo= 8 e 24 h NaCl= 2% (p/p) Pré autolisado 15% (v/v)
Experimento II (figura 6 AB)	BG-usina BG-laboratório	Pancreatina (8mg/g substrato) Glucanex (3g/hL)	(sem adição)	pH= 5,5 temperatura= 55°C Tempo= 0,1,8 e24 h NaCl= 2% (p/p) Pré autolisado 15% (v/v)
Experimento III (figura 7 AB)	BG-usina BG-laboratório	Papaína Brauzyn 100 (0,50%) Glucanex (3g/hL)	Coágulo de caseína 10%*	pH= 5,5 temperatura= 55°C Tempo= 0,1, 8 e 24 h NaCl= 2% (p/p) Pré autolisado 15% (v/v)
Experimento IV (figura 8 AB)	BG-usina	Papaína Brauzyn 100 (1,0; 1,2; 1,4%) Protamex (1,0;1,2;1,4%)	Coágulo de caseína 10% Soro de leite desidratado 10%*	pH= 6,5 temperatura= 55°C NaCl= 2% (p/p) Pré autolisado 15% (v/v) Tempo= 0,4,8 e24 h
Experimento V (figura 9 AB)	BG-usina	Flavourzyme 2% Alcalase 0,6%	Coágulo de caseína 10%*	pH= 6,5 temperatura= 55°C NaCl= 2% (p/p) Pré autolisado 15% (v/v) Tempo= 0,4,8 e24 h

* Adição de proteína exógena na base de 10% da proteína bruta na biomassa

4.2.3. Produção de autolisados em escala piloto para obtenção de extratos modificados aplicados em dietas experimentais.

Os extratos modificados que apresentaram melhores teores na recuperação de sólidos totais e concentração de proteína foram obtidos em escala piloto a partir de suspensões a 15% de sólidos (p/v) em fermentadores de 80 litros no Centro Pluridisciplinar em Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Os parâmetros de autólise foram seguidos de acordo com a Tabela 3, conforme citados anteriormente. O tempo de incubação adotado foi o que apresentou o melhor resultado para a recuperação de sólidos no extrato e para a concentração de proteínas.

Após a fermentação o material foi centrifugado, obtendo-se a fração insolúvel (parede celular) que foi descartada e a fração solúvel (extrato) que foi analisada quanto ao perfil nutricional. Aos extratos foi adicionada a maltodextrina (25%, p/p) em relação aos sólidos totais para aumentar o teor de sólidos, facilitando a secagem no liofilizador e diminuindo a hidrosopicidade do material depois de seco. Extratos modificados contendo enzimas ou proteínas exógenas foram utilizados posteriormente para o preparo das dietas em ensaio biológico, e também avaliados quanto as suas características sensoriais.

4.2.4. Composição centesimal dos produtos obtidos em escala piloto.

- **Umidade e sólidos totais:** foram determinadas de acordo com os procedimentos descritos no AOAC - "Association of Official Analytical Chemists" - (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento e pesagem do resíduo sólido.

- **Resíduo mineral (cinza):** foi determinada de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico que resta depois de calcinar a matéria orgânica de uma amostra.

- **Lipídios Totais:** foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (10, 20, e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.

- **Fibra Alimentar:** foi determinada pelo método enzimático/gravimétrico que se baseia na gelatinização e hidrólise do amido e proteína das amostras pela ação das enzimas, seguido de precipitação da fração fibra solúvel pela adição de etanol (AOAC, 1998; PROSCKY et al., 1984).

- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990). A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 5,8.

- **Carboídrato:** determinado por diferença, subtraído de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

4.2.5. Determinação de Aminoácidos:

Para identificação e quantificação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas à vácuo e mantidas a 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi então evaporado e fez-se a recuperação da amostra em tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300), para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN et al., 1958). Solução padrão de aminoácidos Pierce foi utilizada como referência, para identificação e quantificação dos aminoácidos.

O aminoácido triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado segundo a metodologia de SPIES (1967), onde fez-se a hidrólise enzimática com a pronase a 40 °C por 24h, seguida de reação calorimétrica com dimetilaminobenzaldeído (DAB) e nitrito de sódio, na ausência de luz e posterior

leitura em espectrofotômetro a 590 nm e a concentração de triptofano foi determinada a partir de uma curva padrão.

4.2.6. Escore de aminoácidos essenciais (EAE)

O escore de aminoácidos essenciais (EAE) foi calculado relacionando a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais dos extratos protéicos em estudo, com os aminoácidos padrão de referência recomendado pela FAO/WHO (1990), de acordo com a metodologia de HENLEY & KUSTER (1994), pela seguinte expressão:

$$\text{EAE} = \frac{\text{mg de aminoácidos / g proteína teste}}{\text{mg de aminoácidos / g proteína padrão ou referência}}$$

Segundo SGARBIERI (1996), este quociente indicará: a) ordem dos aminoácidos limitantes na proteína em estudo, em relação à referência ou proteína padrão; b) o valor encontrado para o aminoácido mais limitante representa o EAE sendo uma estimativa do valor biológico da proteína em estudo em relação à referência ou proteína padrão.

4.2.7. Ensaio Biológico com ratos

- **Dietas e animais de experimentação**

O valor nutritivo da proteína foi determinado comparativamente à caseína comercial (CC), variando somente a fonte de proteína das dietas. Foram utilizados como fontes protéicas, o extrato de levedura (EX), extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE), e extrato de levedura com enzimas e proteína exógena (EXEP).

O ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaaios Biológicos do Centro de

Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas. Foram utilizados no experimento 40 ratos machos da linhagem Wistar livres de patógenos (SPF), recém-desmamados, com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram separados em 4 grupos. A cada grupo correspondeu um tratamento. A média do peso inicial dos animais não diferiu entre os grupos. A variação da média $\pm$ desvio padrão foi de $70,3 \pm 7,9$ a $71,5 \pm 7,4$ gramas.

Após a pesagem inicial, os animais foram mantidos em gaiolas individuais contendo dieta e água à vontade e receberam as dietas durante todo o período de experimentação (21 dias). As condições ambientais do biotério foram controladas a fim de manter a temperatura em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

As dietas foram preparadas contendo 10% de proteína segundo recomendações do "American Institute of Nutrition" AIN 93-G, para animais em crescimento (REEVES *et al.*, 1993), exceto pela concentração de proteína que foi reduzida de 17 para 10%. As dietas foram isoprotéicas e isocalóricas, só variando entre si quanto à fonte de proteínas. Para a dieta controle utilizou-se caseína comercial (M. Cassab).

As dietas utilizadas foram: 1) caseína comercial (CC), 2) extrato de levedura (EX); 3) extrato de levedura com adição de enzimas exógenas (EXE); 4) extrato de levedura com adição de enzimas e proteína exógenas (EXEP); 5) isenta de proteína, aprotéica (APRO). A composição básica das dietas é apresentada na Tabela 4. As misturas vitamínicas (Roche) e misturas minerais foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G e estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 4. Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G para ratos em crescimento.

COMPONENTES	g/Kg
Amido de milho	397,5
Fonte de Proteína (17%)	200,0
Amido dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	70,0
Fibra	50,0
Mistura mineral	35,0
Mistura vitamínica	10,0
L- cistina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
Tert-butil-hidroquinona	0,014

Fonte: Reeves et al., (1993).

Tabela 5. Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX

COMPONENTES	g/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCl	0,700
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,000
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D ₃) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (vitamina K)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: Reeves et al., 1993.

Tabela 6. Mistura mineral AIN G-MX

COMPONENTES	g/Kg
<i>Elementos Minerais Essenciais</i>	
Carbonato de cálcio anidro – 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico – 22,76% P; 28,73% K	196,00
Citrato de potássio, tri-K, monohidratado – 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio – 39,34% Na; 60,665 Cl	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio – 60,32% Mg	24,00
Citrato Férrico – 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco – 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês – 47,70% Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio – 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro – 41,79% Se	0,01025
Paramolibdato de amônio – 4 H ₂ O – 54,34% Mo	0,00795
<i>Elementos minerais potencialmente benéficos</i>	
Meta-silicato de sódio – 9 H ₂ O – 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico – 12 H ₂ O – 10,42% Cr	0,275
Cloreto de lítio – 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico – 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio – 42,24% F	0,0635
Carbonato de níquel – 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio – 43,55% V	0,0066
Sacarose	221,026

Fonte: Reeves et al., 1993.

- **Determinação do valor nutritivo da proteína**

O valor nutritivo da proteína foi determinado através dos seguintes índices nutricionais: NPR (quociente de eficiência líquida da proteína), PER (quociente de

eficiência protéica) e Dv (digestibilidade verdadeira), segundo metodologia descrita por SGARBIERI (1987).

Fez-se o controle do consumo de dieta para os cálculos de dosagem de nitrogênio e os valores de consumo e ganho de peso das 3 semanas foram utilizadas para o cálculo de PERop (PER operacional) e NPR. As fezes foram coletadas a partir da segunda semana do experimento, as quais foram utilizadas para o cálculo da digestibilidade da proteína.

O grupo em dieta aprotéica foi utilizado para determinação da perda de peso corporal durante todo o período do experimento, dado necessário para o cálculo do NPR. Serviu também para o cálculo de nitrogênio fecal endógeno (origem corporal) utilizado na transformação do índice de digestibilidade aparente da proteína em digestibilidade verdadeira.

Quociente de Eficiência Protéica (PER)

O PER mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida também em gramas, de um grupo de animais submetidos a dieta contendo a proteína em estudo conforme a expressão abaixo:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso(g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

A metodologia convencional recomenda ensaio de 4 semanas para o PER. No entanto, neste ensaio, que foi realizado com 3 semanas, o PER deve ser interpretado como operacional (PERop).

Quociente de eficiência líquida da proteína (NPR)

Este método se constitui apenas em uma modificação do PER e consiste em somar ao ganho de peso do grupo que recebe a dieta protéica a perda de peso de um grupo equivalente que recebeu dieta aprotéica. Esta relação permite calcular o NPR, conforme a seguinte expressão abaixo:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso GI (g)} + \text{perda de peso GII (g)}}{\text{proteína consumida GI (g)}}$$

Onde: GI= grupo em dieta protéica

 GII= grupo em dieta aprotéica

Digestibilidade Verdadeira (Dv)

A digestibilidade verdadeira é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou qualquer outro composto nitrogenado. A digestibilidade é determinada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta e o nitrogênio eliminado nas fezes, levando-se em consideração o nitrogênio proveniente do próprio animal que é excretado nas fezes juntamente com a proteína de origem alimentar não digerida. A Dv é calculada segundo a expressão:

$$\text{Dv} = \frac{\text{NI} - \text{NFa}}{\text{NI}} \times 100$$

Onde:

NFa= NF – NFe

Dv= digestibilidade verdadeira

NI= nitrogênio ingerido

NF= nitrogênio fecal de origem alimentar

NFe= nitrogênio fecal de origem endógena

Escore de aminoácido essencial corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS)

Este índice (descrito por Henley & Kuster, 1994) permitiu avaliar a qualidade da proteína em estudo através do produto do escore de aminoácidos essenciais (EAE) do extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteína exógenas (EXEP), e da caseína comercial (CC) pela digestibilidade verdadeira (Dv), através da seguinte fórmula:

$$\text{PDCAAS} = \text{EAE} \times \text{Dv}$$

onde:

Dv= digestibilidade verdadeira

EAE= escore de aminoácido essencial

4.2.8. Avaliação Sensorial

Uma avaliação sensorial foi realizada por uma equipe de 6 provadores treinados quanto à acuidade sensorial, do laboratório de análises físicas, sensoriais e estatística – LAFISE, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.

As amostras foram analisadas na forma de pó quanto à aparência e após o preparo de solução a 15% (p/v) em água em ebulição quanto à aparência, odor, sensação na boca e sabor. Os extratos de levedura submetidos a análise sensorial foram:

- * Extrato de levedura sem adição de enzimas e proteína exógenas (EX);
- * Extrato de levedura com enzimas exógenas e proteína exógenas (EXEP);
- * Extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE).

4.2.9. Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos à através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$) verificadas, pelo teste de Tukey, (Gomes 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Processo de autólise

Vários testes foram realizados, para alcançar um melhor resultado do teor de proteína no extrato de levedura. Apenas os testes que apresentaram melhores resultados estão sendo discutidos neste trabalho.

Os gráficos da Figura 5 (A) (B) apresentam as recuperações de sólidos totais e concentrações de proteínas de extratos obtidos em vários ensaios utilizando diferentes enzimas, em várias concentrações após 8 e 24 horas de incubação.

Observa-se para a concentração de proteínas no extrato que o tratamento com pancreatina na concentração de 8mg/g de substrato produziu o melhor resultado no tempo 24 horas, seguido da pancreatina 4mg/g de substrato e da papaína brauzyn 100 nas concentrações de 0,25 e 0,5% (p/p) enzima/substrato no mesmo período de incubação.

Nota-se que quanto à recuperação de sólidos totais, não houve um aumento significativo entre 8 e 24 horas, contudo verificou-se um aumento importante (de até 15%) na concentração de proteína do extrato conforme apresentado na Figura 5 (B).

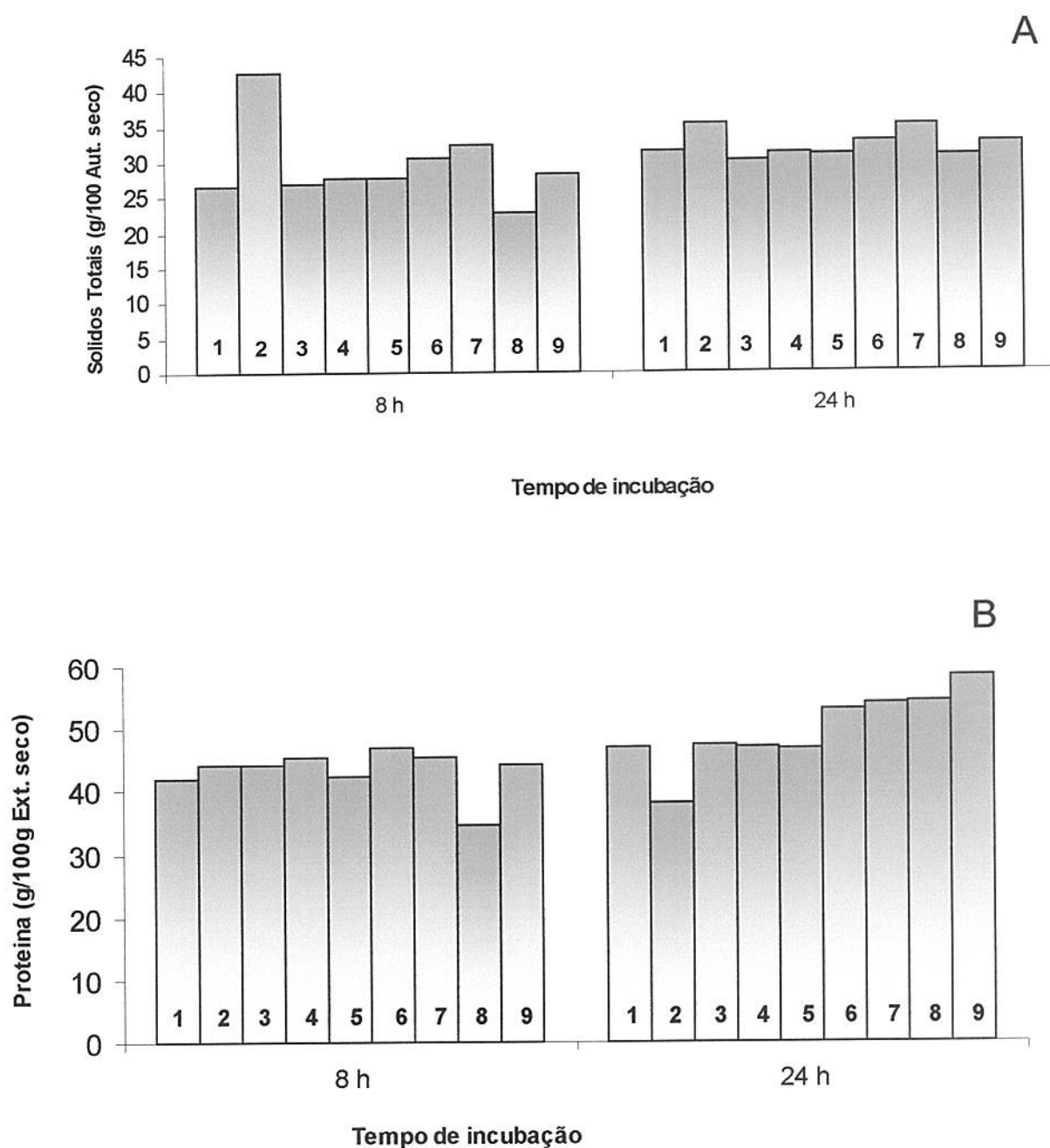


Figura 5 (A) (B). Influência da adição de enzimas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína no extrato seco (B) a partir de células BG de usina: 1. células BG-usina (sem adição); 2. papaína pa (0,25%); 3. papaína brauzyn pp (0,5%); 4. papaína brauzyn pp (1%); 5. papaína brauzyn pp (1,5%); 6. papaína brauzyn 100 (0,25%); 7. papaína brauzyn 100 (0,5%); 8. pancreatina (4mg/g substrato); 9. pancreatina (8mg/g substrato).

Os gráficos da figura 6 (A) (B) apresentam as concentrações de proteína e a recuperação de sólidos totais de extratos produzidos em 4 tipos distintos de ensaios de autólise feitos em triplicata, utilizando-se 2 tipos de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e também diferentes enzimas em suas concentrações após 0, 1, 8 e 24 horas de incubação.

Na Figura 6A observa-se que a recuperação de sólidos totais foi superior, em média, 11g/100g autolisado seco, para as células BG Lab. No tempo de 8h houve um aumento de 25% e 32%, respectivamente para os tratamentos 3 e 4. Em nenhum dos estágios da autólise foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos enzimáticos 3 e 4. Para as células BG usina (tratamentos 1 e 2) também não houve diferença estatística entre os tratamentos enzimáticos. Independente dos tratamentos enzimáticos houve um aumento na recuperação de sólidos com 8 e 24 horas de autólise.

Com relação à concentração de proteína (Figura 6B) no extrato, as diferenças entre os dois tipos de células (BG usina e BG lab) tendem a desaparecer após 8 horas de autólise. A combinação das enzimas glucanex (3g/hL) mais pancreatina (8mg/g substrato) forneceu a mais elevada concentração de proteína no extrato, em torno de 60% de proteína.

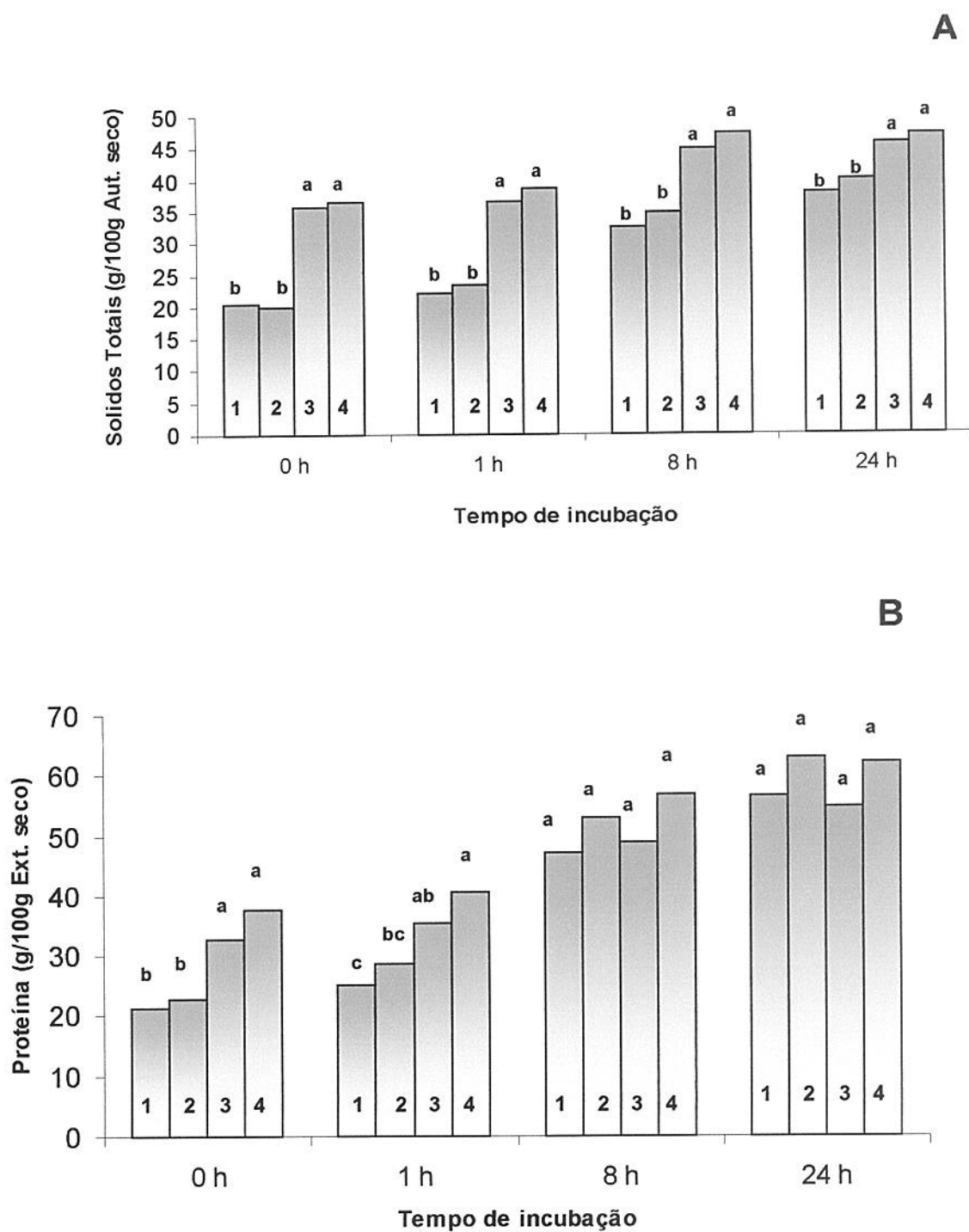


Figura 6 (A) (B). Influência da adição de enzimas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células BG de usina e cultivo (BG-lab): 1. células BG-usina + glucanex (3g/hl); 2. células BG-usina + glucanex (3g/hl) + pancreatina (8mg/g substrato) 3. células BG-lab glucanex (3g/hL); 4. células BG-lab + glucanex (3g/hl) + pancreatina (8mg/g substrato). ^{a, b, c} letras superescritas iguais indicam igualdade estatística ($p > 0,05$).

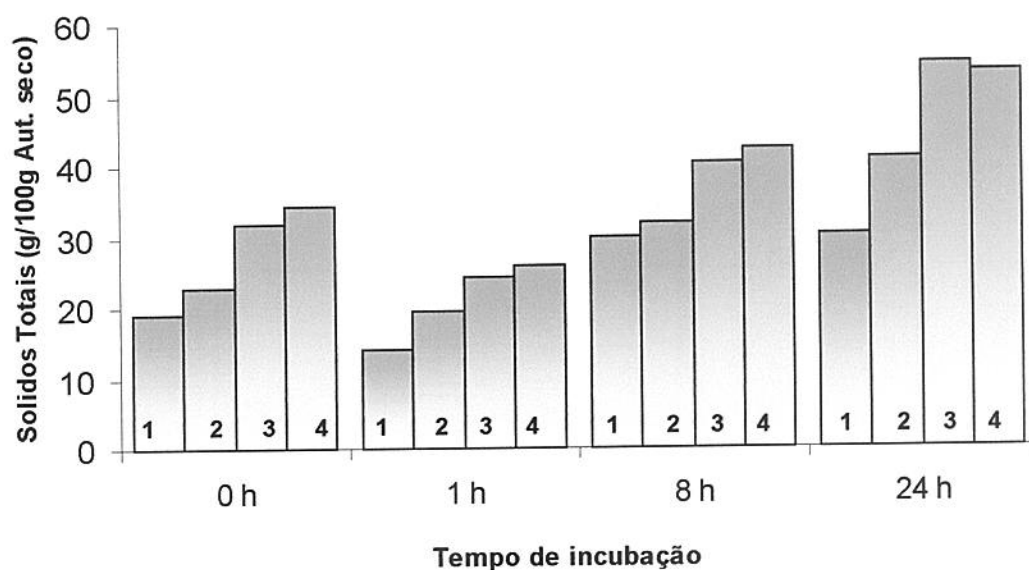
Os gráficos da Figura 7 (A) (B) apresentam as concentrações de proteína e a recuperação de sólidos totais de extratos produzidos em 4 tipos distintos de autólise feitos em duplicata, utilizando células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes procedências (B.G usina e B.G lab) e também com diferentes enzimas e proteínas exógenas em suas concentrações pré-determinadas, com tempo de incubação 0, 1, 8, e 24 horas.

Na Figura 7(A) (B) novamente observa-se uma superioridade das células BG Lab. Tanto no que tange à recuperação de sólidos (Figura7A) como em relação à concentração final de proteína no extrato seco (Figura7B).

O tempo de autólise se revelou mais importante em relação à recuperação de sólidos (Figura 7A) do que em relação à concentração de proteína, que se alterou muito pouco depois de 1h de autólise.

A combinação enzimática (glucanex 3g/hL + papaína brauzyn 100-0,5%) forneceu o melhor resultado com uma concentração de proteína (Figura 7B) no extrato ao redor de 55% com 1h de autólise, alcançando 60% com 24h.

A



B

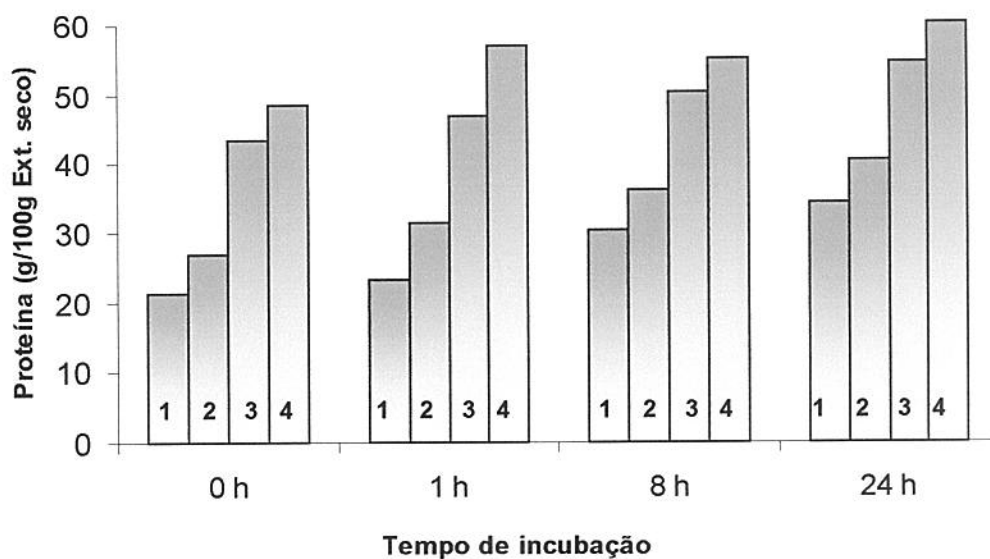


Figura 7 (A) (B). Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células de BG usina e BG de cultivo (BG-lab): 1. células BG-usina + 10% de coágulo de caseína (COC); 2. células BG-usina + 10% COC + glucanex (3g/hl) + papaína brauzyn 100 (0,5%); 3. células BG-lab + 10% COC; 4. células BG Lab. + 10% CoC. + glucanex (3g/hl) + papaína brauzyn 100 (0,5%);

Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos de autólise para células BG usina em relação a recuperação de sólidos é mostrado no gráfico da Figura 8(A) para diferentes tratamentos enzimáticos e combinações de proteínas exógenas. Observa-se que a melhor recuperação de sólidos totais foi conseguida através da autólise com células BG usina com adição de papaína brauzyn 100 e protamex a 1,4%, como também pela adição de soro de leite desidratado e coágulo de caseína a 10% no período de incubação de 8 horas. A seguir pelo tratamento de células de usina com adição de papaína brauzyn 100 e protamex a 1,4%, mas somente com a adição de coágulo de caseína a 10% no período também de 8 horas de incubação. Em todos os tratamentos empregados houve uma melhora na recuperação de sólidos totais no tempo 8 horas de incubação.

Quanto à concentração de proteína no extrato seco, mostrada na Figura 8(B), observa-se que o melhor resultado foi obtido no tratamento com adição de papaína brauzyn 100 e protamex a 1,4% como também pela adição de soro de leite desidratado e coágulo de caseína a 10% (tratamentos 4 e 5), no tempo de 8 horas de incubação. O segundo melhor tratamento foi o de células de usina com adição das enzimas papaína brauzyn 100 e protamex a 1% no período de 24 horas de incubação.

Com a adição das enzimas e proteínas exógenas houve uma melhor recuperação de proteína no extrato quando comparado ao tratamento de células de usina sem a adição de enzimas e proteínas exógenas. Comparado com o tratamento 1, o tratamento 5 mostrou um aumento na recuperação de sólidos de 67% e da concentração de proteína da ordem de 35%, Figura 8 (A) (B).

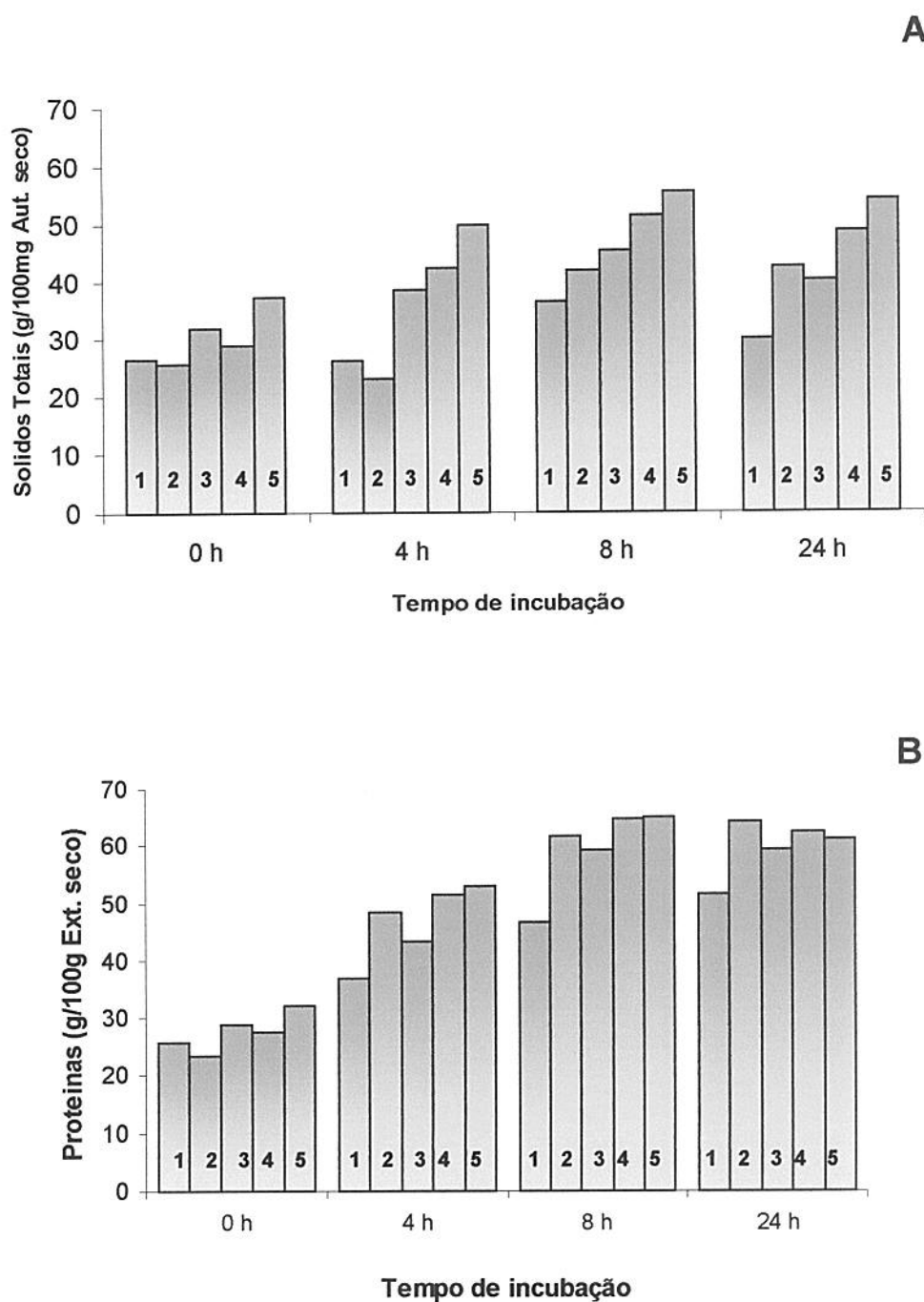


Figura 8 (A) (B). Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) nos extratos de células de BG usina: **1.** células BG-usina (sem adição); **2.** células BG-usina + papaína brauzyn 100 (1%) + protamex (1%); **3.** células BG-usina + papaína brauzyn 100 (1,2%) + protamex (1,2%) + soro de leite desidratado (10%); **4.** células BG-usina + papaína brauzyn 100 (1,4%) + protamex (1,4%) + coágulo de caseína (10%); **5.** células BG-usina + papaína brauzyn 100 (1,4%) + protamex (1,4%) + soro de leite desidratado (10%) + coágulo de caseína (10%).

Os gráficos mostrados na Figura 9 (A) (B) apresentam as concentrações de proteínas e a recuperação de sólidos totais de extratos produzidos em 5 tipos distintos de ensaios de autólise feitos em triplicata. Os resultados mostram que os vários tratamentos com enzimas e/ou proteínas exógenas influíram relativamente pouco nos resultados de recuperação de sólidos e concentração de proteína, não mostrando diferenças estatísticas entre os tratamentos.

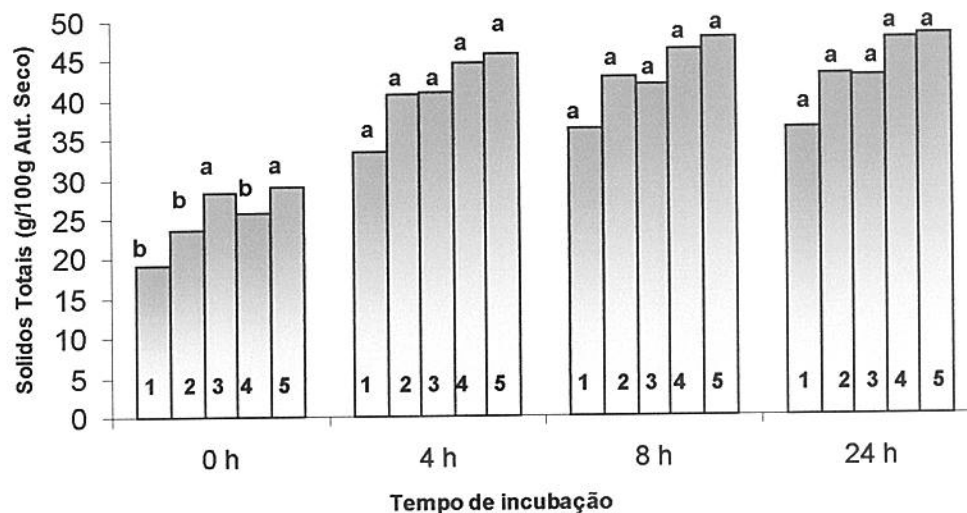
Para as células BG usina, sem adições, os incrementos após 4, 8 e 24h de autólise foram os seguintes: recuperação de sólidos com aumento de 28% (4h) e de 35% (8 e 24h); concentração de proteína teve aumento, em relação ao tratamento sem adição de 40% (4h), de 20% (8h) e de 34% (24h). O aumento na recuperação de sólidos totais após 24 horas em relação ao tempo zero (0h) foi de 161% e para concentração de proteína foi de 159%.

Em estudos realizados por CHAE et al (2001), utilizou-se a combinação das enzimas flavourzyme e protamex nas concentrações de 2 e 0,6% respectivamente, onde se observou a maior recuperação de sólidos totais e proteína de 52,5% e 53,6% respectivamente, no tempo de 12 horas de incubação.

KNORR et al. (1979), utilizaram duas enzimas zimolase/lisozima, para a extração de proteínas de levedura e conseguiram a redução do tempo de autólise de 35 horas para 1 hora. SUPHANTHARIKA et al. (1999) adicionaram 0,25% de papaína (p/p) em suas suspensões de células de levedura com proteína de arroz e de grão de soja obtendo com o tempo de 24 horas de incubação aproximadamente a recuperação de 60% de proteína.

A utilização de enzimas e proteínas exógenas em todos os experimentos descritos (I ao V) mostrou que há um aumento relativo tanto na recuperação de sólidos totais quanto na concentração de proteína no extrato de levedura e que tais valores são superiores aos valores encontrados pelos autores citados acima.

A



B

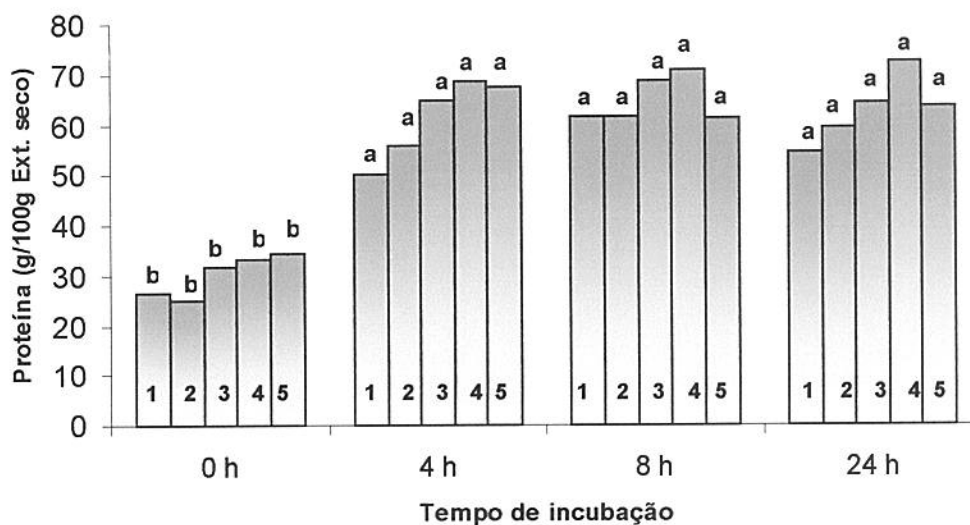


Figura 9 (A) (B). Influência da adição de enzimas e de proteínas exógenas na recuperação de sólidos totais (A) e na concentração de proteína (B) em extratos de células de BG usina: 1. células BG-usina (sem adição); 2. células BG-usina + flavourzyme (2%) + alcalase (0,6%); 3. células BG-usina + flavourzyme (2%) + alcalase (0,6%) + soro de leite desidratado (10%); 4. células BG-usina + flavourzyme (2%) + alcalase (0,6%) + coágulo de caseína (10%); 5. células BG-usina + flavourzyme (2%) + alcalase (0,6%) + soro de leite desidratado (10%) + coágulo de caseína (10%). ^{a, b} letras superescritas iguais indicam igualdade estatística ($p > 0,05$).

5.2. Composição centesimal da caseína comercial, do extrato convencional e de dois extratos modificados.

Os extratos selecionados foram analisados também quanto à composição centesimal, ao perfil de aminoácidos, avaliação nutricional através de ensaio biológico com ratos e posteriormente avaliação sensorial.

A Tabela 7 expressa os valores da composição centesimal das formulações caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato de levedura com adição de enzimas exógenas (EXE), extrato de levedura com adição de enzimas e proteína exógena (EXEP). Observou-se que a proteína é o maior constituinte de todas as formulações estudadas seguida pelo carboidrato. Nota-se que a caseína comercial apresenta a maior concentração de proteína em relação às formulações com extrato de levedura. Quanto aos valores de carboidrato percebe-se que os extratos apresentam um índice superior à caseína comercial. Isto deve-se ao fato de se ter adicionado ao extrato de levedura antes do processo de secagem a maltodextrina (25%). Com relação ao conteúdo de cinza para as formulações que contém levedura ocorreu um aumento substancial devido à introdução de NaCl no processo de autólise.

Tabela 7. Composição centesimal caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXP).

Componentes (% base seca)	CC	EX	EXE	EXEP
<i>Proteínas</i>	91,98	48,6	44,14	47,42
<i>Cinza</i>	2,41	11,7	13,70	11,72
<i>Lipídeos</i>	2,26	0,40	0,39	0,60
<i>Fibras</i>	-	3,3	3,52	0,53
<i>Carboidrato*</i>	3,35	36,0	38,25	39,73

*Carboidrato = 100 – (proteína + lipídeos totais + cinzas)

5.3. Composição de Aminoácidos Essenciais

Na Tabela 8 encontram-se os valores de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) dos diferentes extratos: extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteína exógenas (EXEP) e caseína comercial (CC), comparados com o perfil de aminoácidos do padrão recomendado pela FAO/WHO/UNU (1990).

Observa-se que, para o EXE a metionina + cistina são os aminoácidos limitantes e apresentaram-se abaixo do recomendado pela FAO/WHO/UNU, resultando em um escore igual a 0,76. Isto pode estar relacionado a alta reatividade dos aminoácidos sulfurados e possíveis degradações de acordo com o tipo e condições de processamento empregado.

A biomassa de levedura possui um valor significativo de proteína em torno de 50% e também um bom perfil de aminoácidos, com exceção dos valores de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e de triptofano que devem ser suplementados para *Saccharomyces cerevisiae* e *Torula* (OTERO et al., 1999; SARWAR et al., 1985; MARIATH & ZUCAS, 1983; SMITH & PALMER, 1976). Os valores de triptofano encontrados nesta pesquisa podem ser considerados adequados para o EX e EXEP, tendo sido marginalmente deficiente para a preparação EXE.

Com relação ao EX, EXEP e a CC os aminoácidos essenciais encontrados estão acima dos valores recomendados pela FAO/WHO/UNU. De acordo com a FAO/WHO (1985), uma proteína é considerada de boa qualidade nutricional quando em sua composição apresentar quantidade adequada e equilibrada de aminoácidos essenciais em relação ao que se considera como padrão. E de acordo com CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI (2000), a proteína de levedura apresenta um bom perfil e balanço de aminoácidos em relação ao padrão FAO/WHO/UNU.

Tabela 8. Valores obtidos para os aminoácidos essenciais dos produtos: caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP), tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO (1990).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	Padrão				
	FAO/WHO	CC	EX	EXE	EXEP
Treonina	3,4	5,29	5,19	4,91	5,31
Metionina + Cistina	2,5	4,03	3,56	1,89	4,0
Valina	3,5	7,55	6,76	6,00	6,70
Leucina	6,6	11,99	8,07	7,15	8,64
Isoleucina	2,8	5,56	5,69	4,85	5,31
Fenilalanina + Tirosina	6,3	13,51	6,91	7,46	8,41
Lisina	5,8	9,06	8,58	7,71	8,49
Histidina	1,9	3,51	3,01	2,42	2,78
Triptofano	1,1	1,17	1,31	1,00	1,10
Escore Químico – EAE	-	1,00	1,00	0,76	1,00
PDCAAS	-	89,79	78,65	59,72	86,01

5.4. Avaliação Nutricional

A avaliação nutricional do extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP) foram feitos com base no perfil de aminoácidos, escore químico de aminoácidos essenciais, tendo por padrão de referência o perfil recomendado pela FAO/WHO (1990). No ensaio com animais foram determinados a digestibilidade verdadeira (Dv), quociente de eficiência da proteína (PER) e quociente de eficiência líquida da proteína (NPR), utilizando-se como referência a caseína comercial (M. Cassab Ltda).

Determinou-se uma perda de peso médio em torno de 24% para o grupo da dieta aprotéica. Os grupos de animais que receberam dietas protéicas,

alimentados com diferentes combinações de extratos de levedura, tiveram um crescimento médio de 75% após 21 dias de experimento.

Na Figura 10 são apresentadas as curvas de crescimento médio obtidos para ratos Wistar recém desmamados, mantidos em alimentação por 21 dias. Nota-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as dietas aplicadas aos grupos com CC e EXEP. Isto se deve ao fato da dieta EXEP conter 10% de coágulo de caseína, complementando o perfil de aminoácidos, do extrato de levedura. Com relação aos grupos EXE e EX apresentaram valores estatisticamente ($p > 0,05$) iguais ao ganho de peso, onde os pontos da reta estão sobrepostos.

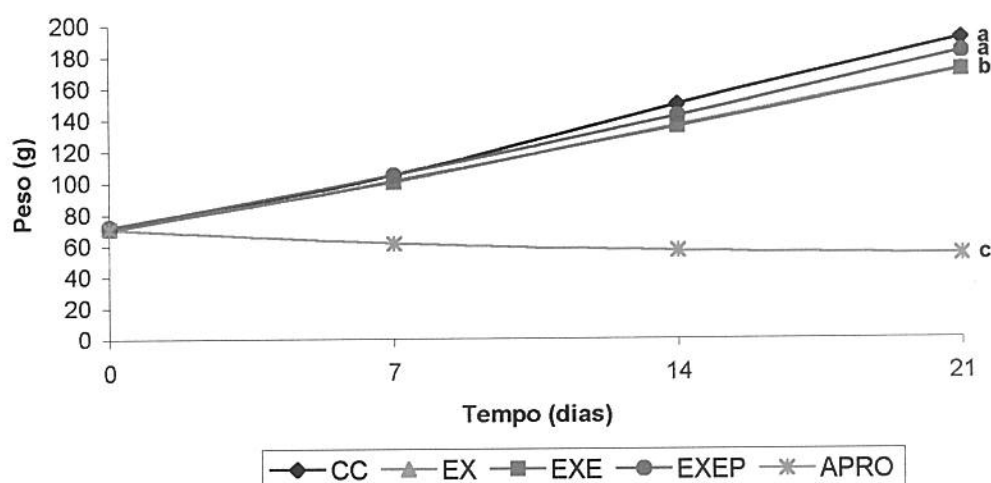


Figura 10. Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 10% de proteína proveniente de caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP) e dieta isenta de proteína (APRO).

Os dados referentes à ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso, PERop e NPR avaliados durante o ensaio biológico encontram-se na Tabela 9.

Os resultados da Tabela 9 indicam que a ingestão de dieta no tratamento EXE foi significativamente inferior aos demais tratamentos. Quanto à ingestão de proteína, não houve diferenças significativas entre o EX e o EXEP, no

entanto, verificou-se consumo menor para os grupos em CC e EXE. Houve diferenças significativas entre a ingestão de dieta, e ganho de peso entre os grupos de animais mantidos em dietas com diferentes preparações de extratos de levedura e caseína comercial. O ganho de peso foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) para CC e para EXEP, ambos superiores ao EX e EXE.

Tabela 9. Valores médios obtidos da ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso, quociente de eficiência protéica (PERop) e coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR), para os tratamentos de caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP).

Fonte Protéica	CC	EX	EXE	EXEP
<i>Ingestão Dieta (g)</i>	335,14 ± 32,1 ^a	336,11 ± 21,1 ^a	290,13 ± 26,9 ^b	340,68 ± 26,9 ^a
<i>Ingestão Proteína (g)</i>	31,50 ± 3,0 ^b	33,31 ± 2,1 ^a	29,56 ± 2,7 ^c	33,76 ± 2,7 ^a
<i>Ganho de Peso (g)</i>	118,47 ± 10,8 ^a	98,11 ± 8,7 ^b	98,90 ± 14,2 ^b	109,17 ± 9,0 ^{ab}
<i>PER operacional</i>	3,77 ± 0,3 ^a	2,94 ± 0,1 ^c	3,33 ± 0,3 ^b	3,24 ± 0,1 ^b
<i>NPR</i>	4,32 ± 0,3 ^a	3,46 ± 0,1 ^c	3,92 ± 0,2 ^b	3,75 ± 0,2 ^b

Valores médios obtidos com 8 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (linha) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação aos valores de PERop e NPR as dietas com EXE e EXEP não diferiram estatisticamente. O menor valor destes quocientes foi determinado para o EX, enquanto o maior foi para a caseína comercial, sendo este significativamente superior às demais dietas. Segundo FRIEDMAN (1996) a proteína com valor de PER acima de 2,0 é considerada de bom valor nutritivo. Em seus estudos VILELA et al., (2000), encontraram valores para PER de 3,10 e de NPR igual a 3.66, para dieta contendo 10% de extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em ensaio biológico com ratos machos da linhagem Wistar, ressaltando, portanto que a proteína de levedura pode ser considerada de bom valor nutricional. O valor protéico determinado através de ensaios biológicos (PER e NPUa) representou 70 – 80% dos valores para caseína utilizada como

referência nos estudos de (CABALLERO-CÓRDOBA et al., 1997).

Segundo SGARBIERI (1996), existem alguns fatores que podem influenciar os valores de PER, dentre eles, a concentração lipídica da dieta e a concentração protéica. Elevadas concentrações de proteína acrescentada na dieta (valores acima de 12 a 15%) elevam os gastos energéticos de origem protéica, diminuindo a eficiência da proteína para a síntese de novas proteínas corpóreas. A concentração de proteína ideal para análise do índice de PER está no intervalo de 9 a 12% para a proteína de alto valor nutritivo.

A digestibilidade verdadeira do CC não apresentou diferenças significativas quando comparado com o EXEP, porém estes foram superiores ao EX e ao EXE, que não deferiam estatisticamente entre si ($p > 0,05$). A alta digestibilidade da caseína refletiu-se na melhoria desse índice no EXEP. Os resultados encontrados se assemelham aos estudos descritos por KINSELA & SHETTY (1978), onde a proteína isolada teve a sua digestibilidade bastante melhorada, superior à da biomassa de levedura. Em seus estudos ALVIM (2001), obteve valores de digestibilidade verdadeira de 85,2 para farinhas extrusadas enriquecidas com extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os valores de nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e digestibilidade verdadeira para CC, para o extrato comercial e para os extratos modificados são apresentados na Tabela 10.

Os índices mais baixos de digestibilidade nos tratamentos EX e EXE correlacionam com os maiores índices de excreção de nitrogênio nas fezes dos ratos nesses tratamentos.

Tabela 10. Valores obtidos para digestibilidade verdadeira, nitrogênio ingerido e nitrogênio fecal para a caseína comercial (CC), extrato de levedura (EX), extrato com enzimas exógenas (EXE), extrato com enzimas e proteínas exógenas (EXEP).

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	Dv
CC	4,94 ± 0,47 ^b	1,67 ± 0,20 ^c	89,79 ± 4,45 ^a
EX	5,74 ± 0,36 ^a	2,39 ± 0,26 ^a	78,65 ± 5,01 ^b
EXE	5,10 ± 0,47 ^b	2,26 ± 0,28 ^{ab}	78,58 ± 4,78 ^b
EXEP	5,82 ± 0,46 ^a	1,98 ± 0,18 ^{bc}	86,01 ± 3,32 ^a

Valores médios obtidos com 8 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4. Aspectos sensoriais

Com o processo de autólise modificado procurou-se melhorar as características de sabor (gosto e aroma) do extrato protéico. A Figura 11 mostra o aspecto visual dos extratos obtidos.

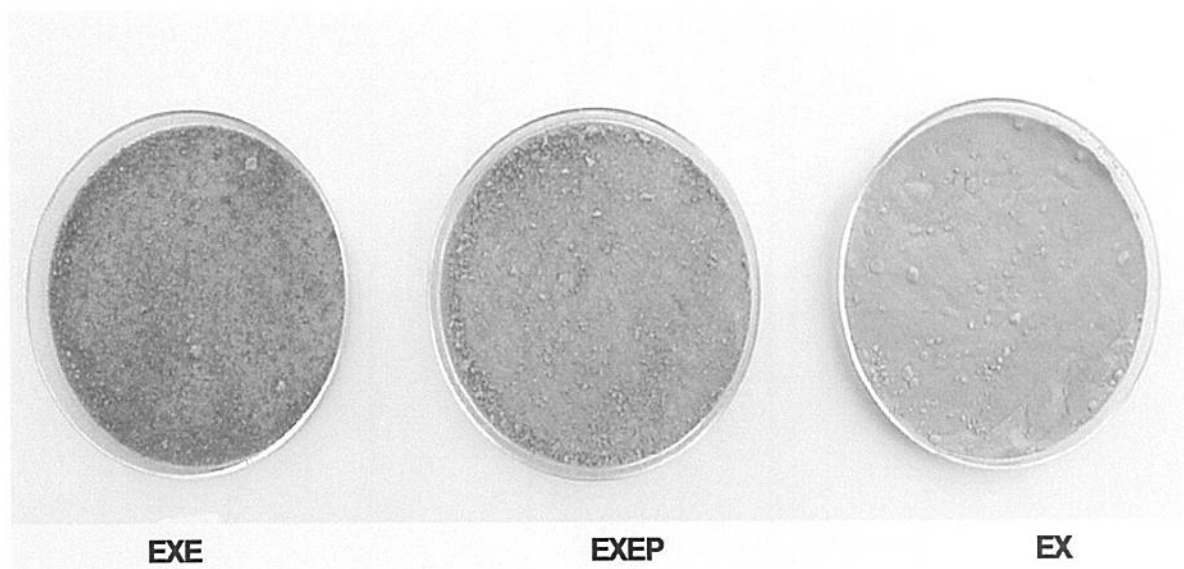


Figura 11. Ilustra o pó de extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE), extrato de levedura com enzimas exógenas e coágulo de caseína (EXEP) e extrato de levedura (EX).

Na Tabela 11 pode-se observar as diferentes características sensoriais dos extratos de levedura estudados. O sabor do EXEP apresentou-se menos salgado que o EXE, devido ao fato da incorporação do coágulo de caseína, que segundo VIOTTO (1997) além de aumentar o valor protéico, a caseína proporciona características favoráveis de sabor ao produto final. Já os derivados de levedura refletem sabores e aromas que enaltecem as características sensoriais dos alimentos (BELEM & LEE, 1998; CAMERÓN et al., 1988).

O sabor “umami” que imita o de caldo de carne e glutamato monossódico esteve presente nas três preparações. A avaliação sensorial (Tabela 11) sugere não ter havido modificações apreciáveis nos atributos aparência, odor, sensação na boca e sabor entre o EX e os extratos adicionados de enzimas e proteína exógena (EXE e EXEP).

Tabela 11. Características sensoriais do extrato de levedura (EX), extrato de levedura com enzimas exógenas (EXE) e extrato de levedura com enzimas exógenas e coágulo de caseína (EXEP).

<i>Característica Sensorial</i>	EX	EXE	EXEP
<i>Aparência (pó)</i>	pó de granulometria heterogênea (mistura de pó fino e grosso) de pó de granulometria heterogênea pó fino com algumas partículas grossas, de coloração castanho esverdeado. coloração castanho esverdeado. esverdeado e com presença de pequenos cristais.		
<i>Aparência (após preparo de solução)</i>	líquido levemente turvo de líquido levemente turvo de líquido levemente turvo de coloração coloração caramelo coloração castanho esverdeado. castanho esverdeado.		
<i>Odor</i>	Aroma característico de extrato Aroma característico de extrato Aroma característico de extrato protéico, fermentado e alcoólico. protéico, fermentado e alcoólico.		
<i>Sensação na boca</i>	Aquoso	Aquoso	Aquoso
<i>Sabor</i>	Salgado e levemente adocicado. salgado e levemente adocicado. pouco salgado e levemente Alcoólico, lembrando a umami e Alcoólico, lembrando a umami e adocicado. Alcoólico, lembrando a a resíduo da destilação de sakê. a resíduo da destilação de sakê. umami e a resíduo da destilação de Não é amargo ou adstringente. Não é amargo ou adstringente. sakê. Não é amargo ou adstringente.		

6. CONCLUSÕES

A modificação do processo de autólise através de adição de enzimas e proteínas exógenas proporcionou aumento importante na recuperação de sólidos do autolisado da ordem de 34% após 8 e 24 horas de autólise. O aumento de sólidos totais em relação ao tempo zero (0h) foi de 160% para 8h e 24h de autólise.

As concentrações de proteína no extrato secas variaram na faixa de 50 a 70%. Em média, os ganhos tanto para recuperação de sólidos como para concentração final de proteínas foram pequenos no período de 8 para 24h de autólise. Portanto, a maior vantagem na introdução de enzimas e proteínas exógenas ao meio de autólise foi a possibilidade de reduzir a 1/3 o tempo de autólise.

O valor nutricional do extrato apresentou melhora com a introdução de enzimas e proteínas exógenas para os índices: ganho de peso (tratamento EXEP). PER (operacional) para os tratamentos EXE e EXEP. Quociente de eficiência protéica (NPR) para EXE e EXEP; Digestibilidade verdadeira (Dv) para o tratamento EXEP. Todos os índices de valor protéico foram inferiores nos extratos de levedura, comparados com os da caseína comercial.

A avaliação sensorial dos extratos nas formas desidratada e em solução (10% p/v) não sugeriu ter havido alterações nos atributos aparência, odor, sensação na boca e sabor, dos extratos modificados (com adição de enzimas e proteína exógenas) em relação ao extrato original sem adição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI, A. A.; YAMAMOTO, S.; KULKARNI, A. Nucleic acids and/or their components: a possible role in immune function. **Journal of Nutritional Science and Vitamology**, Tokyo, v. 41, n.1, p. 1-16, 1995.

ALVIM, I.D. **Efeito da extrusão termoplástica sobre propriedades funcionais e nutricionais de farinhas à base de milho, caseína e derivados de levedura**. Dissertação (mestrado) apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 104p, 2001.

AMES, J.M. MAC LEOD, G. Volatile components of a yeast extract composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.1, p.125-135, 1985.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, London, v. 64, n. 5, p. 175-183, 1998.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) – **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15th. Ed., Washington, D.C., 1990, 1141P.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) – **Official methods of analysis**. 16th. Ed., Arlington, 1998, v.1-2.

BAIRD, J.K.; PETTIT, D.J.; Biogums used in foods and made by fermentation. In: Goldberg, I.; Williams, E. **Biotechnology and food ingredients**, New York, Van Nostrand Reinhold, 253, 1991.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and identification**, Cambridge: University Press, p. 811, 1983.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and identification**, Cambridge: University Press, p. 1002, 1990.

BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Montreal, v. 25, n. 2, p. 96-102, 1999.

BARTNICKI-GARCIA, Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, Pablo Alto, v. 22, p. 87-108, 1968.

BELÉM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.46, n. 1, p. 31-37, 1959.

BRESSANI, R. The use of yeast in human foods. In: MATELES, R.I.; TANNENBAUM, S.R. **Single cell protein**, Massachusetts, 1968, 480p.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, 80, p. 341-351, 2000.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 102-106, 1997.

CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.

CARVER, J.D.; PIMENTEL, B.; COX, W.I.; BARNES, L.A. Dietary nucleotides effects upon immune function in infants. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 88, p.359-363, 1991.

CHAE, H. J.; JOO, H.; IN, M. J. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, London, n. 76, p.253-258, 2001.

CHAMPAGNE, C. P.; BARRETE, J.; GOULET, J. Interaction between pH, 22 autolysis promoters and bacterial contamination on the production of yeast extracts. **Food Research International**, Ottawa, v. 32, p. 575-583, 1999.

CHERNYSHEVA, N.M.; KAPLAN, V.P.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; BABAYAN, T.L.; LEPEKHINA, L.A. The stimulatory granulocyte-macrophage graftment and the radioprotective effect of yeast manna. **Radiobiology**, n.31, p.381-386, 1991.

CONWAY, J.; GAUDREAU, H.; CHAMPAGNE, C. P. The effect of the addition of proteases and glucanases during yeast autolysis on the production and properties of yeast extracts. **Canadian Journal Microbial**, Canada, n.47, p.18-24, 2001.

DZIEZAK, J. D. (Ed.) Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, p.103-121 e 122-125, 1987.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization**. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FAO/WHO/UNU. Report of the Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report: Energy and protein requirements. Series nº 724, FAO/WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.1, p.6-29, 1996.

GÁLVEZ, A.; RAMÍREZ, M. J.; GARCIA GARIBAY, M. Chemical Composition of a mixture of single-cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, Caracas. v.40, n.2, p.252-282, 1990.

GANDER, J. E. Fungal cell wall glycoproteins and pepito-polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Pablo Alto, v.28, p.103-109. 1974.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Techonolgy**, Chicago, v. 49, n. 10, p. 50-60, 1994.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p, 1982.

HALÁSZ, A .; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press Inc. 1991. 312 p.

HELBERT, J. R. Beer. In: PRESCOTT & DUNN'S. **Industrial Microbiology**, New York, AVI, 4a ed. , 1982, p. 403-467.

HENDENSKOG, G & MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.15, n.1, p.129-142. 1973.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino scoring. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p. 74-77, 1994.

HOUGH, J. S. **Biotecnologia de la Cerveza de la malta**, Zaragoza, Acribia. 1990, 194 p.

HOUGH, J. S.; MADDOX, I. S. Yeast Autolysis. **Process Biochemistry**, p.5052. 1970.

HUNTER, J. B.; ANSEJO, J. A. A Structure and Mechanistic Model of Kinetics of Enzymatic Lyses and disruption of Yeast Cells. **Biotech. and Bioengineering**, New York, v. 31, p.929-943, 1998.

ICIDCA. **Manual de los derivados de la canã de azúcar**, Habana: Geplaceapnud, 1988, 252p.

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.Ç NAKAGIMA, I. Growth promoting effects of N-acetyluramine acid-containing substances on bifidobacteria. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v.58, p.1720-1722, 1994.

IGUTI, A. M. A levedura como fonte de ácidos nucléicos e aplicação em alimentos. In: **Workshop - Produção de Biomassa de Levedura: Utilização em Alimentação Humana e Animal**, Campinas, agosto, p. 32-40, 1996.

JIMENEZ, R.; BADIA, M.; DIAZ, C.; GARCIA, I. Quick procedure for the production of yeast autolysate for a wide range of uses. **Alimentaria**, v.30, n.245, p.87-89, 1998.

JYONOUGH, H.; HILL, R.J.; GOD, R.A. RNA! Nucleotide enhances antibody production "in vitro" and is moderately mitogenic to murine spleen lymphocytes.

Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 200, p.101-108, 1992.

KINSELLA, J.E.; SHETTY, H.J.. Yeast protein recovery, nutritional and functional properties. **Advanced Experimental Medical**, New York, v.107: p.797-825, 1978.

KNORR, D.; SHETTY, K. J.; HOOD, L. F.; KINSELLA, J. E. An enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p.1362-1365, 1979.

KOLLAR, R.; STURDIK, E.; FARKAS, V. Induction and acceleration of yeast lyses by addition of fresh yeast autolysate. **Biotechnology**, New York, v.8, p.543-546, 1992.

KULKARNI, A.D.; RUDOLPH, F.; VANBUREN, C.T. The role of dietary source of nucleotides in immune function: A review. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, p. 1442S-1446S, 1994.

KURTZMAN, C. P.; PHAFF, H. J. Molecular taxonomy. In: KREGER-VAN RIJ. , N. J. W. **The Yeast**, New York, v.1, p.64-94, 1987.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomy study**, Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.

LAW, B. Enzymes in the manufacture of dairy products. IN: WHITEHURST, R.J.; LAW, B. **Enzymes in food technology**, Sheffield, 2002, p.90-143.

LEE, H. O. **Fundamentals of food Biotechnology**. Ed. V. C. H. Publishers Inc. New York, 1996, 431 p.

LLOYD, K. O. Isolation, characterization, and partial structure of peptidio

galactomannanas from yeasts form of *Cladosporium Worneckii*. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.9, p.3446-3453, 1970.

LODDER, J. **The yeasts: A Taxonomic study**, London: North Holand, p. 1385, 1970.

MARIATH, J.G.R.; ZUCAS, S. M. Valor nutricional da proteína isolada do resíduo de cerveja. **Revista da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos – ABIA**, n. 65, p. 24-36, 1983.

NAGODAWITHANA, T. Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.11, p.140-144, 1992.

NELSON, G.; BISHOP, J. Yeast delivery system. **Food Ingredients and Analysis International**, Luxbridge, v.20, n.5, p.13-14, 1998.

NÓBREGA, F. J. **Desnutrição intrauterina e pós-natal**, 2^a ed. São Paulo: Paramed, p.567, 1985.

NUNES, M. C.; AYUDARTE, M. V.; MORALES, D.; SUAREZ, M. D.; GIL, A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with chronic diarrhea. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n.2, p.598-604, 1990.

OSUMI, M. The ultra structure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, London, v. 29, n. 213, p. 207-233, 1998.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDECIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETAIVCOURT D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, New York, v.67 , n.1, p.67-71, 1996.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDECIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETAIVCOURT D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, New York, v. 67 , n. 1, p. 67-71, 1996.

OTERO, M. A.; WAGNER, J. R.; VASALLO, M. C.; GARCIA, L.; AÑÓN, M. C. Thermal behavior and hydration properties of yeast proteins from *Saccharomyces cerevisiae* and *kluveromyces fragilis*. **Food Chemistry**, Washington, v.69, n.2, p.161, 2000.

OTERO, M.A.; VASALLO, M.C.; VERDIEIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, Great Britain, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1999.

PACHECO, M. T B. Levedura como fonte de proteína: extração, isolamento, propriedades nutritivas e funcionais. In: WORKSHOP – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, Campinas, agosto. p.5-15, 1996.

PACHECO, M. T. B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of biomass and protein concentrates. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokio, v.43, n.6, p.601-612, 1997.

PACHECO, M. T. B.; CARRARO, F.; SGARBIERI V. C. Study of calcium binding to different preparations of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein by using an ion selective electrode. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, n.2, p.249-252, 1999.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V.C. Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63,

n.2, p.238-243, 1998.

PELCZAR, M. J.; Fungos: as leveduras. In: PELCZAR, M. J. **Microbiologia**, McGraw-Hill do Brasil, cap.16, p. 345-347, 1980.

PHAFF, J. H. Isolation of yeast from natural sources. In: LABEDA, D. P Isolation of biotechnological organisms from nature, New York: McGraw-Hill, p.53 70, 1990.

PIZZINI, R.P.; KUMAR, S.; KULKARNI, A.D.; RUDOLPH, F.B.; VAN BUREN, C.T. Dietary nucleotides reverse malnutrition on starvation-induced immuno-supresion. Archives of Surgery, p.125, p.86-90, 1990.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; FURDA, I.; DEVRIES, J.W.; SCWEIZER, T.F.; HARLAND, B.F. Determination of total dietary fiber in food products and total diets: interlaboratorial study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.64, n.6, p.1044-1052, 1984.

REED, G. & NAGODAWITHANA, T W. **Yeast Technology**, 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991, 378p.

REED, G; PEPPLER, H.J. Yeast derived products. In: Yeast Technology, New York, AVI, 1973, p.355-366.

REEVES, P.G.P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.N. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76. rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, p.467-472, 1993.

RICCI-SILVA, M. E.; VITOLO, M.; ABRAHÃO-NETO, J. Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenises releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. **Process Biochemistry**, Watford, v.35, n.8, p.831-835, 2000.

SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU, R.; HOPPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 3777-382, 1985.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição – Fator de saúde e desenvolvimento**, São Paulo: Almed, 387 p., 1987.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**, São Paulo: Varela, 517 p., 1996.

SOMMER, R. Yeast extracts: production, properties, and components. **Food Australia**, Sidney, v.50, n.4, p.181-183, 1998.

SMITH, R.H.; PALMER, R. A chemical and nutritional evaluation of yeasts and bacteria as dietary protein sources for rats and pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.27, n.8, p.763-768, 1976.

SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Analytical Biochemistry**, New York v.30, n.9, p.1190-1206, 1958.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v.39, n.12, p.1412-1415, 1967.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I. **Yeast genetics: fundamental and applied aspects**, New York, Sept, 865p. 1993.

SUGIMOTO, H. Synergistic effect of Ethanol and Sodium Chloride on autolysis of Baker's yeast for preparing food-grade yeast extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, p.939-942, 1974.

SUPHANTHARIKA, M.; VARAVINIT, S.; SHOBSNGOB, S. Production of Yeast Extract Containing Hydrolyzed non-yeast Protein. **Foods Food Ingredients**, J, Osaka, v.181, p. 70 –75, 1999.

VAN BUREN, C.T.; KULKARNI, A.D.; RUDOLPH, F. The role of nucleotides in adult nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, p.160S-165S, 1994.

VAN DAMME, G. Yeast extracts provide functionality of flavor enhancement as well as flavor contribution. **Intern. Food Ingredients**, v. 3, p.55-56. 1994.

VERDUYN, C.; SUKSOMCHEEP, A.; SUPHANTHARIKA, M. Effect of high-pressure homogenization and papain on the preparation of autolysed yeast extract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands. v.15 p.57-63, 1999.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista Nutrição**, Campinas, v.13, n.3, p.186-192, 2000.

VIOTTO, L.A. **Fracionamento das proteínas do leite utilizando membranas cerâmicas de micro e ultrafiltração**. Tese - Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP, 1997.

VUKOVIC, R. HUNDINA-DOMLADOVEC, M. & MRSA, V. Molecular organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Technology Review**, Cambridge, v.32, n.2-3, p.99-102, 1994.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. England: Willy, 1998, 342p.

WILLIAMS, D.L.; PRETEUS, H.A.; McNAMCE, R.B.; JONES, E.L.; ENSLEY, H.E.; BOWDER, I.W. Development of a water soluble sulfated (1 leads do 3)- β -D-glucos

biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.235, p.247-257, 1992.

WU, C.; SEITZ, P. K.; FALZON, M. Single-column purification and biocharacterization of recombinant human parathyroid hormone-related protein (1-139). **Molecular and Cellular Endocrinology**, Texas, v.170, p.163-174, 2000.

YORK, S.W.; INGRAM, L.O. Ethanol production by recombinant *Echerichia coli* KO11 using crude yeast autolysate as a nutrient supplement. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.18, p. 683-688, 1986.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

