

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados  
protéicos de levedura (*Saccharomyces sp*), obtidos por diferentes  
processos de extração**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARIA TERESA BERTOLDO PACHECO e aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de junho de 1996.  
Campinas, 17 de junho de 1996

PROF. DR. VALDEMIRO C. SGARBIERI  
Presidente da Banca

ia Teresa Bertoldo Pacheco  
Bióloga

r: Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição.

Campinas, 1996



1996/06

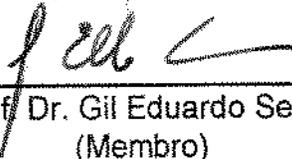
## Banca Examinadora

Tese defendida e aprovada em 17 de Junho de 1996, pela Banca Examinadora  
constituída pelos professores:



---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra  
(Membro)



---

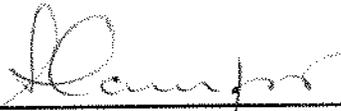
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán  
(Membro)

---

Prof. Dr. José Alfredo Gomes Areas  
(Membro)

---

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueredo Toledo  
(Membro)



---

Dra. Sônia Dedeca da Silva de Campos  
(Membro)



---

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco  
(Membro)

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pela orientação competente e dedicada.

À PRODESA, na pessoa do Dr. Ruan Carlos Cruz Sanchez, pela cessão da levedura desamargada.

Ao Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agronômicas (CPQBA), na pessoa do Dr. Gil Eduardo Serra, pelo empréstimo das instalações e equipamentos.

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

À Dra. Dilza Mantovani e ao Sr. Marcelo Morgano do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de tecnologia de Alimentos, pelas análises de minerais.

À Dra. Sonia Dedeca da Silva Campos do Laboratório de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística do Instituto de Tecnologia de Alimentos e à Sra. Elena M. Freitas dos Santos do Departamento de Tecnologia de Cereais da UNICAMP, pelo auxílio na utilização do analisador de textura.

À Profa. Dra. Eliane Gertrudes Macedo Lemos e Sr. João Carlos Campanharo, do departamento de Tecnologia da UNESP, pela colaboração na eletroforese.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos funcionários Francisco Carraro, Liana Dawood, Eliete de Carvalho e Soeli Reis, do departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, pelo apoio técnico.

À Srta. Cristiane Alfredo e Margareth Randi Moraes, da secretaria de pós graduação pela dedicação e eficiência.

Aos funcionários da biblioteca Cláudia A. Romano; Creuza K. Nomura; Marli I.A. Medeiros; Antônio C. Gonçalves; Geraldo A. Silva e José C. Marcondes, pela dedicação e carinho com que sempre atenderam minhas solicitações.

Aos doutores membros da Banca Examinadora pela contribuição nas correções e sugestões, que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

Às amigas Glenis Mabel C. Córdoba, Rose Meire B. Nascentes, Mara R. da Silva, Elaine M. Assis, Andréa Frias, Erna V. Jong, Elizabete M. Viegas, pela amizade e auxílios prestados.

Aos meus pais Jorge e Eliza, as minhas irmãs Maria Cristina e Silvia Helena e a meus filhos Carolina, Juliana, Alex e André, pelo carinho e apoio.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE LEVEDURA.....	18
2.2 VALOR NUTRICIONAL DA PROTEÍNA DE LEVEDURA.....	19
2.3 LIMITAÇÕES DA PROTEÍNA DE LEVEDURA.....	22
2.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA REDUÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	25
2.5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA.....	29
2.6 FOSFORILAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA.....	30
2.7 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	34
2.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	35
2.8.1 Ligação com íons.....	35
2.9 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	37
2.9.1 Solubilidade.....	38
2.9.2 Capacidade de retenção de água (CRA).....	41
2.9.3 Propriedades emulsificantes.....	42
2.9.4 Propriedades espumantes.....	45
2.9.5 Geleificação.....	47
2.9.6 Viscosidade.....	49
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	51
3.1.1 Ruptura mecânica das paredes celulares e otimização do processo de rompimento.....	51
3.1.2 Isolamento da proteína a partir de células rompidas.....	53
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	55
3.2.1 Composição centesimal.....	55
3.2.2 Ácidos nucleicos.....	55
3.2.3 Composição em minerais.....	55
3.2.4 Composição em aminoácidos.....	56
3.2.5 Grau de fosforilação.....	57
3.2.6 Eletroforese.....	57
3.2.7 Complexação das proteínas com íons cálcio.....	58
3.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	61
3.3.1 Solubilidade.....	61

3.3.2 Capacidade de retenção de água (CRA) .....	62
3.3.3 Geleificação .....	62
3.3.4 Viscosidade.....	63
3.3.5 Propriedades emulsificantes.....	65
3.3.6 Propriedades Espumantes .....	67
<b>3.4 AVALIAÇÕES NUTRICIONAIS E TOXICOLÓGICAS .....</b>	<b>69</b>
3.4.1 Determinações "in vitro" .....	69
3.4.2 Determinações "in vivo" .....	71
3.4.3 Avaliação toxicológica .....	72
<b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>73</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ROMPIMENTO DE PAREDE CELULAR .....	74
4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA LEVEDURA ÍNTEGRA E DOS VÁRIOS CONCENTRADOS PROTÉICOS OBTIDOS.....	77
4.3 COMPOSIÇÃO MINERAL DAS CÉLULAS DE LEVEDURA E DE CONCENTRADOS PROTÉICOS FOSFORILADOS.....	81
4.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS</i> E CONCENTRADOS PROTÉICOS.....	83
4.5 COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO .....	85
4.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA PROTEÍNA DE LEVEDURA.....	87
4.6.1 Solubilidade.....	88
4.6.2 Capacidade de retenção de água .....	91
4.6.3 Viscosidade.....	92
4.6.4 Geleificação .....	101
4.6.5 Propriedades emulsificantes.....	106
4.6.6 Propriedades espumantes.....	112
4.7 CAPACIDADE DE LIGAR CÁLCIO.....	120
4.8 PROPRIEDADES NUTRITIVAS .....	127
4.8.1 Avaliação "in vitro".....	127
4.8.2 Ensaio biológico .....	128
4.8.3 Avaliação toxicológica .....	133
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>139</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de otimização do rompimento celular.....	52
Figura 2. Fluxograma de obtenção do concentrado protéico sem modificação.....	53
Figura 3. Fluxograma do método de extração da proteína de levedura com perclorato ou trimetafosfato de sódio.....	54
Figura 4. Eletroforese em gel poliacrilamida (PAGE) de proteína de levedura precipitada no ponto isoelétrico (CP), proteína de levedura fosforilada (CPF) e mistura de padrões (P).....	86
Figura 5. Perfil de solubilidade em água dos concentrados protéicos de levedura ( <i>Saccharomyces</i> sp.) em função do pH.....	89
Figura 6. Perfil de solubilidade do concentrado protéico fosforilado (CPF) em função da força iônica.....	90
Figura 7. Efeito da velocidade de cisalhamento na viscosidade aparente de concentrados protéicos (3%) em pH 7,0.....	93
Figura 8. Curvas de fluxo do concentrado protéico fosforilado diferentes concentrações em água destilada.....	95
Figura 9. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação em escala logarítmica, de dispersões de CPF em água, em diferentes concentrações.....	96
Figura 10. Variação do coeficiente de consistência $K$ em função da concentração para a amostra CPF.....	99
Figura 11. Efeito da temperatura na viscosidade aparente do concentrado protéico fosforilado 3%, em pH 6,0.....	99
Figura 12. Variação da viscosidade aparente de dispersões a 3% de CPF em função do pH, para as taxas de deformação de $24\text{s}^{-1}$ e $100,9\text{s}^{-1}$ .....	100
Figura 13. Tubos com géis da amostra CPF formados nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10% de proteína CPF.....	102
Figura 14. Capacidade de geleificação das amostras CP, CPP, CPF, e IPS na concentração de 10%.....	104
Figura 15. Efeito da concentração salina (0,1; 0,4 e 0,6M NaCl) nos parâmetros de dureza, fracturabilidade e adesividade de géis com 10% de CPF.....	105
Figura 16. Valores da capacidade emulsificante (C.E.) e estabilidade da emulsão (E.E.) da amostra CPF em água.....	110
Figura 17. Capacidade emulsificante dos concentrados protéicos de levedura em função do pH (velocidade de 10.000 rpm).....	110
Figura 18. Valores da C.E. de concentrados protéicos fosforilados (1% e 0,25%), em função da concentração salina (M).....	113
Figura 19. Propriedades de formação de espuma (FEs) e estabilidade da espuma (EEs) após 30 e 60 minutos para diferentes amostras de levedura e proteína de clara de ovo (PCO) a 1% em pH 7...113	

Figura 20. Capacidade de formação de espuma (Fes) e estabilidade da espuma após 30 e 60 minutos, da amostra CPF 0,5% em função do pH e da concentração salina.....	119
Figura 21. Gráfico de Scatchard para os dados de ligação de cálcio ao concentrado protéico sem modificação (CP), concentrado protéico fosforilado (CPF) e concentrado protéico fosforilado dialisado (CPFd).....	121
Figura 22. Gráfico de Scatchard para os dados de ligação de íons cálcio ao concentrado protéico fosforilado no pH 6,5 a diferentes concentrações.....	123
Figura 23. Gráfico de Scatchard para os dados de ligação de íons cálcio ao concentrado protéico fosforilado (CPF) 1% em diferentes pHs.....	126
Figura 24. Ganho de peso de ratos alimentados por 28 dias com dietas contendo 10% de proteína proveniente de caseína (CAS), células de levedura rompida (CLR) e concentrado protéico fosforilado (CPF).....	129
Figura 25. Consumo de proteína e ganho de peso de ratos alimentados com 10% de proteína de caseína (CAS); de células de levedura rompidas (CLR) e concentrado protéico fosforilado (CPF).....	130

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de ácidos nucleicos (RNA) em algumas leveduras.....	23
Tabela 2. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração de proteína da suspensão de células de levedura 25% (V/V), rompidas em diferentes velocidades e fluxo de 2,4 L/h.....	75
Tabela 3. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração da proteína nas suspensões de células de levedura (25% e 40%) rompidas na velocidade de 2400 rpm, com diferentes fluxos de alimentação (2,4 e 4,8 L/h).....	76
Tabela 4. Resultados da composição centesimal de levedura <i>S. carlsbergensis</i> , comparados com valores da literatura.....	78
Tabela 5. Resultados da composição centesimal aproximada dos concentrados protéicos de levedura obtidos por diferentes métodos de extração, comparados com valores obtidos na literatura.....	80
Tabela 6. Resultados da composição mineral para células de levedura <i>S. carlsbergensis</i> e concentrados protéicos fosforilados, comparados com valores da literatura.....	82
Tabela 7. Resultados da composição de aminoácidos das células de levedura íntegra, <i>S. carlsbergensis</i> e concentrados protéicos, comparados com valores da literatura.....	84
Tabela 8. Capacidade de retenção de água (g de água/g de proteína) das amostras CP, CPP e CPF em função do pH de dispersões a 1%.....	91
Tabela 9. Resultados dos parâmetros do comportamento de fluxo para a proteína de levedura fosforilada (CPF) em diferentes concentrações, comparados a outras proteínas alimentares.....	98
Tabela 10. Parâmetros de textura para a amostra CPF em diferentes concentrações.....	103
Tabela 11. Resultados da capacidade emulsificante (C.E), estabilidade da emulsão (E.E.) e índice de atividade emulsificante (I.A.E.) para dispersões de proteína a 1% em pH 7.....	106
Tabela 12. Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões a 1% e pH 7, de proteínas de levedura comparadas a proteína da clara de ovo.....	114
Tabela 13. Capacidade de formação de espuma (FEs) e parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma para a amostra CPF em diferentes concentrações.....	116
Tabela 14. Capacidade de formação de espuma (CFEs) e parâmetros de drenagem do líquido da espuma para a amostra CPF 0,5% em função do pH.....	117
Tabela 15. Resultados dos valores de N e K obtidos do gráfico de Scatchard, em pH 6,5 e 0,02M de KCl, para concentrados protéicos de levedura.....	122
Tabela 16. Ligação dos íons cálcio ao CP, CPF e CPFd em diferentes concentrações de cálcio ativo (pH=6,5).....	124
Tabela 17. Resultados dos valores de N e K obtidos do gráfico de Scatchard, para CPF(1%) em função do pH.....	126

<i>TABELA 18. Teor de lisina disponível, digestibilidade "in vitro", utilização líquida da proteína (NPU-C) e valor biológico calculado (VB-C).....</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 19. Resultados do consumo de proteína, ganho de peso e taxa de eficiência protéica (PER) para os tratamentos CAS, CLR e CPF, durante 28 dias. ....</i>	<i>130</i>
<i>Tabela 20. Nitrogênio retido (NR), Utilização líquida aparente da proteína (NPUa), Digestibilidade aparente(Da), Valor biológico aparente (Vba).....</i>	<i>131</i>
<i>Tabela 21. Resultados dos níveis séricos de TGP, TGO, creatinina, ácido úrico, uréia, fósforo e cálcio de ratos wistar com 7 semanas de idade, alimentados contendo 10% de proteína de levedura, comparados a valores da literatura. ....</i>	<i>134</i>

## RESUMO

O concentrado protéico utilizado neste trabalho foi obtido a partir de biomassa de levedura desamargada, *Saccharomyces carlsbergensis*, subproduto da indústria cervejeira, que teve suas células rompidas e tratadas quimicamente para redução do conteúdo de ácido ribonucléico (RNA) e melhoramento das propriedades funcionais e nutricionais. Suspensões com 40% de células (v/v), foram rompidas por atrito mecânico, utilizando-se moinho Dyno-mill com 70% da câmara preenchida com esferas de vidro de 0,6 a 1,0 mm, na velocidade de 2400 rpm, fluxo de alimentação 4,8 L/h e temperatura de 15°C. Uma parte das proteínas liberadas das células foi precipitada no ponto isoelétrico, e outra parte extraída com perclorato de sódio 0,5M (NaClO<sub>4</sub>) ou com trimetafosfato de sódio 3% (TMFS), obtendo-se concentrados protéicos com 66, 76 e 74% de proteína, respectivamente. A composição aminoacídica apresentou-se quase perfeita em relação ao padrão de referência da FAO/WHO (1985), destacando-se o conteúdo elevado de lisina. A extração com perclorato foi mais eficiente em reduzir o conteúdo de RNA (86%), embora resultando em perda da funcionalidade da proteína, com exceção da formação de espuma. O tratamento com TMFS fosforilou 35% dos resíduos serina e reduziu 76% do RNA. A fosforilação melhorou as propriedades funcionais da proteína, notadamente a capacidade de retenção de água, viscosidade, estabilidade da espuma e ligação do íons cálcio. A fosforilação também causou um deslocamento do ponto isoelétrico (4,2→3,5), melhorou a funcionalidade na faixa de pH entre 4-6. Ensaio biológicos revelaram que a digestibilidade e NPU foram melhorados nos concentrados, quando comparados às células rompidas da biomassa. O valor nutritivo dos concentrados ficou entre 70-75% do valor da caseína. Não foi diagnosticado efeito tóxico provocado pela ingestão de proteína de levedura extraída com TMFS, com base na avaliação dos índices séricos em ratos, os quais permaneceram dentro da faixa de normalidade para ratos saudáveis.

## Summary

Protein concentrates were obtained from debittered *Saccharomyces carlsbergensis* biomass, a byproduct from beer industry which had their cells broken mechanically and then treated chemically to reduce their nucleic acid (RNA) content and improve its functional and nutritional properties. Cells suspensions (40%v/v) were passed through a Dyno-mill at a feeding rate of 4,8 L/h, 2400 rpm, using glass beads of 0.6 - 1.0 mm to fill 70% of the chamber volume and the temperature of 15°C. After centrifugation to eliminate cell walls part of the supernatant was acidified to the isoelectric pH (4,2) to precipitate the nucleoprotein complex (CP), which was isolated by centrifugation and freeze-drying. Other parts were treated either with 0,5M NaClO<sub>4</sub> or with 3% sodium trimetaphosphate (TMFS), acidified to isoelectric pH and freeze-dried, to obtain concentrates which were called CPP and CPF, respectively. Protein in the concentrates was 66, 76 and 74%, respectively for CP, CPP and CPF. Amino acid composition for the three concentrates was almost perfect showing a high concentration of lysine. Reduction of RNA in the concentrate was more efficient in the extraction with NaClO<sub>4</sub> (86% reduction), however protein functionality, except foaming, was affected most in CPP. Treatment with trimetaphosphate (TMFS) phosphorylated 35% of the serine residues and reduced 76% of the RNA. Phosphorylation improved protein functional properties, notably water retention capacity, viscosity, foam stability, and calcium ion binding. Phosphorylation also caused a shift of the isoelectric pH (4,2→3,5), improving functionality in the pH range 4 - 6. Biological assays revealed improved protein digestibility and NPU in the concentrates, when compared with the broken cells biomass. Nutritive value of the concentrates rated 70 - 75% of casein. No toxic effect of the CPF preparation was detected based on various rat serum determinations, which remained in the range of normality for healthy rats.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, na indústria de alimentos, existe uma tendência mundial em substituir as proteínas de origem animal pelas proteínas vegetais. O constante progresso no campo da biotecnologia tem conduzido ao desenvolvimento de processos e equipamentos, para obtenção de organismos unicelulares em escala industrial, permitindo a produção de um grande volume de biomassa em condições de espaço e tempo bastante reduzidos. Quatro categorias de microrganismos são cultivados como fonte de proteína para consumo humano ou animal: bactérias, algas, fungos e leveduras. Devido às técnicas de cultivo e composição química similares, a proteína oriunda dos microrganismos recebe a denominação generalizada de proteínas de organismos unicelulares (SCP).

A produção de isolados e concentrados protéicos a partir de microrganismos tais como levedura, algas e bactérias, tem recebido considerável atenção nas últimas décadas. Devido ao teor elevado de proteínas (45-65%) são considerados uma boa fonte protéica não-convencional, com perspectivas de ampliação de seu uso na indústria alimentícia (Halász et alii, 1988).

Estudos com leveduras têm merecido um espaço de destaque, não só pelo fato de estarem tradicionalmente associadas à preparação de alimentos e bebidas fermentadas, mas também pela versatilidade e habilidade de crescerem rapidamente numa ampla variedade de substratos (Snyder & Know, 1987; Guzman-Juarez, 1983; Kihlberg, 1972; Satterlee, 1981; Giec & Skupin, 1988). As leveduras, como fonte de proteína, têm sido estudadas principalmente a partir dos anos 60, sendo que até o momento não se dispõe de uma tecnologia que abranja desde o rompimento da célula até o produto final apropriado ao consumo, testado nutricionalmente em experimentos "in vivo".

Existe um grande número de trabalhos patenteados realizados com células e proteína de organismos unicelulares, onde as espécies mais utilizadas são *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis* e *C.*

*tropicalis*. Embora a espécie *Saccharomyces cerevisiae* seja muito empregada em estudos científicos, geralmente nesses trabalhos levedura utilizada foi a de panificação. No Brasil em particular, existem trabalhos com a levedura utilizada no processo de fabricação do etanol, para aproveitamento em rações para animais (Rheinbold et alii, 1987; ANFAR, 1985).

Até a ano de 1970 a levedura *S. carlsbergensis* era considerada uma espécie e por esse motivo até hoje essa variedade utilizada na indústria cervejeira recebe esta denominação. De acordo com a classificação mais atualizada (Barnett, 1992), dentre as quatro variedades existentes de *S. carlsbergensis*, três são classificadas como *S. cerevisiae* e apenas uma variedade como *S. pastoriana*. Atualmente se utiliza para produção de cervejas de alta fermentação a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces uvarum* var. *Carlsbergensis* para cervejas de baixa fermentação, como as produzidas no Brasil.

A levedura de cervejaria tem sido pouco estudada para fins nutricionais, talvez pelo sabor amargo resultante do processo de fermentação, sendo escassos os trabalhos encontrados na literatura. Alguns trabalhos realizados com levedura excedente de cervejaria utilizaram as células inativas intactas, para testes de funcionalidade, sem abordar o aspecto nutritivo (Penny, 1991; Koivurinta et alii, 1980 e 1981; Roshkova et alii, 1986).

Embora a utilização da proteína de levedura seja muito promissora, existem alguns fatores que limitam seu uso, como o alto conteúdo de ácidos nucleicos, que ingerido por humanos em quantidades superiores a 2 g/dia podem causar hiperuricemia, formação de cálculos renais e deposição de ácido úrico nas juntas ósseas, causando a doença conhecida por gota.

Alguns dos procedimentos adotados para redução dos ácidos nucleicos, como os tratamentos químicos, causam alterações nas proteínas, hidrólise, desnaturação, racemização dos aminoácidos e formação de lisinoalanina. Outros métodos que

utilizam enzimas e reagentes químicos revelam-se de alto custo e inviáveis para aplicação em grande escala.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma tecnologia desde a extração da proteína até a obtenção de um produto protéico com teores reduzidos de ácidos nucléicos, com propriedades funcionais de qualidade, sem a utilização de tratamentos drásticos ou reagentes caros ou agressivos à saúde humana.

O estudo das proteínas extraídas de levedura, tanto no aspecto nutricional quanto no conhecimento das suas propriedades funcionais, é de grande importância, uma vez que possibilita o aproveitamento da levedura excedente nas indústrias de cerveja, em amplo desenvolvimento no Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Composição química da biomassa de levedura

Encontram-se na literatura algumas informações a respeito da constituição das células de levedura, com referência ao conteúdo de proteínas, aminoácidos, lipídios e minerais.

A relação entre proteínas e lipídios nas células pode variar em função da composição do meio. Geralmente, leveduras crescidas em meios ricos em carbono e escassos em nitrogênio apresentam menor conteúdo em proteína. Independente deste, a biomassa microbiana apresenta alto conteúdo de proteína, quando comparada com a carne, leite e peixe, além de outros componentes essenciais como minerais e vitaminas, sendo a maioria do complexo B (Giec e Skupin, 1988).

De acordo com a espécie, o conteúdo de lipídios varia de 7 a 15%, sendo predominantes, entre os ácidos graxos, os insaturados. O fluxo de oxigênio durante o cultivo das células é o parâmetro que mais influencia na composição de ácidos graxos (Halász e Lasztity, 1991).

Os carboidratos representam 20 a 35% da matéria seca das células, sendo a presente maioria polissacarídeos localizados na parede celular (15 a 20% de glucanas e mananas) e em menor parte carboidratos de reserva energética (glicogênio e trealose). Num estudo realizado por Sarwar et alii (1985) com seis linhagens de leveduras, o conteúdo de fibra alimentar variou na faixa de 15,42 a 17,79%, onde a quantidade de fibra insolúvel foi baixa, 2,47 a 5,49%, e fibra solúvel de 11,19 a 12,97%.

Embora o teor de minerais varie numa ampla faixa, o conteúdo de cinzas das células de levedura é alto, cerca de 10% da matéria seca, onde os principais componentes são fósforo, potássio, magnésio e cálcio. Sarwar et alii (1985) sugerem, pelos resultados obtidos com leveduras crescidas em vários substratos, que o

metabolismo do P, K, Fe, Zn e Na é bem regulado e que não existe contaminação com estes minerais durante o crescimento e consequente processamento. A levedura de cervejaria é considerada uma boa fonte de selênio e cromo, e sua ingestão é recomendada como suplemento alimentar para prevenir estados carenciais de Se, caracterizados por queda de cabelo, retardo do crescimento, deficiência reprodutiva, cardiomiopatias, necrose e degeneração do fígado e do pâncreas (Levander, 1989).

Em relação às vitaminas, as leveduras são essencialmente ricas em complexo B, existindo uma pequena diferença no conteúdo vitamínico de células crescidas em sacarose e etanol (Schay e Wegner, 1985). Em estudos realizados por Sarwar et alii (1985), o conteúdo total de ácido fólico em *Sacharomyces cerevisiae* foi menor que o encontrado em *Candida utilis*. Em geral os processamentos utilizados para produção de autolisados reduzem significativamente o conteúdo vitamínico nos produtos (Schay e Wegner, 1985).

## **2.2 Valor nutricional da proteína de levedura.**

O conteúdo de nutrientes da célula de levedura depende principalmente do estado metabólico do organismo e a qualidade da proteína é determinada pelo balanço de aminoácidos essenciais, adicionalmente à digestibilidade e biodisponibilidade da proteína (Halász e Hasztity, 1991).

Geralmente as células de microrganismos são deficientes em metionina e marginalmente deficientes em valina, isoleucina e triptofano. Apresentam teores elevados de outros aminoácidos essenciais, principalmente lisina e treonina, constituindo-se em excelente complemento para alimentos a base de cereais (Kinsella, 1987). A composição de aminoácidos de células íntegras de *S. fragilis*, crescidas sob diferentes condições de meio de cultura, revelou similaridade em aminoácidos, independente do meio utilizado. Em outra pesquisa, tentaram sem sucesso aumentar o conteúdo de aminoácidos sulfurados em levedura através do aumento do nitrogênio e do conteúdo de cisteína, colina e treonina do meio (Vananuvat e Kinsella, 1975). Num

estudo de 271 linhagens de levedura, Nelson et alii (1975) encontraram valores de metionina variando de 0,4 a 1,7g / 16g de nitrogênio.

A adição de proteína de levedura à farinha de trigo, arroz e milho causou uma melhoria notável na composição de aminoácidos. Como as proteínas da farinha de trigo e de outros cereais possuem um teor adequado de metionina e cistina, mas baixo em lisina, as proteínas de levedura são altamente complementares, possuindo um grande potencial para suplementação em produtos desta natureza (Mateles e Tannebaum, 1969).

Diferentes níveis de concentrado protéico de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foram adicionados à massa de tortilhas de milho, com o objetivo de melhorar a qualidade da proteína. Uma melhora significativa no conteúdo de lisina foi observada, sendo 18% a quantidade máxima de concentrado de levedura incorporada à massa, que não causou alteração das propriedades organolépticas do produto. Essa quantidade elevou o PER de 1,86 (tortilhas controle) para 2,05 (Arriola et alii, 1989).

Em relação a bioensaios utilizando proteína de levedura, existem poucos dados publicados na literatura. Num estudo de fortificação de pães, a adição de 2 a 12% da levedura tórula foi utilizada como suplemento da farinha de panificação. Em ensaio biológico com ratos, verificou-se a elevação do PER de 1,31 para 2,28 quando o nível de substituição foi de 8%. O total de nitrogênio retido na carcaça dos animais alimentados com pão suplementado foi maior do que o observado no grupo de controle, sem suplementação (Lin et alii, 1986).

Na alimentação de vacas leiteiras, 25% do nitrogênio da dieta foram substituídos por proteína de levedura (Pruteen) e comparados ao nitrogênio proveniente do farelo de soja e uréia. A substituição do nitrogênio por Pruteen não afetou o balanço de nitrogênio ou a produção de leite, mas indicou uma tendência para valores superiores às dietas suplementadas com uréia ( Teller e Godeau, 1986).

Em testes nutricionais realizados com *Tretahynema*, usando caseína como padrão, Lyutskanov et alii (1990) encontraram, para a *Sacharomyces cerevisiae* 211, o valor biológico de 71,4%. O escore químico de aminoácidos, calculados em relação à proteína referência da FAO, revelou como limitantes a metionina e cistina (63%) e o triptofano (69%).

Seis produtos a base de levedura foram produzidos de dois microrganismos (*Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) e utilizados por Sarwar et alii (1986) como fonte protéica em diversas formulações na alimentação de ratos "Sprague Dawley". Os autores testaram a suplementação da proteína da dieta a base de levedura com 0,2% de L-metionina ou L-cistina. A suplementação com cistina teve pouco efeito no consumo de dieta e no ganho de peso (NPUr = 68 a 81%), quando comparada a dietas suplementadas com metionina (NPUr = 79 a 86%). Dietas compostas de 20% de proteína de levedura íntegra ocasionaram redução da taxa de crescimento (30-80%), aumento do volume da excreção urinária (cerca de 3,5 vezes) e dos níveis de alantoína no plasma e urina, concluindo que os produtos de levedura em altas concentrações afetaram tanto a qualidade da proteína como a excreção renal dos metabólitos da purina.

A qualidade nutricional da proteína de levedura tem sido estimada pela digestibilidade, valor biológico, utilização líquida da proteína e quociente de eficiência protéica para animais e estudos de balanço de nitrogênio para humanos. O quociente de eficiência protéica (PER) de células de levedura, que ficou em torno de 2,02, pôde ser elevado para 2,5 pela adição de 0,5% de metionina à proteína da dieta (Bressani, 1968).

O perfil nutricional de produtos a base de células de levedura, com a adição de 0,1% a 0,2% de metionina à proteína, é equivalente a produtos elaborados com proteína de soja ou farinha de peixe. De acordo com a "Food and Drug Administration" (FDA), somente células secas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Kluyveromyces fragilis* podem ser utilizadas como aditivos em gêneros alimentícios

para consumo humano, pelo fato de já terem sido submetidas aos testes toxicológicos exigidos por este órgão (Boze et alii, 1992).

### **2.3 Limitações da proteína de levedura**

A utilização de levedura como fonte de proteína na dieta de humanos e primatas superiores é limitada por dois fatores principais: a presença de paredes celulares rígidas e o alto teor de ácidos nucleicos na biomassa.

#### **Rompimento da parede celular**

As paredes das células são resistentes às enzimas digestivas, tornando os componentes intracelulares parcialmente indisponíveis. Segundo Kihlberg(1972), a extração da proteína celular melhora muito sua digestibilidade e valor biológico. Para solucionar a limitação imposta pela parede celular, vários métodos químicos, físicos e enzimáticos tem sido testados (Hughes et alii, 1971; Kihlberg,1972; Kinsella e Shetty,1978; Tannembaum e Wang,1975). Através da aplicação de calor pelo cozimento e autoclavagem, alguns pesquisadores foram capazes de melhorar o valor da proteína de células de algas (Cook et alii, 1963). Autólise tem sido utilizada para modificar a parede celular de leveduras pela ação de enzimas endógenas. Plasmólise e hidrólise tem sido empregada para preparação de extratos, usados como agentes flavorizantes (Kihlberg, 1972). Através de uma combinação de tratamentos mecânico e químico, Okezie e Kosikowski (1981) obtiveram o rompimento de células de levedura *Candida tropicalis* com um rendimento de 71% de extração de proteína celular.

O método de ruptura mecânica tem sido muito utilizado, principalmente quando se deseja obter produtos com boas propriedades funcionais, permitindo uma recuperação eficiente da proteína mais próxima ao seu estado nativo, pois evita o uso de tratamentos drásticos de temperatura, pH e introdução de reagentes químicos (Hedenskog e Mogren, 1973). A desintegração mecânica pode ser conduzida por vários meios, como em homogeneizador convencional, desintegrador de alta pressão, exposição ao ultra som e desintegrador tipo moinho de bolas (Engler,1979).

Mutantes da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (JD 109), isolados por Schaffeld et alii (1982), apresentaram alguma perturbação a nível de parede celular, a qual podia ser rompida à temperatura de 37°C, apresentando desta maneira grande potencial para produção de autolisados como agente "flavorizante".

### Presença de ácidos nucléicos

O problema de mais difícil solução para utilização dos microrganismos unicelulares para fins alimentícios consiste no alto conteúdo de ácidos nucléicos, principalmente o ácido ribonucléico (RNA), cuja quantidade pode atingir até um terço do total da proteína (Shetty e Kinsella, 1982).

O conteúdo de ácidos nucléicos é elevado tanto na biomassa como na proteína isolada. A tabela abaixo fornece a composição, em percentual, de algumas fontes de proteínas de levedura (Rosales, 1984).

Tabela 1. Conteúdo de ácidos nucléicos (RNA) em algumas leveduras.

Espécie	RNA (%)
<i>Candida lipolítica</i>	9,0 - 11,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,0 - 8,0
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	6,0 - 7,5
<i>Candida tropicalis</i>	8,5 - 9,7
<i>Candida utilis</i>	7,5 - 10,5

De acordo com a literatura existe a formação de complexos nucleoprotéicos, que são unidos entre si por ligações fracas não-covalentes, tais como interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. As ligações iônicas

ocorrem predominantemente entre os grupos fosfatos aniônicos dos ácidos nucléicos e grupos catiônicos dos aminoácidos básicos das proteínas (Olser, 1975; Kinsella, 1987; Tsang et alii, 1979; Vananuvat & Kinsella, 1975; Waslien et alii, 1970).

Muitas evidências sugerem que na estrutura tridimensional do complexo nucleoprotéico, o RNA está localizado no centro, formando um núcleo densamente rodeado por proteínas ribossômicas. A natureza altamente hidrofóbica destas proteínas indica um grande potencial de interações hidrofóbicas entre elas, criando uma região apolar no centro. A formação de ligações de hidrogênio e eletrostáticas nesta região de baixo potencial dielétrico pode, conseqüentemente, ter alta energia, estabilizando desta forma o complexo. Acredita-se que a desestabilização das interações hidrofóbicas podem causar, concomitantemente, quebra das ligações de hidrogênio e de forças iônicas, pelo fato de alterarem seu meio dielétrico (Shetty e Kinsella, 1982; Damodaran e Kinsella, 1984).

Todo esse cuidado em reduzir o conteúdo de ácidos nucléicos, advém do fato que mamíferos, como primatas superiores e humanos, não possuem a enzima uricase que degrada o ácido úrico, produto final do metabolismo dos ácidos nucléicos, especialmente do ácido ribonucléico (RNA). No processo de digestão ocorre que os ácidos nucléicos, ao serem ingeridos, são despolimerizados por nucleases do suco pancreático e convertido a nucleosídeos. Os nucleosídeos contém dois tipos de bases nitrogenadas as pirimidínicas (citosinas e uracilas, razoavelmente metabolizadas pelo homem) e as purínicas (adenina e guanina), sendo os compostos purínicos oxidados e desaminados a ácido úrico, elevando sua concentração no plasma (Gutman e Yu, 1965; Clifford e Story, 1976).

O ácido úrico apresenta-se insolúvel no pH fisiológico e tende a se cristalizar, ocasionando distúrbios metabólicos, como formação de cálculos renais e deposição de ácido úrico nas articulações provocando a doença conhecida como "gota" (Tusé, 1984; Roth, 1982; Kihlberg, 1972;). A ingestão diária de no máximo 2g de ácidos nucléicos, por

adulto, tem sido bem tolerada, o que limita a ingestão de levedura ao redor de 20g por dia (Reed, 1991).

Tem sido encontrada uma correlação positiva entre o consumo de bases purínicas provenientes dos ácidos nucleicos, e a presença de produtos metabólicos das bases nitrogenadas, tanto no plasma como na urina. Constatou-se, no entanto, que embora as bases nitrogenadas apresentem uma composição química bastante semelhante, a adenina constitui a principal responsável pelas alterações bioquímicas. Em ensaios com ratos, a ingestão de valores superiores a 0,3% de adenina na dieta provocou o aumento do volume urinário, do teor de nitrogênio no plasma e urina, e presença nos rins, de um derivativo da adenina, o 2,8-dioxiadenina. Nas condições experimentais, o nível saudável recomendado para consumo de adenina poderia ser no máximo de 0,1% (Cliford e Story, 1976).

#### **2.4 Métodos utilizados para redução dos ácidos nucleicos**

Os métodos para redução dos ácidos nucleicos da biomassa microbiana podem ser agrupados em quatro categorias:

##### **Limitação dos ácidos nucleicos durante a fermentação**

Teoricamente seria ideal reduzir o conteúdo de ácido ribonucleico da proteína de microrganismos por um controle no processo de fermentação. Observou-se que a limitação do conteúdo de amônia e polifosfatos no meio de cultura ocasiona diminuição no teor de RNA em relação à concentração de proteína. No entanto, essa redução do RNA é muito limitada, pois ocorre uma redução simultânea da proteína, uma vez que o ácido ribonucleico está intimamente associado a síntese de proteínas (Vilkari e Linko, 1977).

##### **Produção de concentrados protéicos com teores reduzidos de RNA.**

Como metodologia de extração visando a obtenção de concentrados protéicos com teores reduzidos do RNA, tem-se utilizado sais da série caotrópica como o

perclorato de sódio (NaClO<sub>4</sub>), tiocianato (NaSCN) e tricloroacetato. Os sais utilizados numa concentração de 0,5 a 1,0M são muito efetivos em dissociar o complexo RNA-proteína, levando à redução do conteúdo de RNA da proteína isolada no ponto isoelétrico (Damodaram & Kinsella, 1984a). Quando reagentes, como NaClO<sub>4</sub> e NaSCN, são adicionados a uma solução aquosa do complexo RNA-proteína, os sais primeiramente afetam as ligações de hidrogênio da água, que dão origem a uma cascata de eventos levando à completa dissociação do complexo (Damodaran e Kinsella, 1983).

O princípio do método baseia-se em que as interações hidrofóbicas são as de ocorrência principal no complexo, formando uma região de baixo potencial dielétrico, que reforça as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e de Van der Waals, criando uma espécie de concha ausente de água no interior do complexo, onde se localiza o RNA. A introdução de sais ocasiona a desestruturação das ligações de hidrogênio da água, resultando em alteração da estabilidade termodinâmica da água circundante da molécula de proteína, levando ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas, permitindo a penetração de água no interior da molécula, desestabilizando o complexo.

#### **Hidrólise e extração de ácidos nucléicos de células íntegras pela ação de reagentes**

A extração química dos ácidos nucléicos para determinações analíticas tem sido realizada com ácidos, álcalis, fenóis, sais e detergentes. Tais métodos para separação quantitativa dos ácidos nucléicos são complicados, muitas vezes causam degradação da proteína e são inviáveis para aplicação em larga escala (Hedenskog e Mogren, 1973).

Vários tratamentos alcalinos foram aplicados tanto em células de levedura fresca como secas, para extração da proteína com conteúdo reduzido de ácido ribonucléico, sendo os mais eficientes o hidróxido de sódio e hidróxido de amônio (Vilkari e Linko, 1977). Suspensões de levedura contendo 14% de matéria seca foram tratadas num

reator com agitação mecânica, com  $\text{NH}_4\text{OH}$  numa concentração final variando de 0,33 a 13% e a temperatura 45, 50, 60, 65, 70, 75 e 80°C por 30 minutos. Foi observado uma redução no conteúdo de ácidos nucléicos da biomassa com o aumento da temperatura. Entretanto temperaturas entre 50 e 55°C provocaram uma grande perda de proteína, indicando provavelmente que as proteases atingem o máximo de sua atividade nesta faixa de temperatura. À temperatura de 65°C e 4,4% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  levou à redução de 90% dos ácidos nucléicos (Alvarez e Enriquez, 1988).

Utilizando tratamento com álcali para redução de RNA, Otero e Cabbello (1980), submeteram uma suspensão de levedura em  $\text{NaOH}$  4%, ao aquecimento de 60°C por 5 minutos, sendo novamente observado que o tratamento com álcali nesta temperatura causa significativa hidrólise da proteína. Outras combinações de tratamentos utilizaram altas temperaturas (75-80°C) e menor alcalinidade (pH 10,0-10,5), ou menor temperatura (55-65°C) e alto pH (11,5-12,0).

Embora os processos de hidrólise e extração alcalina sejam métodos simples e eficientes em reduzir os ácidos nucléicos, provocam a perda de proteínas (30%), destruição de aminoácidos, desnaturação da proteína e tornam a lisina indisponível, podendo inclusive levar a formação de compostos indesejáveis como lisinoalanina (Kinsella, 1987).

Soluções ácidas também foram utilizadas para hidrólise e extração do RNA de células íntegras. Zee e Simard (1975), usaram tratamento pelo calor em pH ácido para evitar perda de aminoácidos e proteínas. O conteúdo de ácidos nucléicos de *Rhodotórula* foi diminuído de 6,5 para 1,2% pelo tratamento a 90°C por 120 minutos a pH 2, através da adição de ácido clorídrico.

Algumas metodologias foram desenvolvidas visando a redução do RNA em meios ácidos, utilizaram o  $\text{HCl}$  em concentrações variando de 0,1 a 1,0M, em temperaturas de 60 a 90°C e o tempo de exposição variando de 10 a 60 minutos. O tratamento escolhido como mais eficiente foi aquele que utilizou  $\text{HCl}$  1M a 60°C por 10

minutos, resultando numa redução de 87% do RNA e uma perda de 13% da proteína. Nos outros tratamentos obtiveram menor remoção do RNA e maior perda da proteína (Otero et alii, 1982).

### **Hidrólise e extração de ácidos nucléicos através de enzimas endógenas ou exógenas**

Para utilização das ribonucleases endógenas, é necessário fazer inicialmente uma ativação das enzimas, que pode ser por mudanças na localização celular da ribonuclease, por mudanças conformacionais da enzima ou pela destruição de seus inibidores. Os inibidores podem ser destruídos pelo emprego de temperaturas elevadas, onde um choque térmico sub-ótimo em combinação com ânions carboxílicos, tais como formiato e acetato, aceleram a quebra dos produtos de hidrólise das células e aumentam a permeabilidade da parede das células. A ribonuclease de *Candida utilis* foi ativada pela seqüência de tratamentos, aquecimento a 68°C por poucos segundos, hidrólise do RNA pela incubação a 50°C por 1 hora e por último mantidas a 55°C por 1 hora, para que os produtos de hidrólise deixassem a célula e se dirigissem para o meio. Desta forma o conteúdo de RNA foi reduzido em 85% (Schachtel, 1981a; Giec e Skupin, 1988).

A redução dos ácidos nucléicos pela ação de enzimas exógenas foi inicialmente pesquisada por Castro et alii (1971), que fizeram um aquecimento das células íntegras de levedura a 80°C por 30 segundos para inativar as enzimas endógenas, seguida de incubação com ribonuclease pancreática bovina. A temperatura de incubação foi de 55/65°C e o pH de 6,75 a 8,0, sendo a relação enzima:célula de 1:10.000 (peso/peso), obtendo uma redução de 88% dos ácidos nucléicos.

A utilização da ribonuclease exógena é um método rápido e simples, mas implica num alto custo de enzimas e a proteólise causa redução no rendimento da proteína. A ribonuclease endógena se apresenta como um método simples e econômico, tendo como desvantagem a lentidão do processo e como no caso anterior a redução da proteína (Kinsella, 1987).

De todos os artigos da literatura está claro que os processos conhecidos para a redução dos ácidos nucléicos não tem resolvido o problema de obter um produto final aceitável, tanto do ponto de vista nutricional como econômico.

## **2.5 Modificação química da proteína**

A modificação química da proteína, é um método que tem sido aplicado em proteínas em geral, como uma técnica para estudo de estrutura, conformação, sítios de resíduos ativos e também com a finalidade de melhorar suas propriedades funcionais, o que nem sempre implica em melhoria das propriedades nutricionais (Mateis, 1991). O processo de modificação em geral, envolve reações químicas das proteínas com reagentes, que promovem reações nucleofílicas ou redutivas, com os grupos funcionais das cadeias laterais das proteínas ricas em elétrons. Vários estudos foram conduzidos para obter isolados protéicos de células microbianas com teores reduzidos de ácidos nucléicos e boas propriedades funcionais, através de modificações químicas. As proteínas de levedura foram modificadas quimicamente usando reagentes reversíveis como o anidrido maléico e citracônico, por succinilação, acetilação, alquilação e fosforilação (Vananuvat e Kinsella, 1978; Huang e Kinsella, 1987; Guzman-Juarez, 1983; Kinsella e Shetty, 1978, Shetty e Kinsella, 1982).

A modificação dos grupos amino livres com anidridos ácidos a pH 9,0, ocasiona um aumento da carga líquida negativa, desestabilizando o complexo núcleo-protéico, por repulsão eletrostática entre as proteínas aniônicas e RNA. A succinilação de suspensão de células rompidas de levedura com anidrido succínico, aumenta o rendimento da extração de 60 para 85% e reduz o conteúdo de RNA para valores menores que 2%. Embora a proteína succinilada seja clara, leve e com boas propriedades funcionais, ocorre uma redução na biodisponibilidade da lisina, pelo fato da reação não ser reversível (Kinsella e Shetty, 1978). A succinilação proporciona um alto rendimento de extração e proteínas com boas propriedades funcionais, sua inviabilidade advém do grupo succinil permanecer ligado a proteína, causando prejuízos à saúde e alto custo de produção (Kinsella, 1987).

Os agentes modificantes que permanecem ligados à proteína podem levar à redução da biodisponibilidade de alguns aminoácidos, diminuir a digestibilidade da proteína modificada, e ainda, necessitam situarem-se dentro das especificações regulamentares para que possam ser consumidas. Portanto, o mais indicado para alimentos seria o uso de reagentes modificadores reversíveis, de fácil remoção dos grupos acoplantes, em condições que não levem à desnaturação da proteína (Shetty e Kinsella, 1982).

O anidrido maléico e citracônico são reagentes modificantes reversíveis, utilizados por Shetty e Kinsella (1980 e 1982), com a finalidade de separar o ácido ribonucléico das proteínas, por rompimento das interações eletrostáticas e posteriormente remoção dos grupos modificantes sob condições ácidas (pH 4,0 a 30°C). O anidrido citracônico foi mais eficiente que o maléico na redução dos ácidos nucleicos; ao nível de modificação de 50%, o anidrido maléico reduziu o RNA em 12%, enquanto que a citraconilação em 50%.

A citraconilação foi tão eficiente quanto a succinilação para redução do RNA contaminante, resultando num isolado protéico com menos de 2% de RNA. A decitraconilação levou a diminuição da digestibilidade "in vitro" da proteína pela pancreatina e redução na solubilidade (Shetty e Kinsella, 1979). A citraconilação é vantajosa por ser uma reação reversível, não deixando resíduos químicos na proteína isolada. No entanto é uma reação química complicada, de alto custo ocasionando perdas em algumas das propriedades funcionais, quando a proteína é decitraconilada (Kinsella, 1987).

## **2.6 Fosforilação química da proteína.**

A modificação química da proteína por fosforilação pode ser mais aceitável que outros tipos de reações, pelo fato que as fosfoproteínas são abundantes na natureza e estão presentes em muitos alimentos, tais como nas caseínas do leite, albumina de

ovo, fosfovitina da gema de ovo, fazendo diariamente parte da dieta humana (Huang e Kinsella, 1986<sub>a</sub>).

A fosforilação é apontada na literatura como um método eficiente para dissociação do complexo RNA-proteína, e obtenção de um concentrado protéico de levedura com baixo teor de ácidos nucleicos. A proteína de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), foi fosforilada com oxiclóreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ), num grau de substituição de 30% dos resíduos  $\epsilon$ -amino da lisina, ocasionando uma redução de 85% do RNA contaminante, após a precipitação em pH 4,2. O resíduo lateral  $\epsilon$ -amino da lisina foi o principal grupo funcional fosforilado e a digestibilidade "in vitro" da proteína não foi afetada (Damodaran e Kinsella, 1984<sub>b</sub>). Embora os resultados sejam muito promissores, existe a necessidade de experimentos com mamíferos para determinar a absorção, digestão, utilização dos aminoácidos das proteínas modificadas e estudar se os componentes introduzidos ao alimento apresentam alguma toxidez ao organismo (Matheis, 1991).

A fosforilação das proteínas tem sido conduzida utilizando uma variedade de reagentes químicos como o oxiclóreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ), pentóxido de fósforo dissolvido em ácido fosfórico, ácido fosfórico com tricloroacetronila com agente acoplante, fosfodiclóreto monofenil, difosfoimidazol e trimetafosfato de sódio (Matheis et alii, 1983). Para fosforilação de proteínas de levedura os mais comuns são o  $\text{POCl}_3$  e o trimetafosfato de sódio (TMFS), sendo que, embora este último reagente não apresente eficiência igual ao  $\text{POCl}_3$  em reduzir o RNA, é um composto que apresenta menor custo e não é tóxico.

O oxiclóreto de fósforo é muito reativo em soluções aquosas de proteína, onde o reduzido pH e o calor produzido pela reação exotérmica, ocasiona desnaturação protéica. O aquecimento indesejável em muitos casos pode ser contornado com a dissolução do reagente em solvente orgânico (geralmente tetracloreto de carbono), sendo adicionado em pequenas proporções à solução de proteína mantida em banho de gelo (Matheis e Whitaker, 1984a). O uso do reagente  $\text{POCl}_3$  apresenta como

desvantagem o manuseio, o custo e a sua natureza altamente corrosiva (Kinsella, 1987).

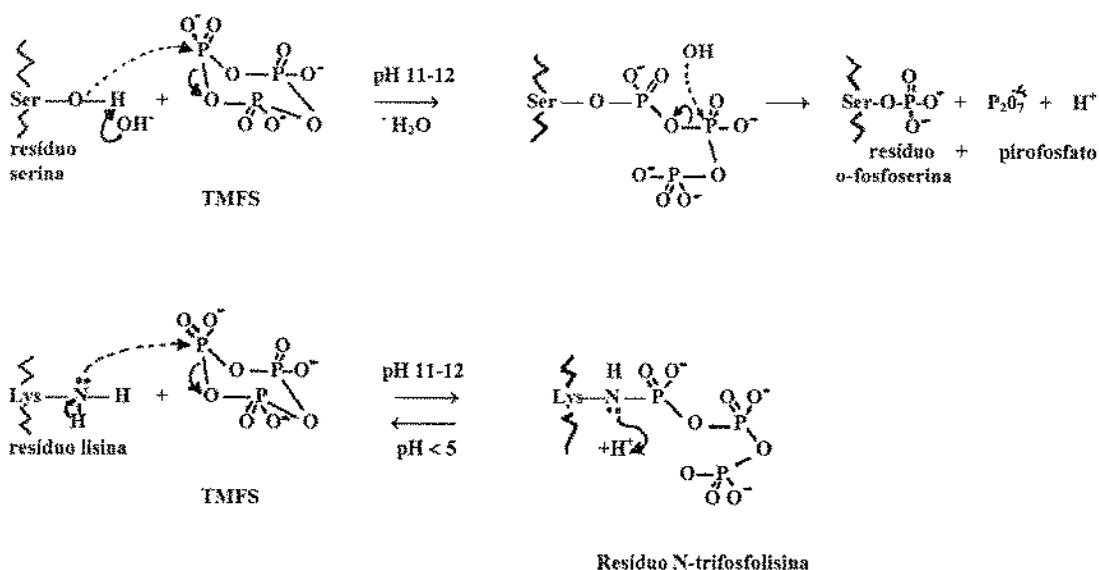
O maior benefício do uso do reagente trimetafosfato de sódio em relação ao oxícloreto de fósforo, é que ele é um aditivo alimentar amplamente utilizado na indústria de alimentos, com aprovação da FDA (Food and Drugs Administration). De acordo com a literatura os polifosfatos cíclicos como o trimetafosfato de sódio, possuem menos efeitos tóxicos e fisiológicos que outros polifosfatos de cadeia linear. Eles são amplamente utilizados para modificação de amidos, como agentes precipitantes auxiliando na coagulação, separação e purificação de proteínas animal ou vegetal, tais como a proteína do leite, extrato de fígado, soro de sangue ou de restos industriais de bebidas (Ellinger, 1972).

O trimetafosfato de sódio é amplamente empregado na obtenção de amidos fosfatados, para dar pastas claras com funcionalidade melhorada. O amido é fosforilado com 2% de TMFS, no estado semi seco a 130°C em pH 11, onde se obtém um grau de fosforilação de 40-50% (Lim e Seib, 1993). O TMFS foi utilizado para fosforilação de 30% dos resíduos de serina da proteína de soja, em solução aquosa de pH 11,5 a 35°C, durante o período de três horas, onde a proteína de soja modificada apresentou as propriedades funcionais melhoradas, sendo o maior mérito desde processo a proteção temporária dos grupos  $\epsilon$ -amino da lisina, conservando sua biodisponibilidade nutricional. Utilizando o TMFS como agente modificante a proteína de soja poderia ser economicamente derivatizada para fosfoproteína, e ser amplamente utilizada como ingrediente funcional no processamento de alimentos (Sung et alii, 1983).

A fosforilação química da proteína de levedura (*Saccharomyces uvarum*) foi realizada por Chen et alii (1991), com a adição de TMFS em pH 12 por um período de 6 horas à temperatura ambiente. Desta forma a proteína precipitada no ponto isoelétrico (4,2), teve o conteúdo de RNA reduzido de 22% para 5%. Em outro experimento, realizado por Giec et alii (1989), a reação com TMFS foi conduzida em

pH 9,0 - 12,5 e temperatura de 25 a 45°C. A fosforilação de 50% ocasionou a redução dos ácidos nucléicos à metade e resultou em isolados protéicos com propriedades funcionais melhoradas e uma ligeira diminuição da digestibilidade enzimática "in vitro".

O TMFS reage preferencialmente com os grupos hidroxilas dos resíduos da serina e da treonina, e o radical ε-amino da lisina. Quando a proteína é precipitada no ponto isoelétrico, a lisina torna-se disponível (reação reversível), ficando somente os resíduos de serina ligados ao grupo fosfato. Desta forma o TMFS protege temporariamente a lisina, evitando sua participação em reações químicas desfavoráveis durante o processo de fosforilação. A fosforilação é conduzida em pH alcalino e em condições de temperatura controlada. O mecanismo da reação, proposto por Sung et alii (1983), pode ser ilustrado a seguir:



No caso da lisina, há formação do resíduo N-trifosfolisina, sendo a reação reversível em pH ligeiramente ácido (pH<5), sem a formação do pirofosfato. Obtém-se deste modo uma proteína com maior número de cargas negativas e menor conteúdo de ácido ribonucléico.

Alguns autores questionam o mecanismo de reação proposta para o caso da proteína de soja, colocando em dúvida se realmente ocorre ligação de natureza covalente entre o reagente trimetafosfato de sódio e a proteína (Matheis e Whitaker, 1984b).

## **2.7 Aspectos toxicológicos**

Devido aos processos tecnológicos utilizados para extração da proteína e redução dos ácidos nucleicos, a proteína de levedura pode resultar num produto prejudicial a saúde, acompanhada de compostos indesejáveis. Os aspectos toxicológicos resultantes da utilização de solventes na indústria de alimentos, descritos no 14<sup>o</sup> relatório publicado pela "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives", encontram-se resumidos a seguir:

- a) tratamento com solventes podem afetar o valor nutritivo dos alimentos processados;
- b) os resíduos dos solventes podem ter efeitos tóxicos;
- c) impurezas no solvente e aditivos para solventes podem permanecer nos produtos e ter efeitos tóxicos;
- d) Os solventes podem reagir com constituintes do alimento para tornar os produtos tóxicos.

Em processos industriais, a extração de proteínas em meio alcalino é desejável, porque proporciona aumento no rendimento de extração. O processamento de proteínas com álcali pode ocasionar mudanças tanto nas suas propriedades químicas como biológicas, tais como decréscimo da digestibilidade e utilização líquida da proteína, racemização e destruição de aminoácidos e ainda formação de outros, como a lisinoalanina. Alguns estudos tem demonstrado que, proteínas provenientes de tratamentos alcalinos, com a produção de lisinoalanina, podem causar alterações renais (nefrocitomegalia), caracterizadas por perda de material citoplasmático e nuclear, resultando em alterações na síntese do DNA e mitoses; sendo os fatores nefrotóxicos estáveis ao calor (Wooddart e Short, 1973).

As injúrias no fígado, causadas por substâncias químicas, tem sido reconhecidas como um problema toxicológico, por mais de 100 anos. As substâncias químicas prejudicam o fígado devido a sua proximidade anatômica do suprimento de sangue do trato digestivo, sua habilidade para concentrar e transformar compostos químicos estranhos e sua função na excreção de xenobióticos ou metabólitos através da bile. Para avaliar as injúrias hepáticas pode-se utilizar a dosagem de enzimas hepáticas liberadas no sangue pelo fígado danificado, onde as aminotransferases tem sua concentração aumentada no soro pela destruição do tecido hepático (Plaa e Herwitt, 1989; Cornish, 1971).

A toxidez também pode ser avaliada através da atividade renal, dosando os componentes que ocorrem normalmente no sangue, para saber se está ocorrendo filtração glomerular. Os componentes comumente dosados são uréia, creatinina e ácido úrico. No caso de ocorrer uma diminuição ou parada da filtração glomerular, tanto a uréia como a creatinina tem seus teores elevados no sangue, sendo considerada normal em humanos a proporção de 10:1, de uréia : creatinina, respectivamente. O ácido úrico elevado no sangue tanto pode ser em função da ingestão elevada de compostos purínicos, originados de dietas ricas de tecidos de órgãos (fígado, rins), como também resultar da diminuição da função renal (Berndt e Davis, 1989).

Alguns dos processamentos propostos para produção de concentrados protéicos de leveduras, com teor reduzido de RNA e livre de paredes celulares, utilizam temperaturas elevadas e meio extremamente alcalino, podendo ocasionar a formação de produtos com efeito tóxico.

## **2.8 Propriedades físico-químicas**

### **2.8.1 Ligação com íons**

As proteínas em geral, apresentam a capacidade de interagir com pequenos íons, e a quantidade de íons que consegue ligar por molécula de proteína é uma propriedade específica, que depende de sua natureza. Adicionalmente, a quantidade

de íons ligados varia em função do pH do meio, tamanho e carga do íon, e da sua concentração (Carr, 1953).

A intensidade da ligação também é muito influenciada pelas condições do meio no qual a proteína se encontra, tais como pH, tamanho e carga do íon, e naturalmente a concentração deste. Com a mudança de pH o número de íons  $\text{Ca}^{++}$  ligado vai depender tanto do grau de dissociação dos grupos funcionais das cadeias laterais, como das mudanças conformacionais que acompanham a dissociação. As medidas da mudança na ligação de um sítio de ligação fornece informações referentes a natureza do sítio de ligação, e medidas desta ligação como função do pH torna possível calcular a constante de equilíbrio e o número total de sítios ligantes ( Edssal e Wyman, 1966)

Os íons multivalentes e pequenos, ligam-se mais rapidamente do que os íons monovalentes ou de grande tamanho. Normalmente as proteínas ligam íons cuja carga é oposta a carga líquida da proteína, para uma determinada faixa de pH, onde ocorre desprotonação de certos grupos funcionais de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral (Carr, 1953 ).

O consumo de concentrados e isolados protéicos vem aumentando com o passar dos anos, sendo que estas fontes alimentares contribuem com uma grande quantidade de sódio, introduzidos principalmente durante a extração alcalina. A ingestão de quantidades excessivas de sódio durante um longo período de tempo tanto pode agravar como causar hipertensão em humanos.

Com a finalidade de produzir concentrados e isolados protéicos com elevado conteúdo de cálcio e teores reduzidos de sódio, Wallace e Sartelee (1977), estudaram a capacidade do isolado protéico de soja e de sangue e concentrado protéico de folha e gluten ligar cálcio em função do pH (7-11) e temperatura (25, 35 e 45°C). Verificaram que todas as proteínas possuem habilidade de ligar cálcio, a qual aumenta com a elevação do pH e temperaturas acima de 35°C. O nível de cálcio ligado seria suficiente para estabelecer uma nova fonte de cálcio na dieta humana.

Em estudos com a fração 11S da proteína de soja (Appurao & Rao 1975), encontraram que ocorre uma substancial ligação de cálcio no pH 7,8, atribuindo como sítios ligantes os grupos imidazólicos dos resíduos da histidina. A presença de ácido fítico presente em algumas proteínas de origem vegetal contribuem para a ligação do cálcio à proteína, sendo que a ligação aumenta proporcionalmente com a elevação do conteúdo de compostos de fósforo (Saio et alii, 1968).

Frações de caseína e  $\beta$ -lactoalbumina fosforilada apresentaram um aumento na capacidade de ligar cálcio, aparentemente devido ao aumento dos grupos fosfatos. A viscosidade da  $\beta$ -lactoalbumina fosforilada na presença de cálcio apresenta o dobro do valor em relação a proteína sem tratamento ( Woo e Richardson, 1983).

## **2.9 Propriedades funcionais**

As proteínas podem ser utilizadas nos produtos alimentícios na forma intacta, tal como carne, ovos, leite e ainda como farinhas altamente protéicas (17-57% proteína), concentrados (60-80% proteína) ou isolados (acima de 90% proteína). Na realidade os fatores que determinam a forma na qual a proteína será utilizada num produto são os custos do ingrediente e as propriedades funcionais desejadas (Baker et alii, 1988).

As proteínas podem ser adicionadas como ingrediente funcional ao alimento para ligar água ou gordura, formar géis ou espuma, emulsificar e alterar o sabor, aparência e dar textura. O tipo de proteína e sua estrutura determinarão suas propriedades (Giese, 1994).

O conceito de propriedade funcional tem sido relacionado com as características físico-químicas mais relevantes da proteína, as quais influem notoriamente nos processamentos de elaboração dos alimentos, estocagem, qualidade e aceitação do produto final. Os atributos funcionais de uma proteína refletem as complexas interações entre a composição de aminoácidos, conformação estrutural e propriedades da proteína em si, como sua interação com outros componentes alimentares e a natureza do meio na qual ela está inserida (Killara e Shakasi, 1986).

A proteína de levedura tem considerável potencial como matéria-prima para formulação de alimentos, desde que passe por processamentos e modificações, que melhorem suas características e eliminem seus componentes prejudiciais a saúde humana (Guzman-Juarez, 1983).

Nenhuma proteína possui todas as propriedades requisitadas, e a proteína da biomassa de levedura não é uma exceção. Embora algum esforço venha sendo feito para comercializá-la como ingrediente protéico universal, muitas vezes não atende as expectativas em formulações, falhando em atuar como especificado no produto. Comercialmente, os extratos de levedura e autolisados são utilizados em alimentos, principalmente como agentes flavorizantes em sopas enlatadas, molhos para carnes e molhos para doces (Peny, 1991).

A utilização de proteínas de levedura como ingredientes em alimentos formulados é interessante, uma vez que esses ingredientes são utilizados em porções reduzidas, evitando com isso a ingestão de grandes quantidades de RNA. Para tal, além do aspecto nutricional, a proteína deve ter suas propriedades funcionais conhecidas, para se poder avaliar melhor suas aplicações.

### **2.9.1 Solubilidade**

Um grande número de concentrados e isolados protéicos tem sido desenvolvidos a partir de vegetais, animais, e em menor proporção de microrganismos para servir como ingrediente funcional em alimentos. A maioria destes ingredientes encontram-se na forma desidratada e como não apresentam funcionalidade na ausência da fase líquida, o primeiro passo e o mais crítico para introduzir propriedades funcionais ao sistema alimentar é sua interação com água para reidratação, entumescimento e solubilização (Chou e Morr, 1979).

Solubilidade pode ser definida como a quantidade de proteína que fica em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e não se sedimenta sob força centrífuga moderada. A solubilidade é um pré-requisito para a maioria das

propriedades funcionais e sua determinação sob uma variedade de condições do meio ambiente (pH e força iônica) fornece valiosas informações sobre seu potencial de aplicações (Patel e Fry, 1987).

Mudanças no pH afetam a quantidade de cargas líquidas da molécula de proteína as quais, conseqüentemente, alteram sua força de interação atrativa ou repulsiva. Geralmente a solubilidade é mínima ao redor do ponto isoelétrico, onde a carga líquida da proteína é zero. Os solutos de um modo geral, produzem mudanças nas interações água-proteína por introduzirem competitividade entre as moléculas de água e as moléculas de sais pelos grupos laterais dos aminoácidos. O aumento da solubilidade em função de baixa concentração de sais é devido ao efeito das interações eletrostáticas, embora a precipitação das proteínas a altas concentrações seja devido a interações hidrofóbicas (Fenema, 1989).

A solubilidade das proteínas isoladas de células de levedura é baixa comparada a outras proteínas vegetais, tais como a soja, principalmente a valores de pH mais comum nos alimentos (Schachtel, 1981<sub>b</sub>). A solubilidade é principalmente influenciada pelas etapas e condições de processamento para obtenção da proteína. Em trabalhos com células de levedura rompidas constatou-se que na presença de sal (0,5% NaCl), o comportamento da curva de solubilidade se altera, mudando o ponto isoelétrico de pH 4,5 para 4,0 e a solubilidade máxima ao redor de pH 6,0. O tratamento térmico (80°C) em meio alcalino (pH 11,8), causou perda na capacidade de solubilização da proteína, provavelmente devido à desnaturação protéica irreversível (Lindblom, 1974).

Num estudo da composição de frações de hidrolisado protéico de levedura de gênero *Candida*, Soboleva e Popova (1986), concluíram que aproximadamente 80% das proteínas são solúveis em soluções salinas diluídas (globulinas) e somente 10 - 12% são proteínas do tipo glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou alcalinas). No entanto a desnaturação, causada principalmente pelos métodos de secagem, faz com que a solubilidade aumente consideravelmente em pH alcalino.

A técnica utilizada por Schachtel (1981<sub>a</sub>), para redução dos ácidos nucleicos da levedura *Candida utilis*, por ativação das ribonucleases endógenas, através do choque térmico a 68°C por 6-9 segundos, seguido da incubação de células integras por 1,5 horas a 52°C, prejudica a solubilidade do nitrogênio e conseqüentemente da proteína. O método de secagem das células de levedura também afetam a solubilidade, sendo que a secagem de preparados de levedura em "spray-drier" e "drum-drier" indicou o primeiro tratamento como o mais drástico, levando à desnaturação irreversível da proteína e conseqüentemente perda de solubilidade (Labuza et alii, 1972).

A modificação de proteínas por métodos químicos ou enzimáticos tem sido aplicada para melhorar suas propriedades funcionais. A succinilação da proteína de levedura de cervejaria (*Saccharomyces carlsbergensis*), resultou em aumento da solubilidade, principalmente em pHs de 4 a 6, sendo que acima do pH 7 todo o nitrogênio ficou solúvel (Vananuvat e Kinsella, 1978).

O método de precipitação da proteína extraída da levedura *Saccharomyces fragilis* por aquecimento a 80°C em pH 6,0, reduziu a solubilidade da proteína em aproximadamente 50%, quando comparada à precipitação em pH 4,0 na temperatura ambiente. O aquecimento pode romper as pontes de hidrogênio, afetar as interações hidrofóbicas e oxidar as ligações dissulfídicas, causando alterações na conformação e propriedades da proteína, tornando-a menos solúvel do que a forma nativa (Vananuvat e Kinsella, 1975).

A fosforilação pelo agente  $\text{POCl}_3$ , de 30% dos grupos  $\epsilon$ -amino da lisina de proteínas de levedura, melhorou ligeiramente a sua solubilidade entre os pHs 5,5 e 7,0 e aumentou muito sua capacidade de ligar água (Huang & Kinsella, 1986<sub>b</sub>). A adição de cloreto de sódio e cloreto de cálcio à caseína fosforilada com uma mistura de  $\text{POCl}_3$  e tetracloreto de carbono, ocasionou uma diminuição da solubilidade em pHs básicos (Medina et alii, 1992).

### 2.9.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de ligar água é uma indicação da quantidade de água retida em uma matriz protéica sob condições definidas, sendo de grande importância em produtos cárneos, onde impedem a perda de água durante o cozimento, em produtos de panificação e alimentos viscosos como sopas e queijos (Kinsella, 1976).

Esta propriedade é facilitada pela formação de pontes de hidrogênio que se estabelecem entre os grupos polares não ionizados e a água, sendo que todo fator dissociante das pontes iônicas ou intercadeias facilitará a retenção de água. A capacidade de ligar água varia em função do tipo de proteína, concentração, pH, presença de sais, carboidratos, lipídios e pode ser influenciada por condições prévias do processamento, tais como aquecimento e tratamento com álcali. Muitas vezes uma desnaturação parcial melhora a capacidade de retenção de água, principalmente em proteínas com estrutura muito compacta, onde um desdobramento parcial da estrutura leva à superfície ligações peptídicas e grupos polares que apresentavam-se ocultos (Cheftel et alii, 1989).

Os sais por ligarem íons específicos, por influenciarem a força iônica ou por alterarem as propriedades do solvente, afetam a capacidade de ligar água. Em sistemas cárneos, a presença de cloreto de sódio em concentrações abaixo de 4% aumenta a capacidade de ligar água. Acima do ponto isoelétrico, a associação de íons cloreto aumentam a carga líquida negativa nos polipeptídeos, reforçando a repulsão mútua entre as cadeias e facilitando a entrada de água pela estrutura protéica (Borderas e Montero, 1988).

O efeito do processo de preparação, nas propriedades funcionais de *Candida utilis*, refletiu na capacidade de retenção de água dos preparados. A maior CRA foi observada no preparado de células rompidas em homogeneizador, incubadas por 90 minutos a 52,5°C e precipitada no ponto isoelétrico. As técnicas utilizadas para reduzir o RNA, não afetaram a CRA. Observaram-se vários fatores envolvidos com esse

índice, como o pH, grau de proteínas desnaturadas, e o tamanho e forma das partículas em função das diferentes preparações (Schachtel, 1981<sub>b</sub>).

Em isolados protéicos de soja, a fosforilação de 30% dos resíduos de serina, com TMFS, quase dobrou a capacidade de retenção de água em relação a amostra controle (Sung et alii, 1983). A capacidade de adsorver água da lisozima e caseína fosforilada com  $\text{POCl}_3$  foi 78 - 158% e 13 - 40%, respectivamente, maior do que as amostras controles (Matheis et alii, 1983).

### **2.9.3 Propriedades emulsificantes**

Emulsão pode ser definida como um sistema contendo duas fases imiscíveis, uma delas dispersa na outra na forma de glóbulos variando de 0,1 a 50  $\mu$  de diâmetro. A fase presente na forma de glóbulos é chamada de fase interna ou dispersa, e a matriz de fase contínua ou externa. Os fatores que mais afetam essa propriedade são o pH, força iônica, concentração e tipo de proteína, viscosidade, natureza e valência das espécies em solução (cálcio, fosfatos) e ainda o processamento em si, como tipo de equipamento, rotação e forma do misturador, taxa de adição, temperatura e qualidade do óleo (Sarwar et alii, 1985).

Termodinamicamente todas as emulsões são instáveis e quebram-se em diferentes tempos. A estabilidade da emulsão é atribuída à presença de cargas elétricas na camada dupla da superfície dos glóbulos, e ocorre que, se o potencial de repulsão excede o potencial de atração, resulta numa barreira oposta à colisão, que sendo maior que a energia cinética das partículas torna a emulsão estável (Cante et alii, 1979).

As proteínas em solução possuem a capacidade de diminuir a tensão entre as fases hidrofílica e hidrofóbica do alimento, comportando-se de maneira semelhante a agentes ativos de superfície. As proteínas possuem a capacidade de se difundir e adsorver próximo a interface, alinhando seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos para a fase não-aquosa, diminuindo a energia livre do sistema e fazendo com que o

restante da proteína se desdobre espontaneamente, extendendo-se numa camada monomolecular (Cheftel et alii, 1989).

A capacidade da proteína formar e estabilizar uma emulsão é crítica para várias aplicações alimentares como, carnes moídas, massas para bolo, cremes para café, maioneses, molhos para saladas e sobremesas congeladas (Kinsella, 1976).

Em estudos realizados com albumina de ovo a capacidade emulsificante (C.E.) da proteína foi dependente do pH, concentração e dispersão das proteínas, volume da fase óleo e presença de sais, sendo que o pH foi a variável mais importante. A capacidade emulsificante da albumina de ovo foi maior a pH ácido (3,0) do que a pH neutro (7,0), devido a sua hidrofobicidade superficial ser maior em pH ácido, atribuída a mudanças microambientais dos resíduos aromáticos neste pH (Mine et alii, 1991).

As propriedades emulsificantes de cinco diferentes preparados de *Candida utilis*, foram avaliadas nos pHs 5,5 e 6,5. Todas as preparações apresentaram elevada capacidade emulsificante, sendo superiores ao caseinato de sódio. A adição de 3% de NaCl causou uma ligeira redução tanto na capacidade emulsificante como na estabilidade da emulsão (E.E.) dos cinco preparados (Schachtel, 1981<sub>b</sub>).

Preparações da levedura tórula (*Candida utilis*) apresentaram C.E. ligeiramente inferior a gema de ovo, quando utilizadas na concentração de 1%. No entanto, em concentrações superiores a capacidade emulsificante do preparado de levedura foi equivalente à de gema, sendo que a mistura dos componentes (gema e levedura) na mesma proporção resultou em C.E. superior aos componentes isolados (Schnell e Akin, 1979).

As atividades emulsificantes (A.E.) de 4 tipos de isolado protéico de levedura (*Saccharomyces fragilis*) foram medidas e comparadas a do isolado protéico de soja por Vananuvat e Kinsella (1975). Todas as preparações de proteína de levedura apresentaram A.E. ligeiramente superior ao isolado de soja, com excessão da

preparação com a proteína de células rompidas com 0,4% de NaOH e precipitada a 80°C por 30 segundos em pH 6,0.

Foi observada uma correlação positiva entre a solubilidade e o índice de atividade emulsificante (IAE) para proteínas de levedura modificadas. Proteínas succiniladas apresentaram-se altamente solúveis e um excelente índice de atividade emulsificante, sendo crescente a relação do índice com o grau de succinilação. Proteínas de levedura sem modificação não se apresentaram completamente solubilizadas nas condições do experimento (pH 7), resultando em baixo índice de atividade emulsificante (Pearce e Kinsella, 1978).

Concentrados protéicos de *Candida utilis* (68% de proteína) e *Candida tropicalis* (71% de proteína), obtidos por combinação de tratamento mecânico e químico, foram comparados ao concentrado protéico de soja quanto às suas propriedades emulsificantes. A capacidade emulsificante do concentrado protéico de *C. utilis* (30,0 mL de óleo/g proteína) foi aproximadamente duas vezes maior do que o concentrado de soja (15,0 mL/g proteína) e quase três vezes maior que o concentrado de *C. tropicalis* (11,0 mL/g proteína) nas mesmas condições de teste. Todas as amostras revelaram baixa estabilidade de emulsão, sendo que os concentrados protéicos de levedura foram ligeiramente mais estáveis que o concentrado protéico de soja (Okezie e Kosikowski, 1981).

O isolado protéico de soja fosforilado com TMFS mostrou uma melhora significativa tanto na capacidade emulsificante como na estabilidade da emulsão em relação a proteína controle. A estabilidade da emulsão da proteína fosforilada foi aproximadamente 29% mais elevada em relação ao controle (Sung et alii, 1983). A proteína de soja fosforilada com  $\text{POCl}_3$ , apresentou alta atividade emulsificante entre os pHs 4,5 e 6,5, quando comparada a proteína de soja sem tratamento. A proteína de soja não fosforilada não mostrou atividade emulsificante nos pHs 4,5 e 5,5. O aumento da A.E. foi diretamente proporcional ao grau de fosforilação da proteína (Hirotsuka et alii, 1984).

Proteínas de levedura fosforiladas com oxiclreto de fósforo, mostraram um aumento na capacidade emulsificante, especialmente entre os pHs 6 e 7, que reflete o aumento da solubilidade e viscosidade da proteína modificada, sendo no entanto inferior a proteína de levedura succinilada (Huang & Kinsella, 1987).

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a capacidade emulsificante e a estabilidade, sendo que a característica de solubilidade pode influenciar a estabilidade. Apesar da proteína isolada de levedura apresentar alta atividade emulsificante, a estabilidade da emulsão tem sido menor.

#### **2.9.4 Propriedades espumantes**

A capacidade espumante consiste na habilidade das proteínas solúveis encapsularem bolhas de ar, por batimento, agitação ou aeração. As proteínas atuam como um soluto surfactante, formando membranas extendidas, que resistem até certo grau de desnaturação, diminuindo a tensão superficial do líquido e facilitando sua deformação por expansão da área superficial (Kinsella, 1976).

A capacidade de formar espumas estáveis é uma propriedade funcional importante das proteínas para aplicação em cobertura de bolos, sorvetes, coberturas aeradas, merengues, suflês e uma variedade de produtos de confeitaria ( Gassmann et alii, 1987).

Estudos sugerem que existe um paralelo entre o comportamento espumante da proteína e sua capacidade em diminuir a tensão superficial rapidamente, esta tendência relaciona-se com o tempo gasto para cada proteína atingir a interface, adsorver-se desenrolar-se, formando um filme fino de proteínas. Associações subsequentes serão realizadas com outras proteínas, que irão se adsorver e inserir no filme pré-existente. Isso requer proteínas com tendência a ligar-se a superfícies hidrofóbicas, sendo clara a correlação existente entre a superfície hidrofóbica disponível em várias proteínas e sua habilidade em produzir espumas (German et alii, 1985).

Não tem sido encontrada uma correspondência entre as condições que proporcionam uma melhor capacidade espumante e sua estabilidade. Vários fatores afetam as propriedades de formação e estabilidade da espuma, como a concentração de proteína, equipamento de aeração, pH, presença de sais, açúcares e lipídios. Tanto o volume como a estabilidade da espuma se elevam com o aumento da concentração de proteínas, resultando numa espuma mais homogênea, mais densa e geralmente de maior estabilidade devido à maior espessura do filme interfacial (Halling, 1981).

O método de extração da proteína de células de levedura rompidas influenciou a capacidade de formar espuma das proteínas, devido ao grau de desnaturação ocasionado pelo tratamento. O isolado protéico de levedura obtido por extração com água e precipitação no pH 4, apresentou um volume de expansão da espuma superior ao isolado protéico de soja, usado como referencial. A preparação de levedura obtida por extração com água e precipitação em pH 6 por aquecimento a 80°C, apresentou os menores valores de expansão da espuma (Beuchat, 1977).

No experimento com a levedura *Candida utilis*, Gierhart e Potter (1978), não encontraram uma correlação entre as propriedades espumantes e a solubilidade da proteína. Os resultados obtidos com as amostras de levedura foram comparáveis ao da farinha de soja, tanto no volume de espuma como na estabilidade. Contraditoriamente, Schachtel (1981<sub>b</sub>), encontrou uma boa correlação entre a porcentagem do volume de espuma e a solubilidade da proteína, mas não entre a estabilidade da espuma e a solubilidade. Observou ainda vários fatores que apresentaram efeito prejudicial nas preparações de levedura como, secagem em "spray-drier", choque térmico, homogeneização da amostra e precipitação ácida.

Proteínas de levedura fosforiladas ( $\text{POCl}_3$ ) tiveram sua capacidade espumante (força e estabilidade) avaliadas pelo método de aeração e comparadas à proteína de soro bovino e nucleoproteínas. A estabilidade da espuma foi melhorada com o aumento da concentração da proteína fosforilada e para todos os valores de pH medidos, sendo a

estabilidade diretamente proporcional ao aumento da concentração da proteína utilizada no preparo das dispersões (Huang e Kinsella, 1987).

A proteína de soja modificada com trimetafosfato de sódio (3%) apresentou uma melhora das propriedades espumantes, com resultados semelhantes à proteína que foi modificada por succinilação (Sung et alii, 1983). Proteínas succiniladas apresentam maior estabilidade de espuma comparadas à proteína nativa; provavelmente por carregarem cargas negativas nas proteínas adsorvidas no filme interfacial, causando repulsão eletrostática entre as bolhas (Gueguen et alii, 1990).

Existem dificuldades em fazer uma comparação entre a capacidade espumante de diferentes proteínas. Os métodos de avaliação mais utilizados são batimento, agitação ou insuflamento de ar. No entanto, vários autores consideram o processo de batimento para formação de espuma o mais adequado ao estudo desta propriedade, pois imita com maior fidelidade o processo industrial. As maiores fontes de variabilidade nestas determinações são a hidratação e dispersão efetiva da proteína e o modelo e velocidade do misturador (Halling, 1981; Phillips et alii, 1987; Phillips et alii, 1990).

#### **2.9.5 Geleificação**

Géis de proteína podem ser definidos como interações entre polímeros-polímeros ou polímeros-solvente, que ocorrem de maneira ordenada resultando na imobilização de uma grande parte de água por pequena quantidade de proteína. Geralmente os géis possuem alta viscosidade, plasticidade e elasticidade, como exemplos tem-se a clara de ovo coagulada pelo calor, tofu de soja, gelatina e caseína de leite coagulada entre outros (Morrissey et alii, 1987).

O passo inicial do processo de geleificação de proteínas globulares pelo calor é o aquecimento da solução de proteína acima da temperatura de desnaturação. A importância do processo de desnaturação é expor os grupos funcionais dos aminoácidos, os quais, sob condições apropriadas, interagem para formar uma rede

tridimensional. A natureza da rede é fortemente influenciada por forças eletrostáticas, sendo sua estrutura dependente não somente da concentração crítica da proteína, como do pH, presença e tipo de sal (Armstrong et alii, 1994).

Os géis podem ser classificados como termo-reversíveis e termoplásticos (termo-irreversíveis). Géis de proteína de soja e gelatina são transformados em condição pró-gel no aquecimento, passando a gel no resfriamento, que pode ser revertido ao estado de pró-gel com subsequente aquecimento, sugerindo que o passo de agregação é termo-reversível. Géis termo-plásticos tais como géis de proteína de trigo e hemoglobina, uma vez formados não revertem ao estado pró-gel se submetidos ao aquecimento, podendo no entanto se tornarem macios ou se encolher. As forças de ligações predominantes são diferentes de acordo com o tipo do gel. Nos géis termo-reversíveis a estrutura é estabelecida basicamente por pontes de hidrogênio, as quais se rompem facilmente no aquecimento. Já os géis irreversíveis são formados por ligações dissulfídicas (Oakenfull, 1987).

Vários fatores interferem na firmeza do gel, geralmente o aumento de concentração provoca um aumento espontâneo da viscosidade e conseqüentemente ocorre a formação de géis mais firmes. Substâncias redutoras como mercaptoetanol ou cisteína em baixas concentrações inibem a geleificação, indicando que as ligações dissulfídicas são importantes neste processo. Sob condições de temperatura excessiva, ocorre uma mudança muito grande na estrutura da proteína, impossibilitando sua agregação. Geralmente o uso de cloreto de sódio tem influência negativa na firmeza do gel e outros componentes do sistema alimentar, como fosfolípidios e colesterol, intensificam o poder de geleificação das proteínas (Snyder e Know, 1987).

O efeito da adição de tripolifosfato de sódio (0,5%) na firmeza dos géis de plasma bovino, utilizados para incorporação em produtos cárneos, foi positiva em pH 5,6, sendo atribuída ao aumento da capacidade de retenção de água (Knipe e Frye, 1990). De um modo geral, fosforilação de proteínas com  $\text{POCl}_3$  melhora as

propriedades de formação de géis em várias proteínas (caseína, gluten,  $\beta$ -lactoalbuminas), principalmente na presença de cálcio (Matheis et alii, 1983, Woo and Richardson, 1983). Isolado proteico de soja fosforilado com  $\text{POCl}_3$  em condição alcalina, apresentou habilidade em formar gel na concentração de 12%, na faixa de pH variando de 4,5 a 6,5. A força do gel foi a mesma nesta faixa de pH, sendo que o isolado protéico comercial de soja formou gel fraco apenas em pH 5,5. A proteína de soja não fosforilada perdeu sua capacidade de formação de gel após a liofilização (Hirotsuka et alii, 1984).

### 2.9.6 Viscosidade

A viscosidade de um fluido revela sua resistência ao deslizamento quando submetido a ação de forças externas, sendo o conhecimento das propriedades reológicas dos alimentos fluidos e semi-sólidos importantes para o delineamento dos processos industriais de fluxo (bombeamento, aquecimento, resfriamento, "spray-drying"), para o controle de qualidade e para avaliação da estabilidade no armazenamento, no processamento e na compreensão da designação subjetiva dos atributos de textura dos alimentos (Barbosa-Cánovas et alii, 1993).

As soluções, dispersões, emulsões, pastas e géis da maioria das moléculas hidrofílicas, como as proteínas, se comportam como fluidos não-newtonianos do tipo pseudopláticos, porque seu coeficiente de viscosidade decresce quanto a taxa de deformação aumenta. Na maioria dos casos a viscosidade de dispersões de proteína resulta num aumento exponencial com o aumento da concentração da proteína (Cheftel et alii, 1989).

A viscosidade aparente de várias preparações de levedura *Candida utilis* foi medida por Gierhart e Potter (1978), utilizando 15,20 e 25% de concentração. Na maioria dos casos, os tratamentos utilizados para redução do RNA, aumentaram a viscosidade. As amostras tratadas com ribonucleases exógenas tiveram sua

viscosidade duplicada em relação ao controle e as preparações obtidas por tratamento alcalino apresentaram significativo acréscimo na viscosidade.

Concentrado protéico extraído de levedura *Torula* foi utilizado por Huang e Rha (1978a) para estudos reológicos. O comportamento do concentrado foi estudado a várias concentrações, num amplo grau de deformação. Entre as amostras de proteína tratadas com álcali (pH 9), as dispersões contendo 20% de concentrado protéico apresentaram maior habilidade em formar fios (através de extrusão), com uma viscosidade moderadamente elevada. A adição de carboximetil celulose (CMC) ou carragena, contribuíram para elevar tanto a viscosidade como a formação de fios. Em estudos posteriores, Huang e Rha (1978b) encontraram que todas as concentrações de hidrocolóides testadas melhoram a habilidade de formar fios em relação ao controle. Nas condições experimentais, as concentrações de 1,3 a 2,0% de CMC foram as melhores, indicando que houve um reforço das ligações entre o sistema proteína/hidrocolóide.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Matéria-prima

Levedura *Saccharomyces carlsbergensis* na forma de células frescas em suspensão aquosa, devidamente limpa e desamargada, procedentes da indústria cervejeira.

##### 3.1.1 Ruptura mecânica das paredes celulares e otimização do processo de rompimento

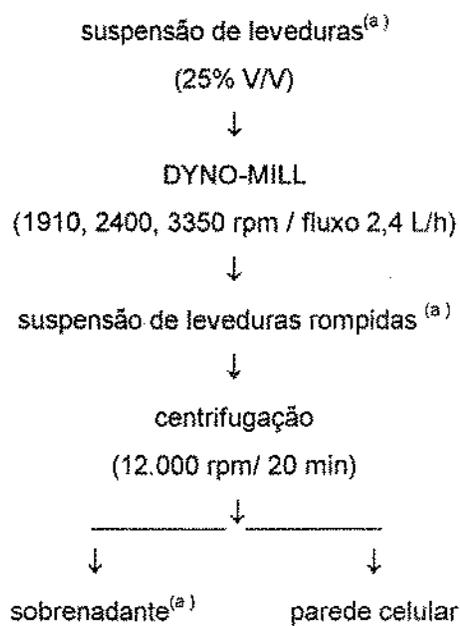
As células de levedura tiveram sua parede rompida no moinho Dyno-mill tipo KDL-PILOT, com 70% da câmara preenchida com esferas de vidro de diâmetro entre 0,6 a 1,0 mm (Hedenskog e Mogren , 1973).

A otimização do processo de ruptura foi avaliada pela quantidade de proteína solúvel extravasada das células rompidas, onde as variáveis estudadas foram: concentração de sólidos na suspensão de levedura, fluxo de alimentação do sistema, velocidade rotacional do equipamento, número de passagens para recirculação da matéria-prima. A temperatura do equipamento foi mantida em 15°C, através da circulação de um líquido resfriante (água/etilenoglicol), pela camisa dupla existente ao redor da câmara do moinho.

Numa primeira etapa utilizou-se uma suspensão de levedura com 25% (V/V) de células frescas em água, com ajustado para o pH 8 com o auxílio de uma solução de carbonato de sódio 10% e fluxo de alimentação de 2,4 L/h. Nestas condições foram testadas 3 velocidades de moagem: 1910, 2400 e 3350 rpm, recirculando a suspensão por 2 e 3 vezes. Na segunda etapa foi fixada a velocidade e variou-se o fluxo de alimentação e o conteúdo de sólidos na suspensão (25 e 40%). A eficiência do monitoramento foi determinada pela dosagem de nitrogênio na suspensão inicial e após cada circulação a dosagem de nitrogênio no sobrenadante da suspensão rompida

e centrifugada. O fluxograma de rompimento e monitoramento da eficiência do processo é mostrado na Figura 1.

### 1ª etapa



### 2ª etapa

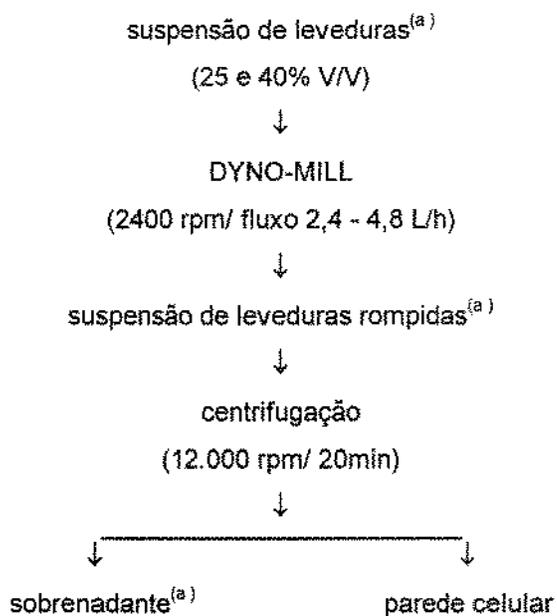


Figura 1. Fluxograma do processo de otimização do rompimento celular.

<sup>(a)</sup>determinação de Kjeldahl e teor de sólidos.

### 3.1.2 Extração da proteína a partir de células rompidas

O fluxograma da Figura 2 mostra as operações de obtenção do concentrado protéico (CP) de levedura sem modificação química ou enzimática. Na Figura 3 temos o fluxograma com os procedimentos adotados para a obtenção de concentrado de proteína tratada com solução 0,5M de  $\text{NaClO}_4$  e TMFS 3%. Os ajustes de pH foram feitos com NaOH (0,1 - 1N) ou HCl (0,1 - 1M) e a agitação em agitador magnético.

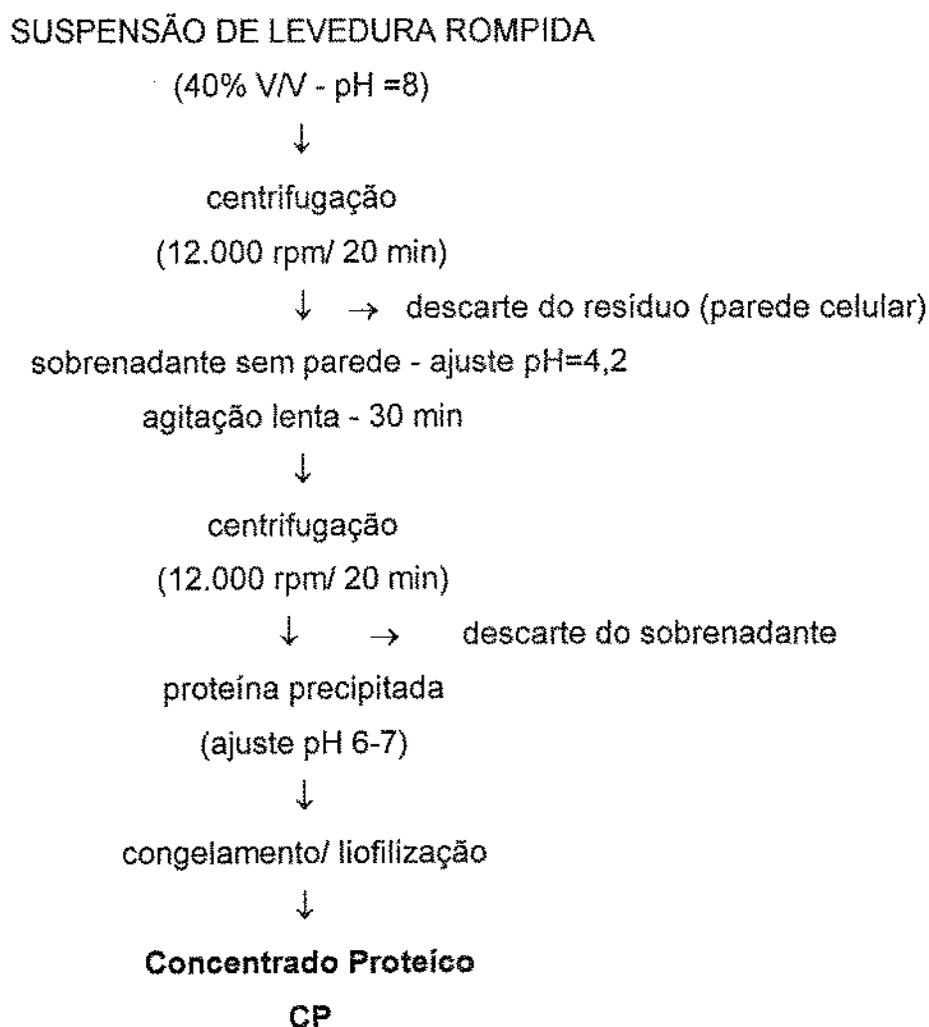


Figura 2. Fluxograma de obtenção do concentrado protéico de levedura sem modificação.

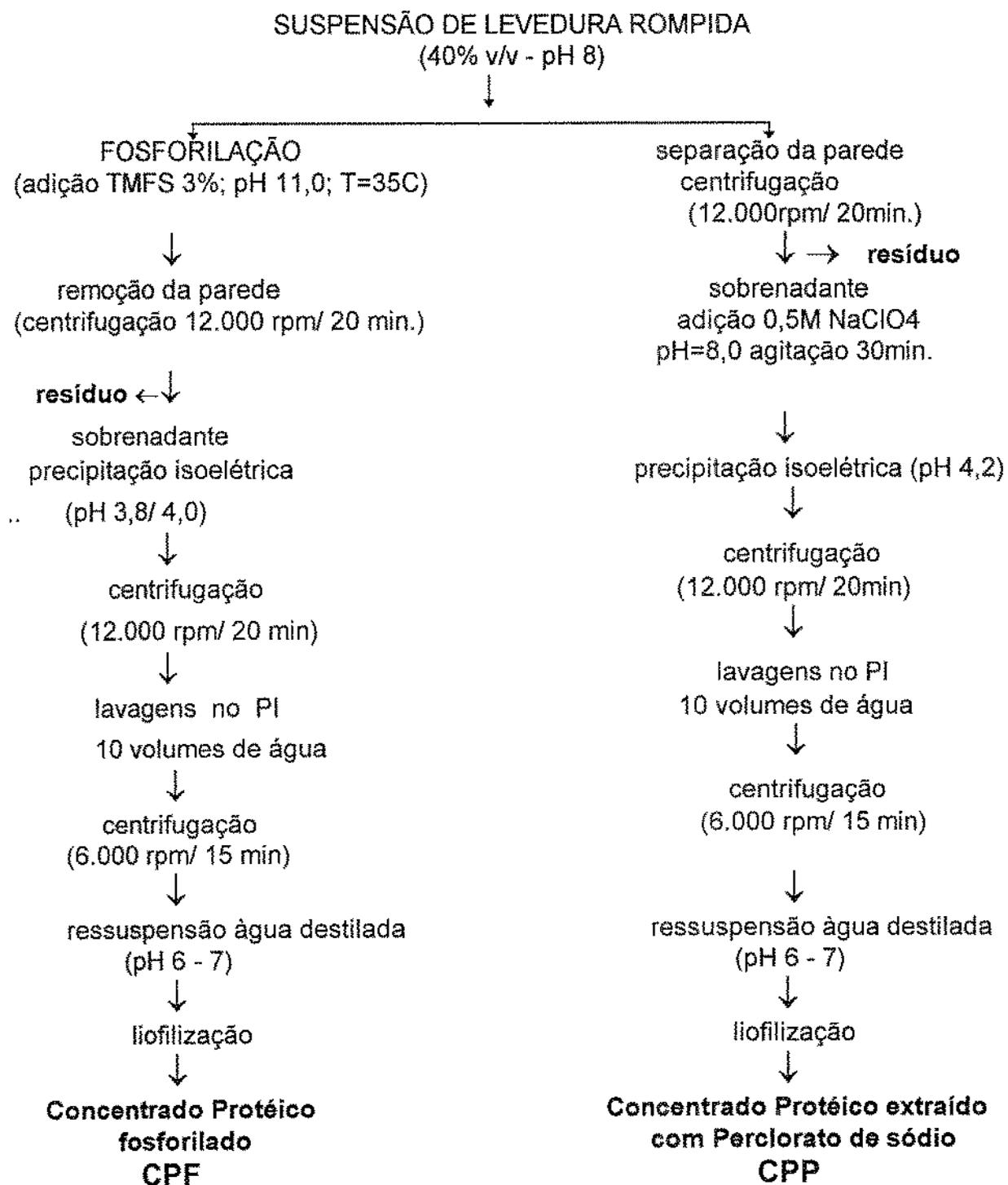


Figura 3. Fluxograma do método de extração da proteína de levedura com perclorato ou trimetafosfato de sódio.

## **3.2 Métodos analíticos**

### **3.2.1 Composição centesimal**

Proteína total, fibra bruta, umidade e cinzas: de acordo com os procedimentos da AOAC (1975). Carboidratos totais: método colorimétrico, usando o reagente fenol-sulfúrico, segundo Dubois *et alii* (1958). Lipídios totais: determinação gravimétrica dos lipídios extraídos com uma mistura de solventes, conforme descrito por Bligh e Dyer (1959).

### **3.2.2 Ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos, que em leveduras consistem principalmente de RNA, foram determinados pela metodologia descrita por Hebert *et alii* (1971). O RNA foi extraído das amostras com ácido perclórico (0,5M) à temperatura de 37°C por 2 horas. Posteriormente foi hidrolisado na presença de ácido perclórico (0,5M) à temperatura de 100°C por 15 minutos, onde ocorreu a liberação da ribose, que numa etapa posterior foi complexada com o reagente de orcinol, resultando numa coloração esverdeada. A concentração de RNA da amostra foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 670 nm e a leitura obtida foi comparada à curva padrão elaborada com RNA de levedura purificado (Sigma).

### **3.2.3 Composição em minerais**

#### **Preparo das amostras**

Amostras liofilizadas de levedura íntegra de *Saccharomyces carlsbergensis*, concentrado protéico fosforilado e concentrado protéico fosforilado dialisado, pesando entre 2,5 a 3,0 gramas, foram tomados para as análises. A amostra CPF foi dialisada contra 0,01M de EDTA (etilenodiaminotetracetato) por 96 horas, para retirar os metais que não se apresentassem ligados a proteína. A diálise foi monitorada através de

medidas condutivimétricas das águas de diálise após cada troca, onde o ponto final foi determinado pela estabilidade dos valores condutivimétricos.

Todas as amostras foram inicialmente carbonizadas e deixadas na mufla a 450°C, por vários dias, até ficarem totalmente brancas e ausentes de carvões. A seguir foram dissolvidas em ácido nítrico 5% e alíquotas injetadas no espectrômetro de emissão atômica por plasma de argônio acoplado em equipamento BAIRD ICP 2000 versão simultânea.

#### **Condições de operação do equipamento**

- Gerador de rádio frequência: 40,68 MHz
- Nebulizador pneumático concêntrico
- Fluxo de entrada de amostra a ser nebulizada: 4 mL/min.
- Fluxo de gás de refrigeração: 70 mL/ min.
- Posição da tocha horizontal: 9mm
- Posição da tocha vertical: 9,8 mm
- Potência aplicada: 100W

#### **Procedimento analítico**

A quantificação dos minerais foi realizada através de curva padrão, construída pela dissolução de 100 µg/mL do padrão analítico BAIRD (solução #2) em ácido nítrico 5%.

#### **3.2.4 Composição em aminoácidos**

Para quantificação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N a 110°C por 22 horas, com exceção do triptofano, para o qual se utilizou hidrólise com LiOH 4N por 24 horas à mesma temperatura. As análises de aminoácidos foram

realizadas no Laboratório de Química de Proteínas de Ribeirão Preto (USP), num autoanalisador com coluna de troca iônica e derivatização pós-coluna com ninidrina.

### 3.2.5 Grau de fosforilação

A fosforilação foi conduzida pela adição de 3% de trimetafosfato de sódio à suspensão de células rompidas, na temperatura de 35°C, pH fortemente alcalino (10/11), durante 3 horas, tempo suficiente para que ocorresse uma fosforilação de 35% dos resíduos serina. À medida que o resíduo serina na proteína é fosforilado, forma-se simultaneamente quantidade equimolar de pirofosfato. Portanto, a taxa de fosforilação pode ser expressa estequiometricamente pela quantidade de pirofosfato formada e o total de resíduos de serina presentes na alíquota da amostra utilizada na mistura de reação.

A determinação do grau de fosforilação baseia-se na dosagem de pirofosfato formado durante a reação, conforme a metodologia de Flaschka *et alii* (1969). Consiste em precipitar a proteína fosforilada do sobrenadante com ácido tricloroacético (TCA 10%) e a seguir promover uma complexação do pirofosfato solúvel remanescente, com acetato de zinco. Como a reação pirofosfato-zinco é estequiométrica, a quantidade de pirofosfato é calculada através da titulação do zinco com etilenodiaminotetracetato (EDTA).

$$GF = \frac{\text{miligramas Zn}}{\text{Conteúdo de Serina na Amostra (mg)}} \times 100$$

onde

GF = grau de fosforilação

### 3.2.6 Eletroforese

As amostras CP e CPF foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em meio alcalino (pH 8,3), de acordo com o procedimento descrito por

Davis(1964). Utilizou-se gel de poliacrilamida contendo SDS na concentração de 12% (Laemmli, 1970), uma fonte com 20 mA e aproximadamente 80 volts. Após o término da corrida, as proteínas foram fixadas e coradas com uma solução contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético e 0,25% de coomassie brilliant blue R-250.

A determinação dos pesos moleculares aproximados dos polipeptídeos das amostras foi realizada através da construção do gráfico do logaritmo do peso molecular de padrões pelo respectivo deslocamento relativo no gel (Weber & Osborn, 1969). Os padrões de peso molecular utilizados nas mesmas condições da amostra foram:

Albumina bovina = 66.000; albumina de ovo = 45.000; gliceraldeído 3-P-desidrogenase = 36.000; anidrase carbônica = 29.000; tripsinogênio = 24.000; inibidor de tripsina = 20.000 daltons (Sigma).

### 3.2.7 Complexação das proteínas com íons cálcio

Para medidas de cálcio foi utilizado o eletrodo de membrana íon-seletiva Orion 93-20, acoplado a um eletrodo de referência de simples junção modelo 90-01. Os eletrodos foram conectados a um medidor específico de leituras iônicas (modelo EA-920); com saída para eletrodo de pH e temperatura. O cálcio ligado foi obtido pela diferença entre a concentração de cálcio inicial (branco) e o cálcio livre na presença de proteína. As medidas foram feitas em dispersões de concentrado protéico 0,5 e 1% (p/v) em solução de KCl 20 mM, nos pHs variando de 5 a 8 e concentração de cálcio entre  $10^{-5}$  a  $10^{-1}$ .

O efeito da concentração de íons, na ligação pela proteína está sujeito a tratamento quantitativo, que pode ser demonstrado matematicamente (Edsall e Wyman, 1958). Considerando que a proteína (P) possui vários sítios capazes de fixar um ânion (A), pode-se idealizar para o íon mais simples, que todos os (n) sítios de P são equivalentes e independentes. Para o caso especial de  $n=1$ , a reação provável será:



e a constante de associação K é dada por:

$$k = \frac{[PA]}{[P][A]} \quad (2)$$

considerando todas as moléculas de P e PA em solução, pode-se expressar a fração de sítios ligantes de P, que estão vazios, por  $\alpha$ , da seguinte forma:

$$\alpha = \frac{[P]}{[PA]+[P]} = \frac{k}{[A]+k} = \frac{1}{1+k[A]} \quad (3)$$

O número médio de moles de A ligados, para todas as moléculas P e PA, será

$$\bar{v} = 1 - \alpha \quad \text{ou} \quad \bar{v} = \frac{k[A]}{1+k[A]} \quad (4)$$

onde  $v$  pode também representar a probabilidade que qualquer molécula P da solução, tomada aleatoriamente, esteja acoplada ao ligante A.

Se P, ao invés de conter apenas um sítio capaz de ligar A, apresentar n sítios equivalentes e independentes, pode-se generalizar as equações anteriores.

Denotando  $PA_i$ , como uma molécula P que contém uma molécula de A ligada, no sítio i, então a constante de associação para formação de  $PA_i$ , a partir de P e A será:

$$k_i = \frac{[PA_i]}{[P][A]} \quad (5)$$

Portanto a equação (4) assumiria a forma:

$$\bar{v}_i = 1 - \alpha_i = \frac{k_i[A]}{1+k_i[A]} \quad (6)$$

Pelas hipóteses consideradas, todos os n sítios, não apenas são independentes, como também equivalentes. Desta forma, todos os valores de k são os mesmos para todas as posições de qualquer molécula P, logo, pode-se dispensar o índice i.

Se  $\bar{v} = \sum \bar{v}_i = n\bar{v}_i$  é o número médio total de sítios ocupados por molécula

de P, então, a probabilidade que algum sítio, escolhido ao acaso esteja ocupado por A será:

$$1 - \alpha = \frac{\bar{v}}{n} = \frac{k[A]}{1 + k[A]} \quad (7)$$

ou rearranjando,

$$\bar{v} = \frac{nk[A]}{1 + k[A]} \quad (8)$$

Na realidade, a equação (8) representa uma aproximação, uma vez que, as macromoléculas em geral, contém mais de um conjunto de sítios. Considerando que existam m diferentes conjuntos de sítios, o primeiro com  $n_1$  grupos independentes e equivalentes, com constante de associação  $k_1$ , o segundo com  $n_2$  grupos e constante  $k_2$ , etc... O número total de sítios de ligação n pode ser representado como:

$$n = n_1 + n_2 + \dots + n_m = \sum_{i=1}^m n_i \quad (9)$$

e o número médio de sítios ocupados pela molécula A será:

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i [A]}{1 + k_i [A]} \quad (10)$$

tanto a equação (8) como a equação (10) não levam em consideração interações entre sítios.

Dividindo ambos os lados da equação (10) por [A] e tomando o limite para [A] tendendo a zero tem-se:

$$\lim_{[A] \rightarrow 0} \frac{\bar{v}}{[A]} = \sum_{i=1}^m n_i k_i \quad (11)$$

Por outro lado se a concentração de A tende para infinito, tem-se:

$$\lim_{[A] \rightarrow \infty} \bar{v} = \sum_{i=1}^m n_i = n \quad (12)$$

Para a interpretação de dados experimentais é conveniente reescrever a equação (8), através de algumas transformações matemáticas simples, como segue:

$$\frac{\bar{v}}{[A]} = k(n - \bar{v}) \quad (13)$$

A vantagem desta expressão é que graficando  $\bar{v}/[A]$  versus  $\bar{v}$ , obtém-se uma reta, cuja inclinação fornece a constante de associação  $k$  e o termo independente  $n$ , o número total de sítios. Essa representação é conhecida como gráfico de Scatchard.

### 3.3 Propriedades funcionais

#### 3.3.1 Solubilidade

A solubilidade (S.P.) da proteína foi determinada pelo método de Morr *et alii* (1985), que é uma modificação do procedimento do índice de solubilidade do nitrogênio. A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela equação:

$$S. P. (\%) = \frac{\text{concentrado da proteína sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso amostra (mg)} \times \frac{\text{conteudo proteína amostra (\%)}}{100}} \times 100$$

A solubilidade dos concentrados CP, CPP e CPF foi avaliada na faixa de pH de 2 a 12, em solução aquosa e salina 0,1M e 1,0M, sendo os pHs ajustados com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. As suspensões foram deixadas em agitação por uma hora a

temperatura ambiente e a proteína solúvel no sobrenadante após centrifugação, determinada pelo método de Kjeldhal.

### 3.3.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de reter água dos concentrados protéicos obtidos por precipitação isoeletrica (CP), extração com perclorato (CPP) e fosforilação da proteína (CPF) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Regenstein *et alii* (1979). As dispersões tiveram o pH ajustados para diferentes valores com NaOH ou HCl 0,1N a 1N e o volume aferido, no final, para resultar em dispersões com 1% de proteína. Após agitação por 1 hora à temperatura ambiente, alíquotas de 30 mL foram centrifugadas a 30.000G por 15 minutos à temperatura de 5°C. A seguir o sobrenadante da cada amostra foi reservado, e a fração precipitada recolhida para as determinações de umidade e conteúdo de proteína (AOCS, 1975). A capacidade de retenção de água é dada pela equação:

$$CRA = \frac{\text{Peso hidratado} - \text{Peso original}}{\text{Peso da amostra}}$$

### 3.3.3 Geleificação

Inicialmente foram preparadas dispersões da amostra CPF em diferentes concentrações, para determinar a concentração mínima de proteína onde ocorre geleificação, conforme metodologia de Sathe e Salunke (1981), com algumas modificações. Dispersões de 2, 4, 6, 8, 10% foram preparadas em 10mL de tampão fosfato 20 mM e colocadas em tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos por 1 hora a temperatura de 90°C, resfriados rapidamente, e mantidos por 2 horas a 4°C. A menor concentração de geleificação foi aquela onde os tubos foram invertidos e as amostras não caíram ou deslízaram pelas paredes do tubo.

## **Textura dos géis**

As medidas de textura dos géis foram realizadas pelo método de compressão, usando o analisador de textura TA - XT2. Os parâmetros de dureza, fracturabilidade e adesividade determinados neste estudo corresponderam ao pico de força durante a primeira compressão (programa "return to start").

A fracturabilidade, de acordo com Bourne (1978), corresponde à resistência oferecida pelo gel até o momento de ruptura, a dureza corresponde à resistência do gel à compressão a uma dada profundidade e a adesividade representa o trabalho necessário para remover a sonda compressora da amostra após a compressão. O diâmetro da sonda foi de 1 polegada, a velocidade de 1 mm/min., em temperatura ambiente, realizando 50% de compressão. Foi escolhida a concentração de 10% para realizar as medidas de força do gel das amostras CP, CPP, CPF e isolado protéico de soja. Os géis para análise de textura foram preparados em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0; em diferentes concentrações de sais NaCl (0,1; 0,4 e 0,6M) e CaCl<sub>2</sub> (5, 10 e 30mM).

As dispersões foram pré-aquecidas por aproximadamente 3 minutos a temperatura de 40°C, colocadas em tubos com diâmetro de 11 mm e desaeradas por centrifugação a 400G por 10 minutos na temperatura de 20°C. A seguir os tubos foram colocados em banho de água a 90°C por 30 minutos, resfriados e deixados por 20 horas a 4°C. Os géis foram cortados em amostras de 1cm de altura para as determinações no texturômetro, e comprimidos em 50% de sua altura original.

### **3.3.4 Viscosidade**

Estudo comparativo da viscosidade aparente de suspensões de proteína CP, CPP e CPF a 3%, foi realizado usando reômetro rotacional de cilindros concêntricos, RHEOMAT 115, com rotações variáveis do cilindro, fornecendo uma taxa de deformação até 3000 s<sup>-1</sup>. As amostras ficaram em agitação por 30 minutos para

homogeneização antes de realizar as medidas e a viscosidade foi realizada em temperatura de 20°C, controladas por um banho de água circundante termostaticada.

O reômetro rotacional permite medidas da velocidade angular do cilindro rotacional e do torque correspondente, que são utilizados para fornecer a curva de comportamento para o material sob cisalhamento. A viscosidade aparente  $\eta$  é calculada por:

$$\eta = \frac{\tau}{D} \quad (14)$$

onde,

$\tau$  = tensão de cisalhamento (mPa.s)

$D$  = taxa de deformação, indicada para cada passo da velocidade ( $s^{-1}$ ).

Os dados experimentais foram analisados pela fórmula da Lei da potência ou Ostwald de Waele, isto é,

$$\tau = K.D^n \quad (15)$$

onde:

$K$  = coeficiente de consistência,

$n$  = índice do comportamento de fluxo, onde :

$n=1$ , para fluidos Newtoniano.

$n < 1$ , para fluidos Pseudoplástico.

$n > 1$ , para fluidos dilatante.

Os valores de K e n foram obtidos pelo gráfico da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação em escala logarítmica, onde K é dado pela intersessão da curva no eixo Y e n pela inclinação da reta. Tomando-se o logaritmo de ambos os lados da equação 18 obtem-se:

$$\log \tau = \log K + n.\log D \quad (16)$$

A viscosidade foi avaliada em função da concentração, temperatura, pH e taxa de deformação.

### 3.3.5 Propriedades emulsificantes

As propriedades emulsificantes foram avaliadas pelo índice de atividade emulsificante (IAE), capacidade emulsificante (CE) e estabilidade da emulsão (EE). Todas as emulsões para estudo foram preparadas no agitador Ultra-Turrax (TP 18/1052). As determinações realizadas nas amostras de concentrados protéicos de levedura foram comparadas ao Isolado protéico de soja comercial (SANPROY 90NB) contendo 90,97% de proteína.

#### Capacidade emulsificante

É definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa para um dado procedimento experimental. Nesta análise foi utilizado o procedimento descrito por De Kanterewicz *et alii* (1987).

Dispersões de proteína e óleo foram combinadas em diferentes proporções mantendo o volume total igual a 50 mL, até encontrar o ponto onde ocorre colapso da emulsão. Toma-se a proporção, dispersão/solução, anterior ao ponto de colapso e através de uma bureta adiciona-se volumes de 1mL de óleo, até causar a quebra da emulsão, visualizada pela mudança de coloração e separação das fases.

As emulsões foram agitadas à velocidade de 10.000 rpm, por um tempo de três minutos, antes de se adicionar os incrementos de 1mL de óleo, sendo a emulsão

mantida em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra. A capacidade de emulsificação é expressa em porcentagem e definida como mL de óleo adicionado até alcançar o ponto de inversão por g de proteína.

### **Índice de Atividade Emulsificante**

Foi determinado pelo método de Pearce e Kinsella (1978), seguindo as modificações de Mine *et alii* (1991).

As emulsões foram preparadas com 10 mL de óleo de soja refinado de uso comercial, dispersos em 30 mL de solução de proteína com agitação de 20.000 rpm por 60 seg à temperatura ambiente. Uma amostra de 25 microlitros da emulsão foi diluída em 50 mL de solução 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A absorvância da emulsão diluída foi medida a 500 nm.

O índice de atividade emulsificante (IAE) foi determinado pela seguinte equação:

$$IAE = \frac{2T}{\Phi \cdot C} \quad \text{onde,}$$

C = concentração da proteína

$\Phi$  = 0,25 (fração de volume da fase aquosa)

T (turbidez) = ( 2,303 x A / l)

A = absorvância

l = distância percorrida pela luz na cubeta (1cm)

### **Estabilidade da Emulsão**

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Acton e Safle (1970) com algumas adaptações às condições do laboratório. As emulsões foram feitas com 50 mL de óleo de soja e 50 mL de dispersões de proteína a 1%, que foram homogeneizadas a 10.000 rpm por 3 minutos em banho de gelo. Alíquotas de 10 mL foram colocados em tubos de ensaio e deixadas por 24 horas à temperatura ambiente

(22°C ±2). Comparativamente foram feitas as modificações propostas por MacElwain et alii(1975), onde o tempo de estocagem de 24 horas foi reduzido para 2 horas à temperatura de 37°C. A seguir foram retirados volumes de 5 mL para a determinação da umidade e a estabilidade da emulsão (EE) foi calculada de acordo com a equação:

$$EE = \frac{100 - U^{24 \text{ horas}}}{100 - U^{\text{original}}} \times 100$$

onde:

$U^{24 \text{ horas}}$  = porcentagem de umidade após 24 horas;

$U^{\text{original}}$  = porcentagem de umidade da emulsão recém-preparada.

### 3.3.6 Propriedades Espumantes

As propriedades espumantes foram medidas pelo método descrito por Mohanty et alii (1988), onde dispersões de proteína (0,25 a 1,5%) foram agitadas em bate-deira Walita, na velocidade máxima (970 rpm) por um período de 5 minutos. A espuma formada foi imediatamente transferida para provetas de 500 mL e o volume inicial de espuma ( $V_0$ ) foi registrado. A porcentagem de espuma formada ( $FE_s$ ) foi calculada pela equação:

$$FE_s = \frac{V_0 \text{ (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \times 100$$

#### Estabilidade da espuma

A espuma foi deixada por 60 minutos em proveta de 500 mL à temperatura ambiente e foram medidos, simultaneamente, o volume da coluna de espuma e o volume do líquido drenado com o decorrer do tempo.

O modelo empírico proposto por Elizalde et alii (1991<sub>b</sub>) foi utilizado para determinar o perfil de drenagem do soro de espuma para diferentes proteínas por se

ajustar perfeitamente aos dados experimentais. Por este modelo, o volume de líquido drenado em função do tempo é dado por

$$v(t) = \frac{V \cdot t}{(B + t)} \quad (17)$$

onde:

$v(t)$  = volume de líquido drenado no tempo  $t$ ;

$V$  = volume máximo de líquido drenado;

$B$  = tempo necessário para drenar  $V/2$  ( tempo de meia vida da espuma).

A taxa de drenagem do soro pode ser obtida derivando a equação (17) com respeito ao tempo.

$$\frac{dv}{dt} = \frac{(V - v)^2}{VB} \quad (18)$$

$(V - v)$  representa a quantidade de líquido que permanece na espuma;

$(VB)^{-1}$  representa a constante de drenagem  $K$ .

A taxa inicial de drenagem  $R_0$  pode ser obtida da equação (18), bastando para isso tomar  $v = 0$  para  $t = 0$ , assim:

$$R_0 = \left(\frac{dv}{dt}\right)_{t=0} = \frac{V}{B} \quad (19)$$

A estabilidade da espuma foi avaliada pela redução percentual do seu volume após 30 e 60 minutos em relação ao seu volume inicial, conforme descrito por Patel et alii (1988).

$$\%EE_s = \frac{\text{Volume da espuma apos 30 ou 60 min}}{\text{Volume inicial da espuma incluindo o volume do liquido}} \times 100$$

Avaliaram-se as propriedades espumantes das amostras de concentrados protéicos de levedura e como padrão de referência utilizou-se a albumina de ovo comercial (SOHOVOS). As propriedades do concentrado protéico fosforilado foram medidas em função da concentração, pH e força iônica (0,1 e 1,0M).

### **3.4 Avaliações nutricionais e toxicológicas**

#### **3.4.1 Determinações "in vitro"**

##### **Lisina disponível**

Para determinação da lisina disponível foi utilizada a metodologia descrita por Kakade e Liener (1969), na qual a lisina é determinada através da reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), um agente alquilante, dos grupos  $\epsilon$ -amino da lisina, resultando no derivado trinitrofenil (TNF-Lys) de coloração amarela. A quantificação do composto foi feita por espectrofotometria no comprimento de onda de 346 nm.

##### **Digestibilidade**

A digestibilidade foi determinada empregando-se um sistema enzimático composto por pepsina/pancreatina, conforme o procedimento de Akeson e Stahman (1964). Alíquotas de 0,5g de amostra foram incubadas inicialmente por 3 horas com pepsina (3 mg/ mL) em ácido clorídrico 0,1N, ficando o pH em torno de 1,5. A seguir, adicionou-se NaOH 0,1N para neutralização do pH e as amostras foram incubadas, sob agitação, por 24 horas, com pancreatina (4 mg/ mL) em tampão fosfato 0,1M, pH 8,0 e temperatura de 37°C sob agitação. Ao término de 24 horas, as proteínas não hidrolisadas foram precipitadas pela adição de ácido tricloracético (TCA 30%) e separadas por centrifugação. O volume do sobrenadante foi aferido para 50 mL e determinou-se o conteúdo de nitrogênio.

A digestibilidade foi calculada pela relação entre a diferença do nitrogênio contido no hidrolisado e no sistema enzimático (fornecido pelo branco), e a quantidade de nitrogênio total na amostra inicial.

$$\text{DIGESTIBILIDADE} = \frac{Nd - Nb}{Nt} \times 100$$

onde:

Nd= nitrogênio digerido;

Nb= nitrogênio do branco;

Nt= nitrogênio total.

### **Valor biológico calculado (VB-C)**

Esse valor foi calculado conforme o procedimento do "Índice de Aminoácidos Essenciais de Oser modificado" (Sheffner, 1967).

O índice utiliza os aminoácidos essenciais de ovo como padrão, sendo inicialmente calculado uma "razão-ovo", ou seja a proporção dos aminoácidos da proteína em questão em relação ao padrão. Os valores do padrão referência para os aminoácidos essenciais são: His= 2,6; Lys= 7,8; Met+ Cys= 5,3; Phe+ Tyr= 9,3; Leu= 8,8; Ile= 5,9; Val= 7,1; Thr= 4,9 e Trp= 1,4 g/16gN. Os valores derivados da razão-ovo que ultrapassam a 100, foram corrigidos para esse limite máximo, e a seguir calculou-se os logaritmos decimais. O índice de Oser modificado (VB-C) consiste no antilogaritmo da média aritmética destes valores.

### **Coefficiente de Utilização protéica líquida calculado (NPU- C)**

Uma vez determinado o valor biológico e a digestibilidade, o NPU- C, foi estimado de acordo com a expressão a seguir:

$$\text{NPU-C} = \frac{\text{VB-C} \times \text{D}}{100}$$

onde:

VB-C = valor biológico calculado;

D = digestibilidade "in vitro".

### 3.4.2 Determinações "in vivo"

A avaliação nutricional do concentrado protéico fosforilado (CPF) foi realizada com grupos de 7 ratos da linhagem Wistar recém-desmamados, pelo período de 30 dias. Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com alimentação e água à vontade. A temperatura ambiente foi mantida em 25°C e os períodos de claro/ escuro foram de 12 horas.

As dietas experimentais foram preparadas com proteína oriunda do concentrado protéico fosforilado e comparadas a dietas contendo proteína da levedura rompida ou proteína padrão caseína. Os grupos de animais permaneceram por 7 dias em adaptação às dietas experimentais, entrando em balanço metabólico a partir da segunda semana. Fezes e urina foram coletadas e feito o controle do consumo de dieta para os cálculos de dosagem de nitrogênio.

As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações do "American Institute of Nutrition"(1977) e a mistura vitamínica e mineral de acordo com a AIN 77 e AIN 93, respectivamente (Reeves et alii, 1993). Os índices determinados foram: valor biológico aparente (VBa), balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (Da), quociente de eficiência protéica (PER) e utilização líquida aparente da proteína (NPUa), conforme metodologia descrita por Sgarbieri (1987).

### **3.4.3 Avaliação toxicológica**

Transcorridos os 30 dias de ensaio biológico, foi feita a coleta de sangue dos animais, através de punção cardíaca, para análises bioquímicas. A avaliação toxicológica foi realizada através de análises séricas, onde foram determinados os seguintes índices: creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvico (TGP), uréia, ácido úrico, concentração de cálcio e fósforo. Para tal foram utilizados "Kits" de análises clínicas: LABTEST Sistema Diagnósticos Ltda (LABT BR) para determinações de ácido úrico; MERKOTEST nº 719014 (MERK) para as determinações de fósforo; MPR1A nº 1.497.430 (Boehringer Mannheim) para cálcio; e CELM (Cia Equipadora de Laboratórios Modernos) para as demais. O princípio das reações colorimétricas descritas a seguir encontra-se detalhado em Lima et alii (1985).

#### **Creatinina**

O método de dosagem foi baseado na reação da creatina com picrato alcalino em meio tamponado, após desproteinização com ácido pícrico, obtendo-se um cromóforo, com absorção máxima a 510 nm.

#### **Transaminases**

A atividade das transaminases foi determinada medindo-se a quantidade do oxalato (produzido pela TGO) ou de piruvato (produzido pela TGP), formados em condições padronizadas de pH e temperatura. Através da reação destes produtos formados com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), havendo formação de um composto colorido que é medido pela absorbância no comprimento de onda de 505 nm.

#### **Uréia**

A dosagem foi realizada por método colorimétrico enzimático para determinação de uréia no soro, onde a enzima urease atua especificamente sobre a uréia liberando amoníaco. O amoníaco, por sua vez, reage com fenilformiato de sódio, na presença de

hipoclorito, formando um complexo colorido, que absorve a 600 nm. A intensidade da coloração é diretamente proporcional ao conteúdo deste composto.

### **Ácido Úrico**

O método de dosagem baseia-se na coloração azul obtida pela ação redutora do ácido úrico sobre o reagente fosfotúngstico, em pH básico e presença de alantoína e  $\text{CO}_2$ . O azul de tungstênio formado absorve no comprimento de onda de 700 nm.

### **Determinações de cálcio e fósforo**

O princípio da metodologia usada na determinação do cálcio baseia-se na formação de um complexo violeta, resultante da complexação do cálcio com o cromógeno O-cresolftaleína-complexona, em condições alcalinas. A absorção máxima ocorre no comprimento de onda de 570 nm.

A determinação do fósforo foi realizada pela medida da absorbância do complexo colorido formado pela reação do fosfato inorgânico com o molibdato em meio ácido. A absorbância do complexo no ultra violeta (340 nm) é diretamente proporcional a concentração do fosfato inorgânico presente na amostra.

### **3.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo programa SANEST (Sistema de análise estatística), os resultados experimentais submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey ao nível de significância de 95% de confiabilidade (Gomes, 1982). Para a elaboração dos gráficos e ajustes das curvas (regressão linear e polinomial) utilizou-se o programa Excel 5.0 da Microsoft.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do processo de rompimento da parede celular

A otimização da ruptura celular foi considerada uma etapa de grande importância no processo de obtenção de proteínas de levedura, pois o grau de clivagem das células permite maior recuperação do material intracelular, refletindo conseqüentemente no rendimento em etapas posteriores.

Os resultados da determinação de matéria seca, nitrogênio total (N) e proteína da suspensão de células de leveduras rompidas em diferentes velocidades de rotação do moinho podem ser observados na Tabela 2. A suspensão com 25% de células frescas resultou num conteúdo de matéria seca variando entre 4,94 a 5,29%, sendo constatado que a primeira circulação da suspensão de levedura pelo equipamento era suficiente para romper a grande maioria das células, nas condições testadas. Durante a segunda e terceira circulação da suspensão no moinho houve uma ligeira redução de sólidos, provavelmente pela adesão de sólidos as paredes internas do equipamento e superfície das esferas.

Foi escolhida a velocidade de rotação de 2400 rpm pelo fato dela ser intermediária, uma vez que a velocidade não foi uma variável relevante no processo. A concentração de células na suspensão, passando de 25% para 40% (V/V), correspondeu à elevação de 3% de matéria seca, causando maior rendimento no rompimento da parede, provavelmente devido à maior abrasão entre as células e as esferas de vidro. Mesmo com o fluxo de alimentação dobrado de 2,4 para 4,8 L/h, o rendimento da extração de proteína foi alto, contribuindo para a redução do tempo do processo e manutenção de temperaturas mais baixas.

Tabela 2. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração de proteína da suspensão de células de levedura 25% (V/V), rompidas em diferentes velocidades e fluxo de 2,4 L/h.

Velocidade (rpm)	Rec*	Mat. Seca (%)	N total (%)	Proteína Bruta (%)	Rendimento Extração (%)
<b>1910</b>	0	5,06	8,08	50,31	
	1	5,29	6,48	40,50	80
	2	5,27	6,58	41,12	82
	3	5,08	6,59	41,18	82
<b>2400</b>	0	5,05	8,16	51,00	
	1	4,94	6,74	43,13	83
	2	4,81	6,74	42,13	83
	3	4,47	6,69	41,81	81
<b>3340</b>	0	5,22	8,13	50,81	
	1	5,14	6,62	41,38	81
	2	5,13	6,64	41,50	82
	3	5,00	6,71	41,94	83

\*Rec = número de passagens da suspensão de células de levedura pelo moinho.

Os resultados obtidos com 40% de células em suspensão, velocidade do moinho de 2400 rpm e com duas reciclagens no moinho estão na Tabela 3. Dentre os trabalhos com proteínas de organismos unicelulares que utilizam o rompimento celular com Dyno-mil, encontra-se o de Huang e Kinsella (1986<sub>a</sub>). Utilizando uma suspensão com 5% de sólidos secos e fluxo de 6 L/hora, eles obtiveram uma ruptura superior a 95% com uma única passagem pelo equipamento.

Tabela 3. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração da proteína nas suspensões de células de levedura (25% e 40%) rompidas na velocidade de 2400 rpm, com diferentes fluxos de alimentação (2,4 e 4,8 L/h).

Amostra	Rec.	Fluxo (L/h)	Mat. seca (%)	N total (%)	Proteína Bruta(%)	Rendimento (%)
	0	2,4	5,05	8,16	51,00	
SLI (25%)	1	2,4	4,94	6,74	42,13	83
	2	2,4	4,81	6,74	42,13	83
	0	4,8	5,42	7,69	48,05	
SLI (25%)	1	4,8	4,91	6,99	43,68	91
	2	4,8	4,85	7,40	46,25	96
	0	2,4	8,15	8,21	51,31	
SLI (40%)	1	2,4	7,86	7,48	46,75	91
	2	2,4	7,56	7,85	49,06	96
	0	4,8	8,56	8,38	52,35	
SLI (40%)	1	4,8	7,81	8,03	50,18	96
	2	4,8	7,56	8,18	51,13	97

SLI = Suspensão de levedura Integral; Rec. = número de passagens da suspensão de células pelo moinho.

Os resultados obtidos são concordantes com trabalhos citados na literatura, que operaram com diferentes equipamentos de ruptura mecânica como o Dynomühle, Perlmill e Mixer-mill, mas com o mesmo princípio de moagem. Rendimentos de extração de proteína superiores a 90% foram obtidos por Hummel e Kula (1989); Hedenskog e Ebbinghaus (1972), Farnum e Cleland (1975). Arriola et alli (1989) conseguiram 97% de ruptura das paredes de células de levedura empregando um desintegrador de

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

#### 4.2 Composição centesimal da levedura íntegra e dos vários concentrados protéicos obtidos

Apesar de muitos artigos trazerem experimentos com células de levedura, a maioria deles utiliza levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) ou tórula (*Candida utilis*). Poucos experimentos foram realizados com a levedura de cervejaria para fins nutricionais, talvez pelo fato da levedura utilizada no processo de fabricação de cerveja apresentarem um sabor muito amargo em consequência das resinas e taninos, provenientes do lúpulo, adsorvido na parede celular das leveduras durante a etapa de fermentação (Nand, 1987).

Os resultados de composição aproximada (b.s.) das células íntegras de *Saccharomyces carlsbergensis* são mostrados na Tabela 4, comparativamente aos obtidos por outros autores. A composição média dos valores citados por Guzmán-Juarez (1983) varia de acordo com o substrato utilizado no meio de cultura das células. Os resultados da Tabela 4 são compatíveis com os valores descritos por Roshkova et alii (1986), apresentando de 47 a 50% de proteína para o gênero *Saccharomyces* em geral, e inferior ao valor de 56,2%, encontrado por<sup>koivurinta et alii</sup> (1980) para a levedura de cerveja. Cabe ressaltar que Koivurinta et alii utilizaram o fator 6,25 para conversão do nitrogênio para proteína. Como as células de microrganismos apresentam, em geral, um alto teor de ácidos nucleicos, o nitrogênio total determinado por Kjeldahl inclui também o nitrogênio dos ácidos nucleicos. De acordo com Reed e Nagodawithana (1991), o uso do fator 6,25 superestima o valor da proteína de levedura (expresso pelo PER), propondo o fator de 5,5 para transformação de nitrogênio total em proteína.

Para a levedura utilizada neste trabalho chegou-se ao fator de 5,8 para conversão do nitrogênio total para proteína. Considerando que o teor de nitrogênio (N) nestas células varia de 8,5 a 8,9% da matéria seca, e deste total 14% correspondem ao

N não protéico proveniente do ácido ribonucléico, gera-se um acréscimo de 1,23 ao teor de nitrogênio protéico. Portanto, o teor de nitrogênio total consiste da soma de 1,23g, correspondentes ao N do RNA e de 16g do nitrogênio protéico, que divididos por 100g de amostra (100/17,23), resultam no fator de correção 5,8, para conversão do nitrogênio total em proteína verdadeira.

Tabela 4. Resultados da composição centesimal de levedura *S. carlsbergensis*, comparados com valores da literatura.

Componentes (%)	<i>S. carlsbergensis</i>	Lev. cerveja <sup>a</sup>	Levedura <sup>b</sup>
Proteína (N x 5,8)	48,51	49,80	45-49
RNA	7,52	8,40	8-12
Lipídeos	3,44	1,91	4-7
Cinzas	8,33	5,1	5-10
Carboidratos totais	32,86	nd	26-27
Fibra bruta	11,08	nd	nd

a = Famun e Cleland (1975); b = Guzmán-Juarez (1983); nd = não determinado.

A utilização de trimetafosfato de sódio a 3% e pH 11 resultou num grau de fosforilação de 35%, considerando-se o conteúdo de serina igual a 6,13g para 100g de proteína. A dissociação do RNA-proteína causada por esse grau de fosforilação foi de aproximadamente 50%, em relação às células íntegras, e 76%, em relação ao concentrado protéico, sem tratamento, precipitado no ponto isoelétrico (CP). Em estudos realizados com *Torula utilis*, utilizando o mesmo reagente (TMFS) em temperatura um pouco mais elevada (38°C), Giec et alli (1989) obtiveram um grau de fosforilação de 45% com redução de 60% do conteúdo de RNA.

A composição centesimal do concentrado protéico (CP), obtido de proteína precipitada no pH 4,2, de acordo com o fluxograma da Figura 2, é mostrada na Tabela 5. Observa-se que no concentrado houve um aumento da concentração de proteína (de 48,5 para 65,7%), um aumento do teor de RNA (de 7,5 para 15,5%) e uma redução nos

teores de carboidratos. Os valores encontrados foram semelhantes aos obtidos por Lyutskanov et alii (1990), que obtiveram 60-70% de proteína, 12-13% de ácidos nucleicos e 13-14% de carboidratos. Apesar de grande parte do carboidrato ser removido junto com a parede celular na centrifugação, parte deste fica solúvel e precipita junto com a fração protéica. De acordo com Kinsella (1987), 50 a 60% das proteínas isoladas no ponto isoelétrico podem existir na forma de complexo, contendo de 10 a 15% de ácidos nucleicos.

Pelos dados obtidos conclui-se que, para a utilização segura dos concentrados protéicos em alimentos para humanos, é necessário que haja redução do teor de RNA. Com essa finalidade fez-se a extração da proteína com o uso de  $\text{NaClO}_4$  e com trimetafosfato de sódio (TMFS). Tanto a reação de fosforilação com trimetafosfato de sódio como a extração com perclorato de sódio (Figura 3) introduzem uma grande quantidade de cargas negativas no sistema e na superfície da proteína. Como o RNA, associado à proteína, contém cargas negativas em seus resíduos fosfato, o acréscimo de cargas negativas ocasiona a repulsão das cargas de mesmo sinal e conseqüentemente a dissociação do complexo RNA-proteína. A intensidade da dissociação geralmente é proporcional ao nível de associação dos reagentes aos grupos funcionais dos resíduos dos aminoácidos (Damodaran & Kinsella, 1983).

A comparação da composição centesimal aproximada do concentrado protéico obtido com perclorato de sódio (CPP), do concentrado protéico fosforilado (CPF) e concentrado contendo núcleo-proteínas (CP) encontra-se na Tabela 5. Comparando-se o concentrado protéico CPF com o concentrado obtido pela fosforilação de 30% das proteínas com oxiclreto de fósforo, verificou-se que os resultados de Huang e Kinsella (1986) foram inferiores em proteínas, carboidratos e RNA. Entretanto os autores não comentam a quais componentes se atribui a diferença de 16%. Apesar do grau de fosforilação ser menor ao obtido neste experimento, a redução do RNA foi superior, provavelmente, devido a utilização do pH 4,2 na precipitação da proteína modificada, pois verificou-se que quanto menor o pH, maior o arraste dos ácidos ribonucleicos.

Tabela 5. Resultados da composição centesimal aproximada dos concentrados protéicos de levedura obtidos por diferentes métodos de extração, comparados com valores obtidos na literatura.

Componentes	CP	CPP	CPF	CPF*
Proteína	65,74	76,00	74,16	72,0
RNA	15,53	2,20	3,67	2,7
Lipídios totais	5,60	6,30	3,99	5,7
Carboidratos totais	6,60	8,78	8,30	3,1
Cinzas	6,51	6,10	9,81	nd

CP= concentrado protéico sem modificação; CPP = concentrado protéico extraído com perclorato de sódio; CPF = concentrado protéico fosforilado;\* Huang e Kinsella (1986b); nd = não determinado.

O conteúdo de cinzas apresenta-se elevado na composição do CPF, provavelmente causado pela adição de Na nas etapas de correção do pH durante a elaboração do concentrado. A proteína modificada foi precipitada no pH 3,8-4,0, sendo que a recuperação da proteína foi maior em pH 3,5. No entanto, valores de pH menores arrastaram maiores teores do RNA do sobrenadante. A diminuição do teor de RNA contribuiu para a elevação do conteúdo de proteína. O rendimento de extração de proteína para elaboração do concentrado protéico fosforilado foi de 77%.

De acordo com Lyutskanov et alli (1989), a simples incubação das células desintegradas de levedura a 50°C, pH 6 por 30 minutos foi suficiente para reduzir o conteúdo de carboidratos de 13 para 5,7%. Como no processo de fosforilação a suspensão fica incubada a pH 11, antes da precipitação isoelétrica (PI), esse fator pode influir na solubilização e arraste de carboidratos no PI da proteína. Em experimentos com levedura de panificação, a incubação das proteínas a 40°C, com TMFS a pH 11,5 por 6 horas, seguido de precipitação isoelétrica (pH 4,2), reduziu em 90% o conteúdo de ácidos nucleicos (Hálasz e Lásztity, 1991).

Como a fosforilação da proteína pode ser realizada tanto com o oxiclóreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ), como com trimetafosfato de sódio (TMFS), fez-se um estudo teórico comparativo das vantagens e desvantagens de cada reagente e concluiu-se que o TMFS era o reagente mais indicado. Apesar do  $\text{POCl}_3$  ser mais eficiente em reduzir o RNA, ele é um reagente de difícil manuseio, altamente corrosivo e de alto custo. Já o trimetafosfato de sódio apresenta um custo inferior, tem sido muito utilizado na modificação de amidos, com aprovação pelo FDA (Food and Drugs Administration), qualificando-se como mais propício para o setor alimentício. Em termos nutricionais o TMFS pode servir como proteção temporária dos grupos  $\epsilon\text{-NH}_2$  da lisina, evitando sua participação em reações químicas desfavoráveis, uma vez que as reações de fosforilação são conduzidas em pHs elevados (10 a 12).

#### **4.3 Composição mineral das células de levedura e de concentrados protéicos fosforilados.**

Os resultados da análise de elementos minerais (macro e microelementos) para as células de levedura íntegras (CLI), concentrado protéico fosforilado dialisado e não-dialisado (CPFd e CPF, respectivamente), estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados das determinações de minerais indicaram que a contribuição de macronutrientes não é muito significativa, uma vez que o elevado teor de ácido nucléico limita a ingestão de levedura em 30g/dia. Com relação aos micro-elementos ela pode ser considerada uma fonte excelente de selênio e cromo, fornecendo ainda quantidades apreciáveis de manganês, níquel, lítio e chumbo.

De acordo com "Recommended Dietary Allowances (National Research Council, 1989)", a ingestão de selênio para um adulto de 70 Kg deve ser de  $70\mu\text{g/}$  dia, portanto a ingestão de apenas 3g de levedura seca seria suficiente para suprir as necessidades diárias desse elemento. Quanto ao cromo, a recomendação situa-se na faixa de 50 a  $200\mu\text{g/}$  dia, como as leveduras apresentam  $963\mu\text{g/}$  100g de células secas, a ingestão de 20g de levedura, seria suficientes para suprir a recomendação do RDA no limite

superior da faixa. Os resultados das determinações de selênio e cromo foram concordantes com os de Levander (1989), que cita a levedura como fonte destes elementos.

Tabela 6. Resultados da composição mineral para células de levedura *S.carlsbergensis* e concentrados protéicos fosforilados, comparados com valores da literatura.

Elementos Químicos	CLI	CPF	CPFd	T. utilis*
<b>Macroelementos (mg/100g)</b>				
Al	0,95	0,45	0,24	nd
Ca	0,73	0,55	0,52	2,45
Mg	2,10	0,31	0,05	1,49
P	16,94	26,51	21,98	16,30
Na	8,95	15,89	10,39	0,13
K	13,65	2,05	1,11	20,00
Fe	0,10	0,07	0,01	nd
<b>Microelementos (mg/1000g)</b>				
Mn	15,91	3,59	1,53	
Cu	4,54	11,04	5,50	
Zn	4,56	0,74	0,27	
Li	5,87	7,13	3,16	
Ni	7,22	5,81	0,39	
Pb	9,69	9,32	1,18	
V	0,63	0,37	0,03	
Co	0,52	0,47	0,08	
Se	24,21	13,34	0,13	
Cd	0,29	0,21	0,01	
Cr	9,63	3,93	1,04	

CLI = levedura íntegra; CPF = concentrado protéico fosforilado; CPFd = concentrado protéico fosforilado dialisado; \* = Waslien et alii (1970) para *Torula utilis*; nd = não determinado.

Embora de ocorrência natural nos alimentos, a essencialidade dos elementos traços níquel, lítio e chumbo para diversos mamíferos ainda não foi demonstrada, portanto não existe nenhum dado sobre o requerimento destes elementos para humanos. De acordo com a RDA (1989), o excesso de níquel resulta em redução do crescimento em ratos, vacas, ovelhas, cabras e cobaias. O lítio e o chumbo, em excesso, além de retardarem o crescimento prejudicam o desempenho reprodutivo em animais de laboratório.

Alguns elementos como P, Na, Cu e Li apareceram em proporções mais elevadas no concentrado protéico CPF, provavelmente por estarem associados à fração protéica que foi concentrada. Considerando-se o balanço de massa, onde são necessários 190g de levedura seca para se obter 100 g de CPF, verificou-se que os elementos têm suas concentrações reduzidas em relação as quantidades inicialmente presentes nas 190g de levedura. O cobre foi o único elemento na amostra CPF que se apresentou em quantidade superior à das células de levedura seca (CLI), podendo ter ocorrido contaminação com esse elemento durante o processo de preparação do concentrado.

#### **4.4 Determinação da composição de aminoácidos da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* e concentrados protéicos**

Os valores encontrados para a composição aminoacídica da célula integral, concentrado protéico fosforilado (CPF), concentrado protéico extraído com perclorato (CPP) e concentrado protéico sem tratamento (CP) são apresentados na Tabela 7. As composição de aminoacídica das proteínas de levedura atendem basicamente o padrão de referência da FAO/WHO/UNU (1985), destacando-se o fato de apresentarem alto teor de lisina, teores adequados de treonina e triptofano e uma deficiência marginal em metionina.

Embora o perfil aminoacídico não seja comparável a proteínas de origem animal ele se iguala as melhores proteínas de origem vegetal como a soja. A composição dos

concentrados não apresentou grandes diferenças entre eles, sendo os teores de lisina ligeiramente superiores aos das células íntegras. Nossos resultados também indicaram que as proteínas de levedura na forma de concentrados protéicos constituem um ótimo complemento para produtos elaborados com cereais, que apresentam carência de determinados aminoácidos, como a lisina e treonina (Lin et alii, 1986).

Tabela 7. Resultados da composição de aminoácidos das células de levedura íntegra, *S. carlsbergensis* e concentrados protéicos, comparados com valores da literatura.

AMINOÁCIDO (g aminoácido/100g proteína)	CLI	CP	CPP	CPF	<i>S.cerevisiae</i> *
Lisina	7,13	8,15	8,78	8,64	8,2
Leucina	8,84	8,62	7,76	7,47	7,9
Isoleucina	5,64	5,09	5,12	4,99	5,5
Treonina	6,16	4,66	4,07	4,41	4,8
Triptofano	1,10	1,52	1,39	1,15	1,2
Valina	6,20	5,71	5,91	6,12	5,5
Metionina	2,50	1,83	1,82	1,79	2,5
Cistina	0,34	0,69	0,49	0,67	nd
Fenilalanina	5,30	5,34	4,96	4,64	4,5
Tirosina	4,68	3,61	3,83	3,79	nd
Histidina	2,06	2,24	2,77	2,69	4,0
Ac. Glutâmico	13,15	13,27	9,88	9,74	nd
Ác. Aspartico	11,98	11,61	11,66	11,07	nd
Serina	6,13	4,63	3,68	3,86	nd
Prolina	4,45	4,08	3,16	3,44	nd
Alanina	7,07	6,26	5,55	6,02	nd
Glicina	4,93	4,88	4,14	4,35	nd
Arginina	4,11	3,98	4,96	4,92	5,0

CLI = células íntegras de levedura; CP = concentrado protéico sem modificação química; CPP = concentrado protéico extraído com perclorato de sódio; CPF = concentrado protéico fosforilado; \* = Guzman-Juarez (1983); nd = não determinado.

A maioria dos trabalhos referentes a composição aminoacídica das células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* cita teores da metionina variando de 0,4 a 1,8%, inferiores aos encontrados neste trabalho. Já os teores de cistina citados de 0,6 a 1,6% são superiores aos obtidos para a célula de levedura íntegra (Lyutskanov et alii, 1990; Reed e Nagodawithana, 1991; Martini et alii, 1979). Os teores obtidos de aminoácidos sulfurados assemelham-se aos citados por Guzman-Juarez (1983), apresentados na Tabela 7. Trabalhos de melhoramento genético têm citado mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, que sintetizam proteínas contendo 4,3% de metionina, viabilizando a possibilidade de resolver o problema da proteína deficiente (Momose e Gregori, 1978).

As preparações protéicas tendem a concentrar os teores de lisina e ocorre um pequeno decréscimo de metionina, sendo a variação dos teores de aminoácidos concordantes com os citados por Kinsella (1987). Os valores de isoleucina são semelhantes aos descritos por Reed e Nagodawithana (1991). De um modo geral os aminoácidos essenciais tiveram um acréscimo nos processos de concentração da proteína, com exceção dos sulfurados.

#### **4.5 Comportamento eletroforético**

A eletroforese em gel poliacrilamida (PAGE) de proteínas desnaturadas pelo aquecimento, na presença de SDS e 2-mercaptoetanol, proporciona uma separação dos polipeptídeos de acordo com o tamanho (Weber e Osborn, 1969), conforme visualizado na Figura 4. A determinação do peso molecular dos polipeptídeos das amostras CP e CPF foram feitas através da comparação da mobilidade com marcadores de massas moleculares conhecidas, nas mesmas condições eletroforéticas.

Pela construção do gráfico do logaritmo do peso molecular em função da mobilidade relativa dos padrões de pesos moleculares conhecidos, determinou-se o pesos moleculares das proteínas nas amostras, por extrapolação da mobilidade

relativa dos polipeptídeos das amostras na curva. Deste modo, as amostras CP e CPF apresentam polipeptídeos de peso molecular variando de 15.000 a 81.280 daltons, onde a maior proporção ocorre na faixa de 25.704 à 28.184; 33.113 à 36.308 e 43.709 à 47.709 daltons.

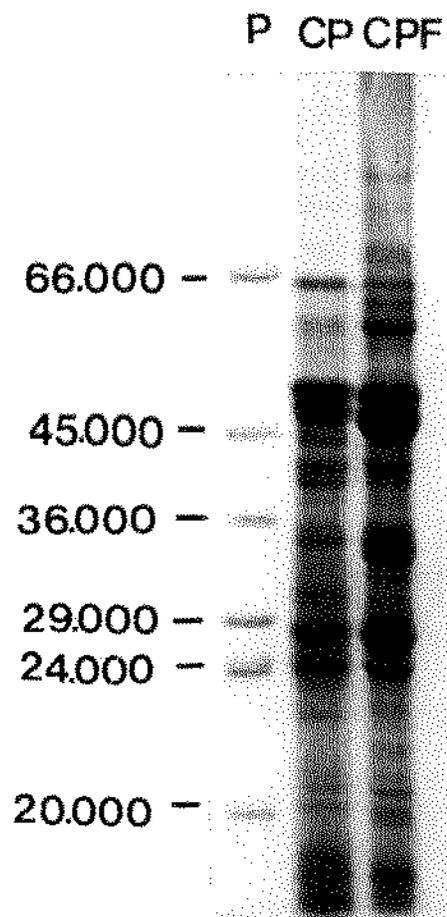


Figura 4. Eletroforese em gel poliacrilamida (PAGE) de proteína de levedura precipitada no ponto isoelétrico (CP), proteína de levedura fosforilada (CPF), comparadas aos padrões (P), com os respectivos pesos moleculares.

Os perfis eletroforéticos das amostras CP e CPF mostraram-se muito semelhantes, podendo indicar que a fosforilação, embora utilizando um tratamento alcalino (pH 11) por 3 horas à temperatura de 35°C, não ocasionou alterações das proteínas.

Os resultados da eletroforese mostraram que o processo de fosforilação com TMFS não ocasionou um comportamento associativo das proteínas, por meio de ligações covalentes intermoleculares, que dão origem a formação de complexos aglomerados de alto peso molecular. No caso de proteínas fosforiladas com  $\text{POCl}_3$ , ocorreu a associação intermolecular, detectada em eletroforese. A eletroforese de proteínas de levedura, caseína e lisozima em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, mercaptoetanol e uréia, revelou a formação de aglomerados protéicos que impediam a entrada das proteínas no gel (Huang e Kinsella, 1986; Medina et alii, 1992; Matheis et alii, 1983).

A presença de ligações cruzadas covalentes podem ser facilmente detectadas em eletroforese em gel SDS, porque reagentes como a uréia e dodecil sulfato de sódio, tem a capacidade de romper todo tipo de ligação, exceto as covalentes, sendo o 2-mercaptoetanol específico para a redução das ligações dissulfídicas (Tombs, 1991). Os resultados obtidos da eletroforese concordam com os resultados conhecidos para proteínas de soja e lisozima tratadas com TMFS, não sendo observado a formação de ligações cruzadas como em amidos (Matheis et alii, 1983; Sung et alii, 1983).

#### **4.6 Propriedades funcionais da proteína de levedura**

Vários fatores como polissacarídeos, lipídios, tipo e disposição de aminoácidos que compõem as proteínas, podem afetar as propriedades funcionais dos concentrados protéicos de levedura. As modificações ocorridas na estrutura da proteína e o grau de desnaturação, ocasionados principalmente por métodos drásticos de extração, são fatores que causam alterações de suas propriedades físico-químicas e conseqüentemente de sua funcionalidade.

Foram avaliadas as propriedades funcionais de solubilidade, viscosidade, capacidade de retenção de água, emulsificação, formação de espuma e gel dos extratos protéicos obtidos pelos diferentes métodos.

#### 4.6.1 Solubilidade

A maioria das proteínas de levedura são globulinas, sendo conhecido que a solubilidade das proteínas globulares varia consideravelmente em função do pH. A curva de solubilidade da proteína em função do pH (Figura 5) mostra que a solubilidade da proteína fosforilada é maior em todas as faixas de pH com relação à proteína extraída com perclorato de sódio, com exceção dos pHs abaixo de 4. Embora o método de extração com perclorato de sódio seja realizado em temperatura ambiente, a proteína resultante apresenta-se menos solúvel. De acordo com Damadoran e Kinsella (1983), uma proporção considerável da proteína isolada com sais caotrópicos (50%) é pouco solúvel em pH 6 - 7, devido a agregação espontânea de complexos macromoleculares, refletindo seu alto conteúdo de aminoácidos apolares.

Da análise comparativa do concentrado protéico extraído com TMFS e do composto por núcleoproteínas (CP), observou-se um ligeiro aumento da solubilidade do CPF nos pHs acima de 4. O ponto isoelétrico (pI) no CPF foi reduzido para 3,5, sendo que a solubilidade do nitrogênio diminuiu para valores abaixo deste ponto (Figura 6).

A redução do ponto isoelétrico observada concorda com os resultados citados na literatura, indicando que a fosforilação desloca o pI em aproximadamente 0,8 unidades (Sung et alii, 1983). O aumento da solubilidade pode ser causado pela repulsão eletrostática que ocorre entre os grupos fosfóricos adicionados aos resíduos laterais da cadeia polipeptídica, ocasionando uma abertura da molécula, que resulta em maior interação entre proteína e água. De acordo com Chou e Morr (1979) os primeiros sítios de interação do sistema proteína e água são os grupos funcionais dos aminoácidos polares, onde os grupos  $-NH_2$  e  $-COOH$  são os que ligam maior número

de moléculas de água, respectivamente. Igualmente importante é a conformação da proteína, que permitirá que estes sítios de ligações fiquem estericamente disponíveis para ligação com a água.

A redução da solubilidade no lado mais ácido do ponto isoelétrico da proteína, tem sido observada para vários tipos de modificações químicas, as quais introduzem cargas negativas na superfície da proteína. Trabalhos realizados com succinilação da proteína de farinha de trigo,  $\beta$ -caseína, miosina, soja, peixe, levedura e folhas, observaram o mesmo comportamento de solubilidade para valores abaixo do  $pI$  (Vananuvat e Kinsella, 1978).

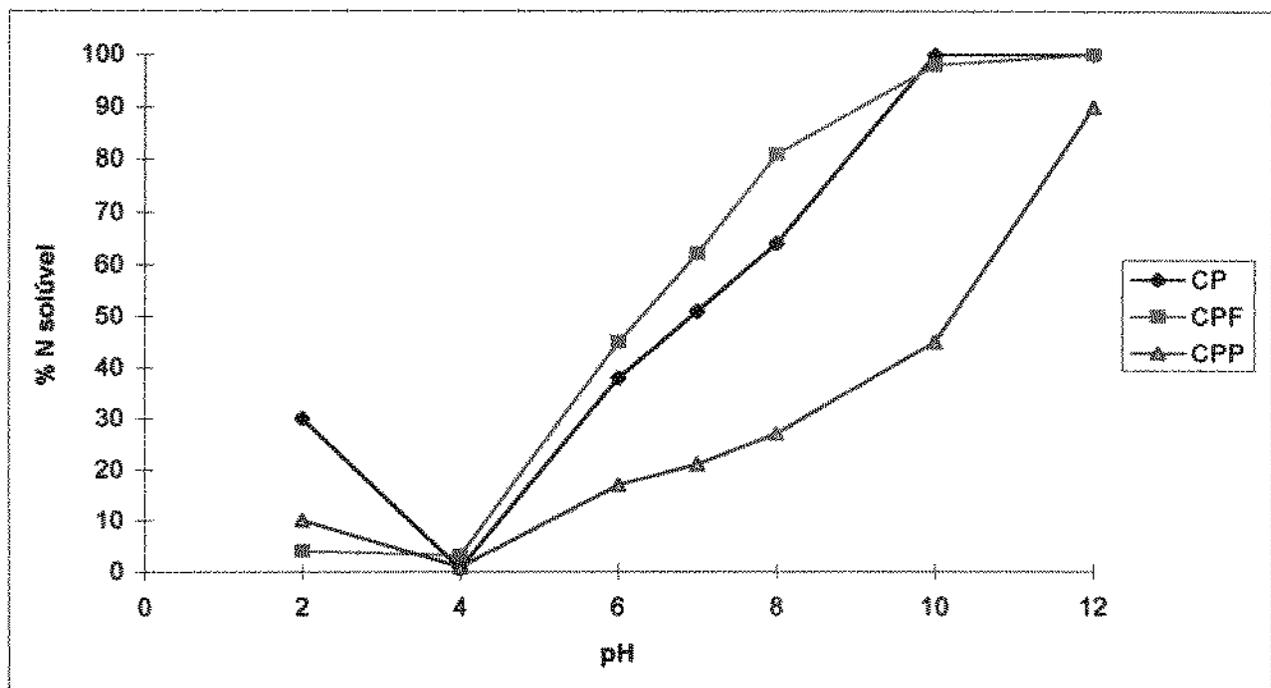


Figura 5. Perfil de solubilidade em água dos concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces carlsbergensis*) em função do pH

O efeito da força iônica na solubilidade da proteína fosforilada pode ser observado na Figura 6. Os perfis de solubilidade do CPF em água e solução salina 0,1M indicam que a baixa concentração de sal (NaCl) aumenta em média 15% da

solubilidade da proteína em relação a água, sendo maior a diferença entre os pHs 6 a 8. De acordo com Sgarbieri (1996) em soluções protéicas com concentrações reduzidas de sal, ocorre estabilização dos grupos carregados da proteína pelo aumento da condutividade do meio, favorecendo a solubilidade.

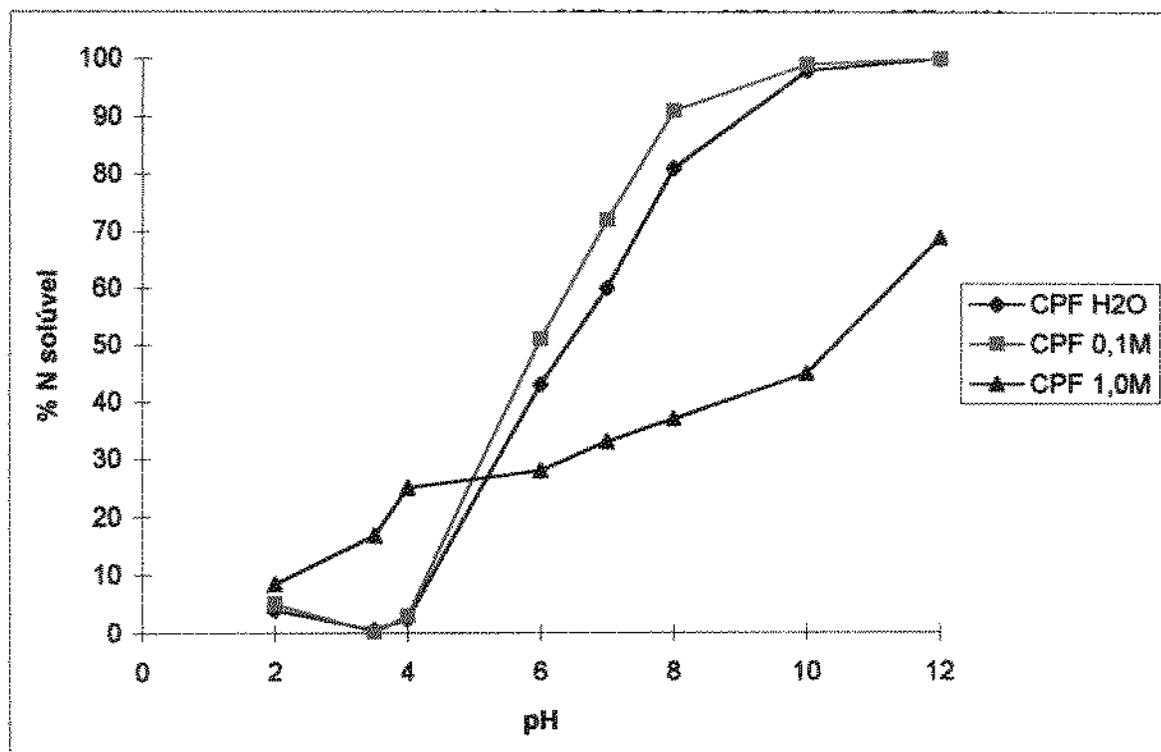


Figura 6. Perfil de solubilidade do concentrado protéico fosforilado (CPF) em função da força iônica

Alta concentração de sal (1,0M NaCl) ocasiona uma elevação notável da solubilidade próximo ao ponto isoelétrico, aumentando em média 80% para a faixa de pH de 2 a 4. Para os valores de pH acima de 6 a presença de 1,0M de NaCl ocasiona uma redução de aproximadamente 46% em relação ao CPF em água. A maior diferença foi observada para o PH 8 em relação à solução CPF 0,1M NaCl, onde a diminuição foi de 60%. Nestes casos ocorre o fenômeno "salting out", ou seja a competição das moléculas de proteína e íons salinos pela água, levando a uma maior interação entre proteínas-proteínas, produzindo uma diminuição da solubilidade .

#### 4.6.2 Capacidade de retenção de água

O concentrado protéico fosforilado apresentou maior capacidade de reter água por grama de proteína, em relação as amostras CP e CPP, na faixa de pH estudada (Tabela 8). A proteína do CPF teve o valor da capacidade de retenção de água (CRA) elevada em mais de 100% para valores de pH acima de 6, em comparação ao concentrado sem modificação (CP). Em estudos de fosforilação com  $\text{POCl}_3$ , a proteína lisozima fosforilada absorveu 158% mais água do que a lisozima controle, já a caseína fosforilada absorveu apenas 40% a mais do que o controle (Matheis et alii, 1983). Cabe ressaltar que os métodos de avaliação utilizados foram distintos do utilizado neste trabalho.

Tabela 8. Capacidade de retenção de água (g de água/g de proteína) das amostras CP, CPP e CPF em função do pH de dispersões a 1%.

pH	AMOSTRAS		
	CP	CPP	CPF
5,0	3,71 ± 0,10	4,30 ± 0,07	5,11 ± 0,20
6,0	4,90 ± 0,12	4,10 ± 0,02	10,57 ± 0,14
7,0	8,27 ± 0,06	6,07 ± 0,04	18,61 ± 0,35
8,0	10,58 ± 0,20	8,89 ± 0,12	20,57 ± 0,26

CP= concentrado protéico sem modificação; CPP = concentrado protéico extraído com perclorato de sódio; CPF= concentrado protéico fosforilado.

De acordo com Shety e Kinsella (1982), o aumento da capacidade de hidratação pode ser, em parte, atribuído à introdução de grupos fosfóricos na cadeia polipeptídica, que ocasiona mudanças conformacionais na estrutura, resultantes da força de repulsão entre cargas negativas dos grupos fosfóricos e carboxílicos aniônicos. O aumento do CRA nos pHs entre 5 e 8 também pode ser atribuído à ionização dos grupos fosfóricos, uma vez que os grupos ionizados são capazes de ligar mais água em relação aos grupos não ionizados (Kuntz, 1971).

No pH 5 a capacidade de retenção de água da amostra CP foi inferior às demais, sendo que a partir do pH 6, a CPP apresentou os menores valores. O comportamento da CPP pode ser consequência da diminuição da capacidade da proteína se ligar a água, devido às interações intermoleculares e formação de grandes aglomerados (Kinsella, 1987).

A adição de 0,1M e 1,0M de NaCl à amostra CPF causou uma redução marcante na quantidade de água ligada, reduzindo de 10,57g para 5,18g e 4,37g de água/g de proteína, respectivamente, em pH 6,0. Resultados com redução da CRA em função do aumento da força iônica também foram observados em proteína fosforilada com  $\text{POCl}_3$ , onde o decréscimo foi de 18 para 5g de água/g de proteína. A perda da CRA pode ser devido a redução na repulsão eletrostática entre os grupos fosfatos, causada pela presença do sal em concentrações menores e uma diminuição na hidratação da proteína ocasionada por concentrações mais elevadas (Huang e Kinsella, 1986). A mudança do meio ambiente eletrostático que circunda a molécula de proteína provoca alterações no seu comportamento interativo soluto-solvente. O sal tanto interfere na constante dielétrica do meio como forma um escudo de íons ao redor da molécula, o qual interfere na sua interação com moléculas de água (Wagner et alii, 1992).

A capacidade de retenção de água da amostra CPF não aumentou em função do tempo de exposição ao solvente, ficando constante no período de até 150 minutos de agitação em água. O aquecimento das dispersões de proteína nas temperaturas de 25, 45, 65 e 85°C, sob agitação em pH 6, durante 60 minutos, não trouxe mudanças na CRA, ficando os valores medidos entre 10,44 e 10,72 g de água/ g de proteína.

#### **4.6.3 Viscosidade**

A reologia de uma dispersão de proteína é dependente do seu volume hidrodinâmico, forma e concentração das partículas dispersas e da força de interação entre as partículas. Através de um reômetro adequado, pode-se avaliar a reologia de um sistema, pela análise das curvas de comportamento obtidas das medições

experimentais. Para compreensão do comportamento reológico dos concentrados, procurou-se representá-los por um modelo mais conveniente dentre os mais conhecidos, sendo possível, deste modo, comparar os resultados obtidos com os de outros pesquisadores.

As propriedades de fluxo das dispersões de proteína CP, CPF e CPP foram avaliadas comparativamente, na temperatura fixa de 20°C, sendo feito um estudo mais detalhado da proteína fosforilada com TMFS. O efeito da taxa de deformação (D) na viscosidade aparente ( $\eta$ ) de dispersões a 3% dos concentrados protéicos a base de levedura compõem a Figura 7.

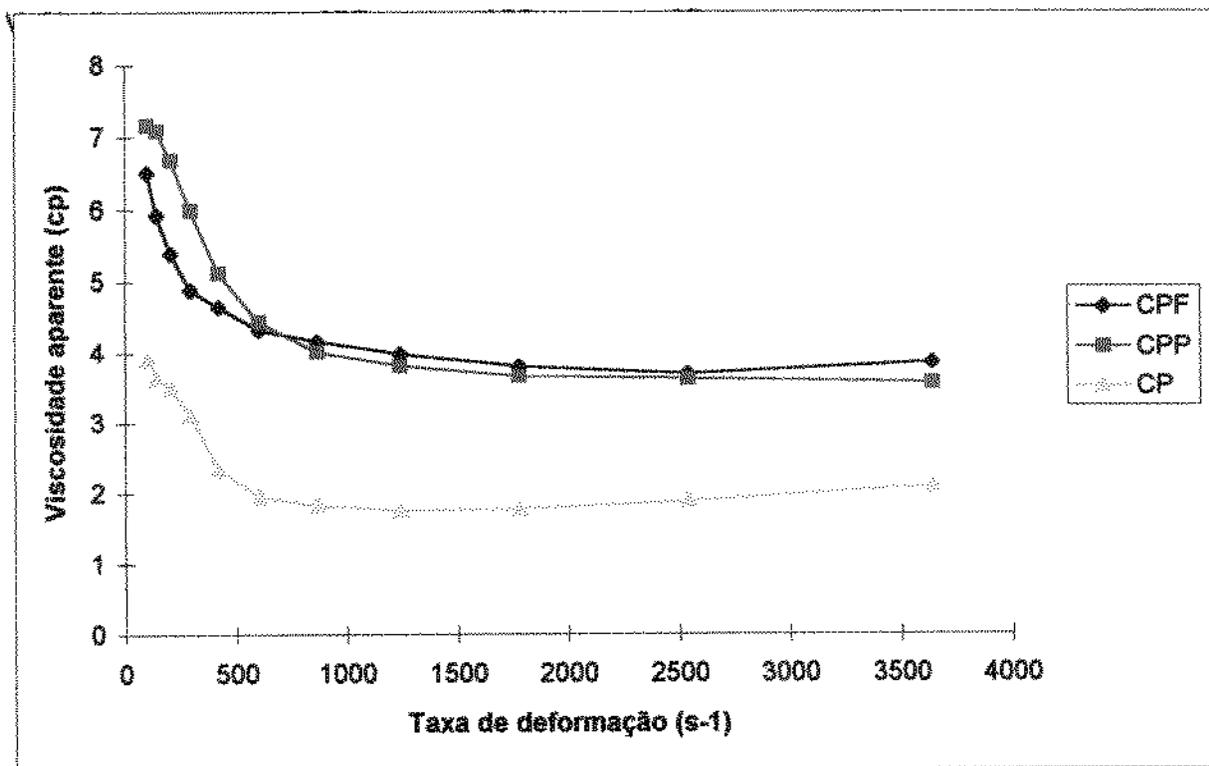


Figura 7. Efeito da velocidade de cisalhamento na viscosidade aparente de concentrados protéicos (3 %) em pH 7,0.

A dispersão de proteína fosforilada (CPF) exibiu uma viscosidade aparente ligeiramente inferior a da extraída com perclorato de sódio (CPP) nas velocidades de cisalhamento mais baixas. Em taxas intermediárias apresentaram viscosidades semelhantes. Embora apresentem curvas reológicas semelhantes os fenômenos que

regem o comportamento das proteínas nos diferentes concentrados devem ser distintos. As proteínas fosforiladas são mais facilmente hidratadas e tornam inchadas com o volume aumentado; já o comportamento do CPP pode ser atribuído ao tipo de interação proteína-proteína com a formação de complexos macromoleculares em torno do pH 7.

A menor viscosidade da amostra CP, aproximadamente a metade da CPF, pode estar relacionada com sua conformação estrutural mais compactada, resultando num volume hidrodinâmico reduzido quando em solução. Em todos os concentrados houve uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação (comportamento pseudoplástico), onde os valores tendem a tornar-se constante a partir da velocidade rotacional de 266 rpm ( $D=1242 \text{ s}^{-1}$ ).

Para sistemas altamente solvatados, ocorre formação de uma estrutura de camadas com imobilização de solvente. Em menores taxas de deformação existe pouco efeito nesta estrutura em camadas e as interações permanecem como agregados de tamanho constante. Entretanto quando a taxa de deformação aumenta, ocorre uma remoção das camadas solvatadas, reduzindo o tamanho do agregado e conseqüentemente uma redução da viscosidade aparente. Em taxas de deformação elevadas, as camadas de solvatação seriam completamente removidas resultando uma viscosidade aparente constante (Tung, 1978).

O reograma ( $\tau \times D$ ) de dispersões de CPF em água, a diferentes concentrações, é mostrado na Figura 8. Pelas curvas de escoamento obtidas verifica-se que todas as concentrações apresentaram o comportamento reológico de fluidos pseudoplásticos, onde  $\tau$  (tensão de cisalhamento) não foi proporcional a  $D$  (taxa de deformação). Não foi observada a presença de tensão inicial ( $\tau_0$ ), ou seja, resistência inicial da amostra ao escoamento. Em temperatura constante a viscosidade aparente para fluidos, independentes do tempo, depende somente da taxa de deformação, onde o

comportamento pseudoplástico é caracterizado por uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação.

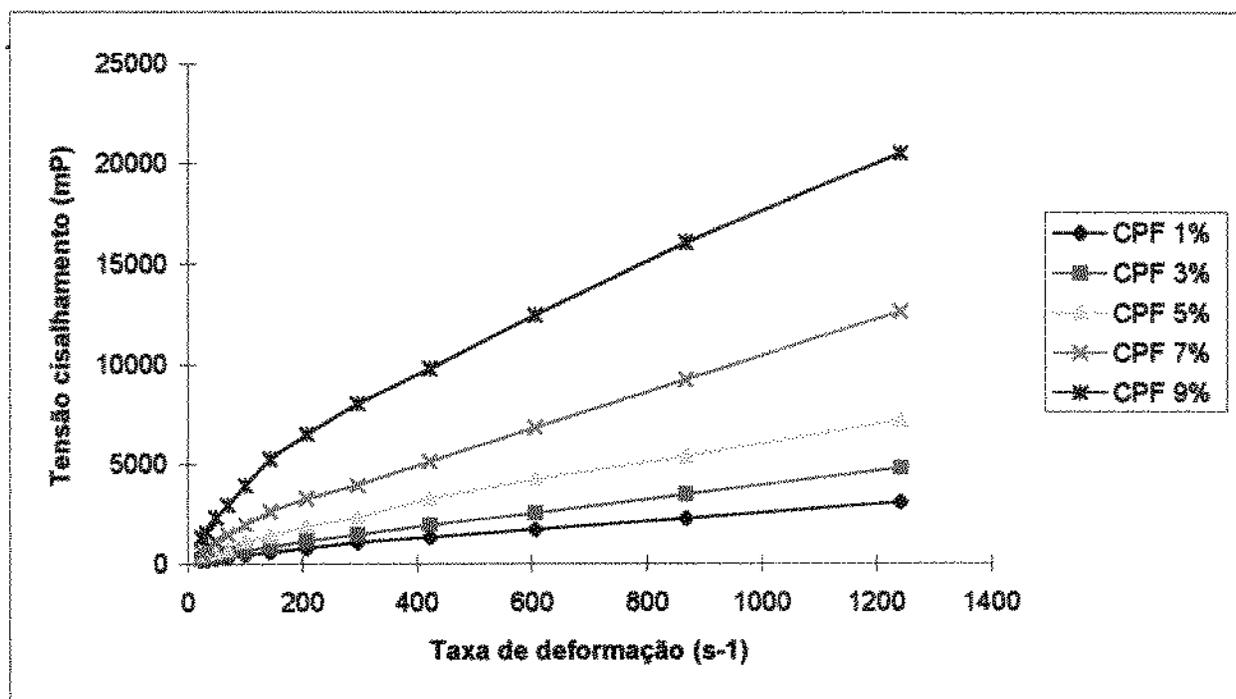


Figura 8. Curvas de fluxo do concentrado protéico fosforilado a diferentes concentrações em água destilada.

Os dados experimentais foram analisados pelo modelo da Lei de Potência ou Ostwald de Waele, dada pela equação:

$$\tau = K \cdot D^n$$

onde K e n são constantes empíricas, sendo o coeficiente de consistência (K) um parâmetro que geralmente aumenta com o aumento da concentração da proteína. O índice de comportamento de fluxo (n), reflete a extensão do desvio do comportamento em relação ao fluxo Newtoniano, onde n=1. Geralmente este índice diminui com o aumento da concentração da proteína, porque o comportamento de fluxo de uma solução de proteína com concentração crescente, desvia cada vez mais o seu comportamento em relação à água pura (n<1). Quando a concentração é aumentada,

as interações proteína-proteína tornam-se dominantes e mais água é imobilizada, resultando num aumento adicional da viscosidade aparente (Wagner et alii, 1992).

As curvas obtidas pelo reograma em escala logarítmica, para diferentes concentrações de CPF, encontram-se na Figura 9. Através das equações das curvas pode-se calcular o coeficiente de consistência (K) e o índice de comportamento de fluido (n), cujos valores estão expressos e comparados a outros valores da literatura, na Tabela 9.

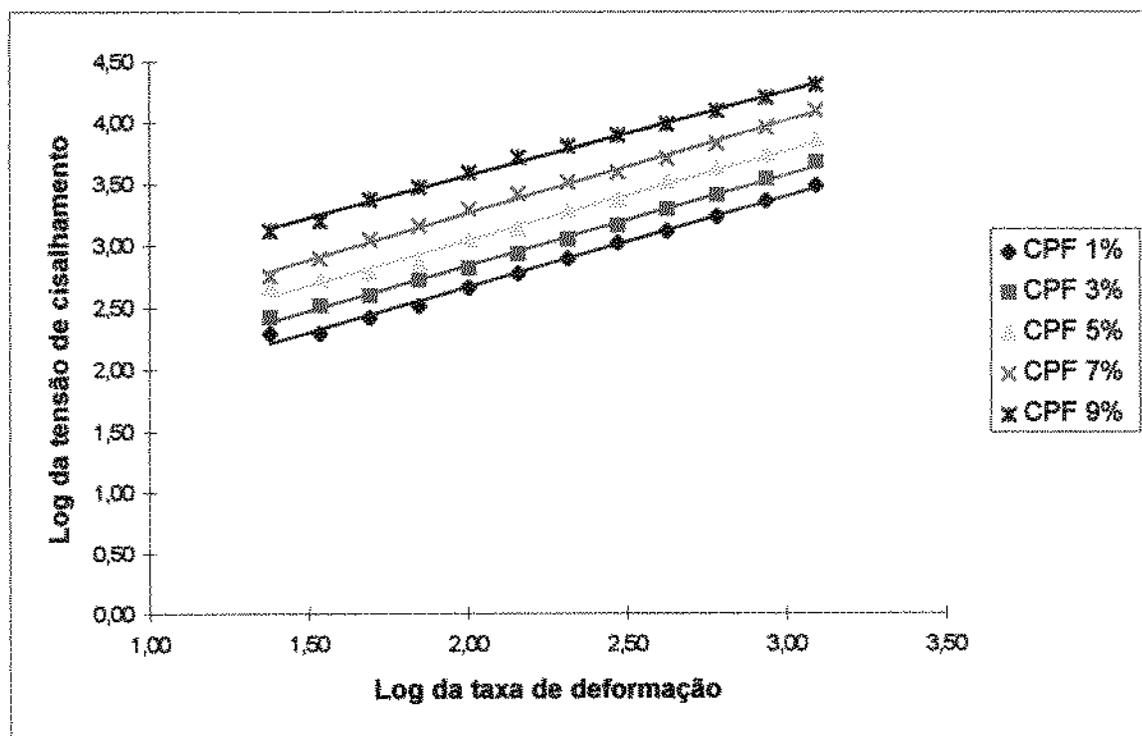


Figura 9. Logaritmo da tensão de cisalhamento em função do logaritmo da taxa de deformação, de dispersão de CPF em água, em diferentes concentrações.

As propriedades de fluxo da proteína fosforilada foram caracterizadas por elevados valores de K. Numa análise comparativa aos valores citados pela literatura, verifica-se que as proteínas de levedura fosforiladas destacam-se em relação ao concentrado protéico de soja e caseinato, principalmente nas concentrações mais baixas (1 a 9%).

A adequação dos dados experimentais à equação da Lei de Potência resultou num coeficiente de correlação de 0,99 para todas as concentrações estudadas, mostrando a perfeita adequação dos dados ao modelo utilizado. De acordo com a interpretação de Hermansson (1975) para as características de fluxo através destes índices, os valores obtidos para as constantes K e n indicaram que o aumento da viscosidade aparente para as diferentes concentrações de CPF, pode ser atribuído principalmente à presença de interações proteína-água (hidratação), onde n mostra-se constante à medida que o valor de K se eleva.

As características de fluxo do IPS, exemplificadas na Tabela 9, são indicativas da presença de interações proteína-proteína, ocasionando a formação de uma rede de proteínas a concentrações mais elevadas (Hermansson, 1975). Neste caso ocorre uma redução dos valores de n, à medida que os valores de K se elevam com o aumento da concentração.

A representação logarítmica da variação do coeficiente de consistência (K) em função da concentração, para a amostra CPF, encontra-se na Figura 10. Verifica-se que ocorre uma mudança abrupta na inclinação da curva para  $\log [P] = 0,5$  ( $[P] \cong 3\%$ ), indicando um aumento espontâneo na viscosidade. A influência marcante da concentração na viscosidade aparente, a partir desta concentração, reflete a expansão das dimensões dos aglomerados protéicos, onde provavelmente ocorre tanto interações proteína-proteína como proteína-água. Em concentrações diluídas a influência do aumento da concentração na inclinação da curva é negligenciável, pois quase não ocorre interações e superposição entre as proteínas, que possibilitem a formação de arranjos tridimensionais entre elas (Wagner et alii, 1992). Esse ponto de mudança na inclinação da reta, poderia ser indicativo da concentração mínima necessária de amostra, para ocorrer a estruturação requisitada para formação de géis.

Tabela 9. Resultados dos parâmetros do comportamento de fluxo para a proteína de levedura fosforilada (CPF) em diferentes concentrações, comparados a outras proteínas alimentares.

Proteína	Concentração (%)	Comportamento de fluxo (n)	Coefficiente de consistência (K)
CPF	1	0,73	15,8
	3	0,74	22,9
	5	0,73	37,2
	7	0,74	60,3
	9	0,69	151,3
proteína <sup>(a)</sup> fosforilada	3	0,77	16,9
	4	0,67	38,9
I P S <sup>(b)</sup>	4	0,91	0,11
	12	0,67	11,00
	16	0,52	62,00
Caseinato <sup>(b)</sup>	4	0,92	0,04
	10	0,92	0,23
	16	0,82	89

I P S = Isolado protéico de soja. (a) = Huang e Kinsella, 1986b; (b)= Hermansson (1975).

O aumento da temperatura resultou num decréscimo da viscosidade, nas duas taxas de deformação estudadas (207 e 1242s<sup>-1</sup>), provavelmente por desestabilizar as interações da proteína-água, conforme ilustrado na Figura11. Em taxa de deformação de 1242 s<sup>-1</sup> a viscosidade foi inferior em todas as faixas de temperatura, devido à capacidade da velocidade de rotação em desestabilizar o arranjo hidrodinâmico das moléculas em solução. Para dispersões de proteína de soro de leite com concentração de 15 a 30%, foi observado um aumento da viscosidade para temperaturas superiores

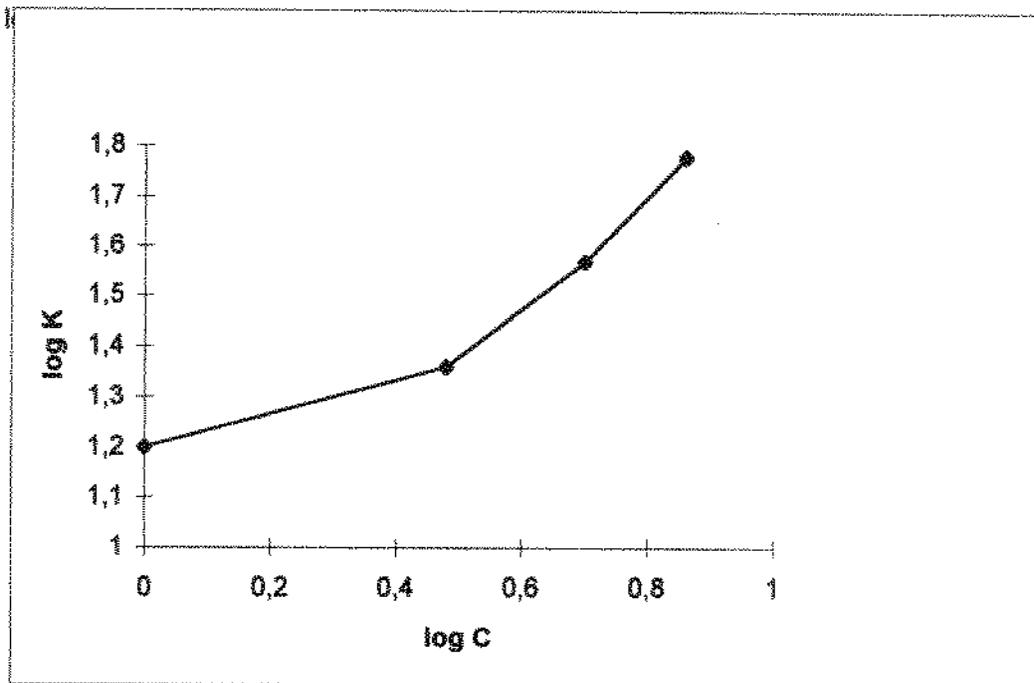


Figura 10. Variação do Coeficiente de consistência K em função da concentração da amostra CPF.

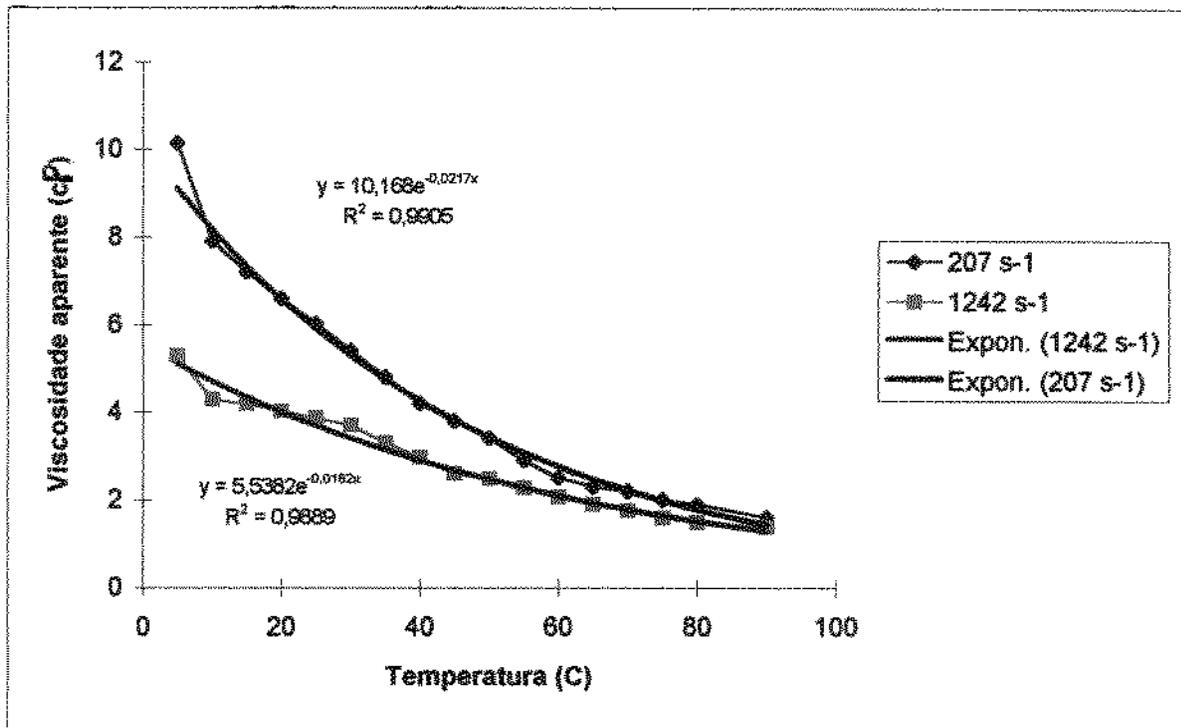


Figura 11. Efeito da temperatura na viscosidade aparente do concentrado protéico fosforilado 3% em pH 6,0

a 60°C, sendo este efeito marcante nas concentrações mais elevadas. Neste caso pode ter ocorrido a formação de gel, em consequência da desnaturação protéica e arranjo tridimensional das moléculas (Tang et alii, 1993). Neste trabalho não foi observado aumento da viscosidade, nem formação de gel, a temperaturas elevadas, principalmente porque as concentrações utilizadas foram inferiores e o tipo de interações predominantes nas concentrações utilizadas diferem das proteínas do soro, onde predominam as interações proteína-proteína (Hermansson, 1975).

As medidas da viscosidade para dispersões a 3% de CPF em água em função do pH podem ser observadas na Figura 12.

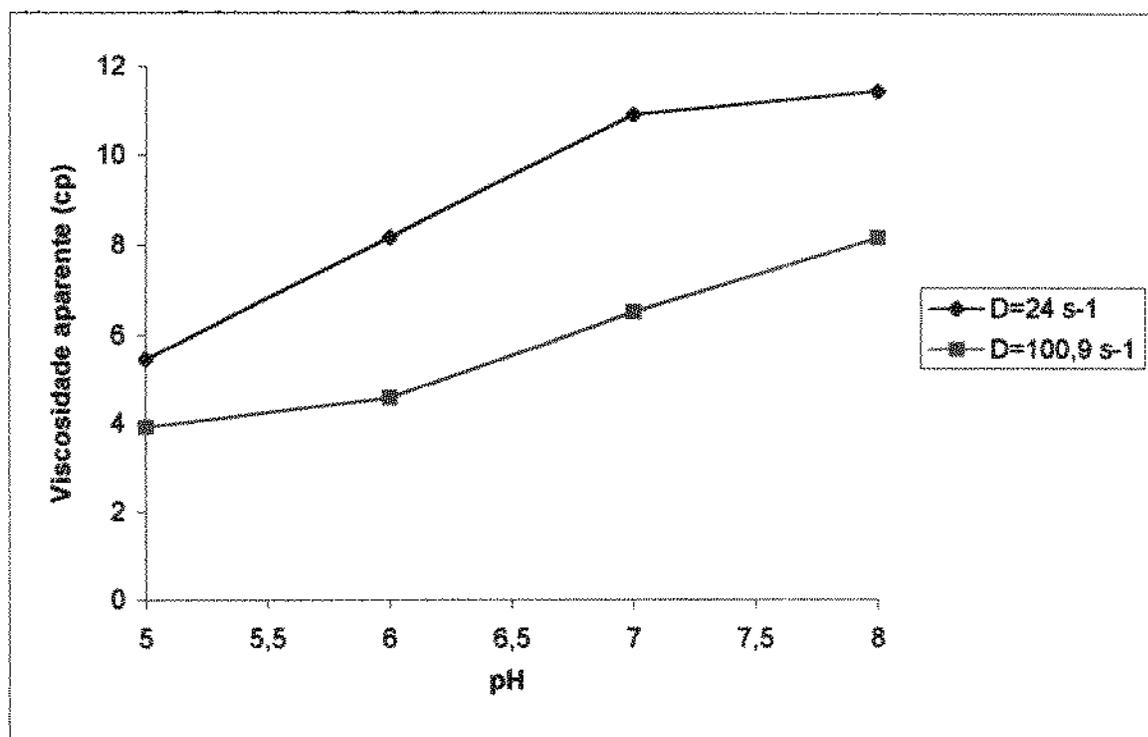


Figura 12. Variação da viscosidade aparente de dispersões a 3% de CPF em função do pH, para as taxas de deformação de 24 s<sup>-1</sup> e 100,9 s<sup>-1</sup>.

A variação da viscosidade tanto pode ser correlacionada com a solubilidade como à capacidade de inchamento da proteína em água. Para a amostra CPF foi feita a correlação dos resultados das medidas do CRA e dos valores obtidos de viscosidade aparente, para uma mesma faixa de pH, obtendo-se um coeficiente de correlação de

0,96. Hermansson e Akesson (1975) observaram uma correlação altamente positiva entre a solubilidade e as propriedades de inchamento da proteína isolada de soja (IPS), caseinato e concentrado protéico de soro com as propriedades de fluxo. Proteínas solúveis com alta capacidade de inchamento, como o caseinato, mostraram que o aumento da viscosidade depende da concentração. No entanto o IPS com baixa solubilidade, mas alta capacidade de inchamento, exibiu alta viscosidade a concentrações relativamente baixas.

#### **4.6.4 Geleificação**

A maioria das proteínas globulares, provenientes de soluções concentradas, se geleificam quando submetidas ao aquecimento, como resultado da formação de agregados de moléculas orientadas, parcialmente desnaturadas com a estrutura mais desdobrada. A quantidade mínima necessária para formação de géis, varia de acordo com a natureza da proteína, sendo necessário que a proteína apresente solubilidade para interagir com o solvente, e capacidade de reter água na matriz protéica tridimensional (Armstrong et alli, 1994).

Para a proteína de levedura fosforilada a concentração de 4% foi suficiente para formação de gel, sendo que nesta concentração, invertendo-se os tubos, o gel formado não desmanchava nem escorria pelas paredes do vidro. No entanto, uma vez retirados do tubo, os géis fracos de 4 e 6%, não apresentavam consistência para manter-se firmes. Na Figura 13 podem ser visualizados os tubos com géis formados à diferentes concentrações de proteína da amostra CPF. Verificou-se que na concentração de 2% de proteína da amostra CPF não houve formação de gel, onde a fase aquosa ficou separada na parte superior dos tubos.

Nos testes de avaliação de textura foram utilizados géis preparados com 8% e 10% de concentração de proteína. Como o concentrado protéico fosforilado apresentou uma capacidade de retenção de água muito grande e uma absorção instantânea, as dispersões a 10% formavam uma pasta muito espessa, de difícil homogeneização e

manipulação para serem colocadas nos tubos de teste. Para contornar essa dificuldade as dispersões, dentro do bequer, foram aquecidas em banho de água a 40°C, e desta maneira tornaram-se mais fluidas, permitindo melhor homogeneização e escoamento para dentro dos tubos.

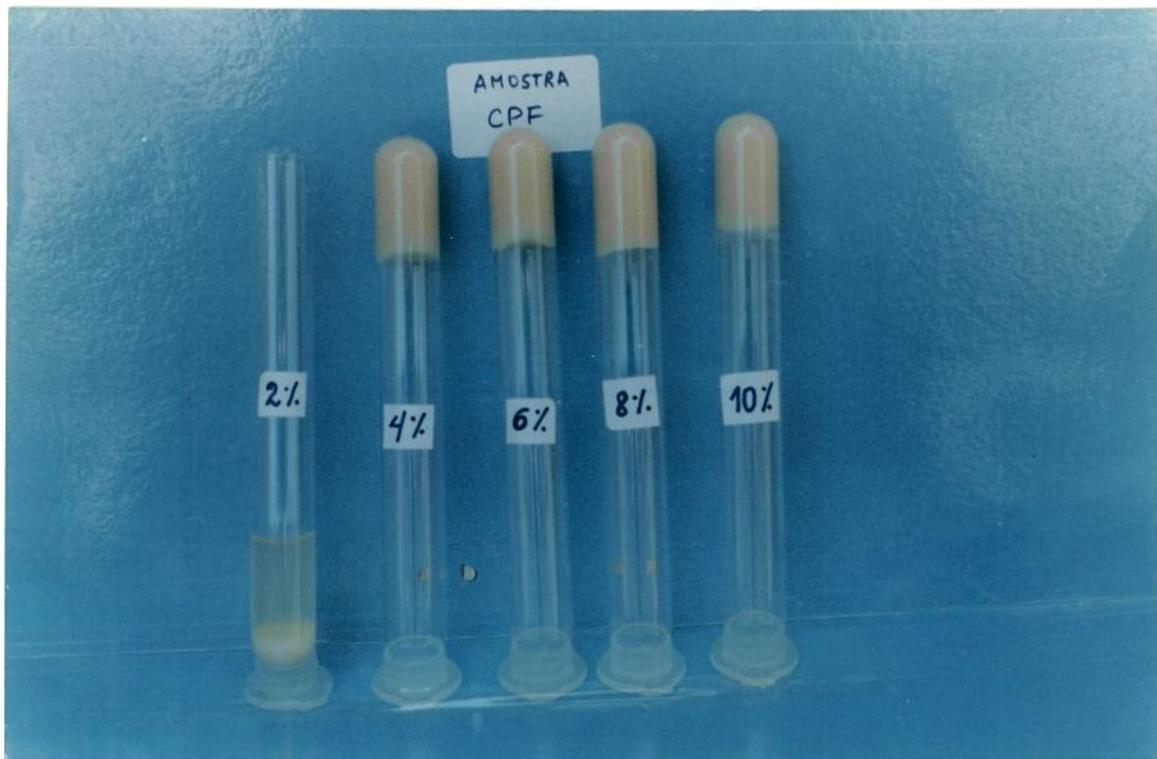


Figura 13. Tubos com géis da amostra CPF formados nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10% de proteína.

Os parâmetros de textura dos géis formados com 8% e 10% de proteína, encontram-se na Tabela 10 . Verifica-se que a concentração não alterou o parâmetro de dureza, mas foi marcante para a fracturabilidade e adesividade. A concentração de 8% não apresentou resistência a penetração da sonda (fracturabilidade), devido sua consistência mais fraca, refletindo posteriormente na adesividade, ou seja, na aderência do gel à sonda, havendo necessidade de maior esforço para a sonda retornar a posição inicial.

Tabela 10. Parâmetros de textura para a amostra CPF em diferentes concentrações.

PARÂMETRO (gf)	CPF 8%	CPF 10%
DUREZA	34,0 ± 2,9 <sup>a</sup>	35,0 ± 2,8 <sup>a</sup>
FRACTURABILIDADE	na	31,0 ± 3,6
ADESIVIDADE	-15,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	-9,0 ± 2,0 <sup>b</sup>

Concentração expressa em % de proteína. a,b, letras diferentes numa mesma linha indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre parâmetros ; na = não apresentou.

Para as amostras CP e CPP, não houve formação de gel nestas mesmas concentrações, observando-se uma separação de fases durante o período de transição de prógel-gel, no resfriamento. Baseado nos resultados obtidos da alta capacidade de retenção de água e viscosidade, onde evidenciou-se a presença marcante de interações do tipo proteína-água, poder-se-ia supor como mecanismo de geleificação da amostra, a imobilização de água por adsorção. Esse mecanismo contudo, talvez não seja o único responsável pela geleificação, mas provavelmente exerce um efeito predominante, pois as outras amostras de levedura nas mesmas condições do teste não formaram gel.

A teoria de adsorção de solvente fundamenta-se na ocorrência de um aumento do volume das moléculas durante o resfriamento, que acabam se tocando ou sobrepondo de tal maneira que todo o sistema (solvente/soluto) torna-se imobilizado e rijo (Sgarbieri, 1996). Provavelmente o inchamento e sobreposição das moléculas de proteína tenha viabilizado a formação de uma estrutura ordenada, com ligações interprotéicas que reforçaram a estrutura do gel, durante o resfriamento.

Em géis de isolados protéicos de soja comerciais (15%) onde as condições de processamento incluem a aplicação de calor ou produtos químicos, Fiora et alli (1990) observaram, que existia uma correlação positiva da dureza e fracturabilidade do gel com a capacidade de absorção e retenção de água. Concluíram no entanto, que

embora o mecanismo de geleificação possa estar baseado na imobilização de água por absorção, existe adicionalmente, a formação de uma rede tridimensional através da desnaturação e ligações cruzadas das proteínas. Em géis de IPS a 20% de concentração, Furukawa e Otha (1982), observaram também uma correlação positiva da formação de géis com a capacidade de retenção de água.

Na Figura 14 pode-se visualizar os tubos com as diferentes amostras na concentração de 10% de proteína. Observou-se que as amostras CP e CPP formaram duas fases distintas, enquanto o IPS formou um gel muito fraco, sem consistência ao ser retirado do tubo.

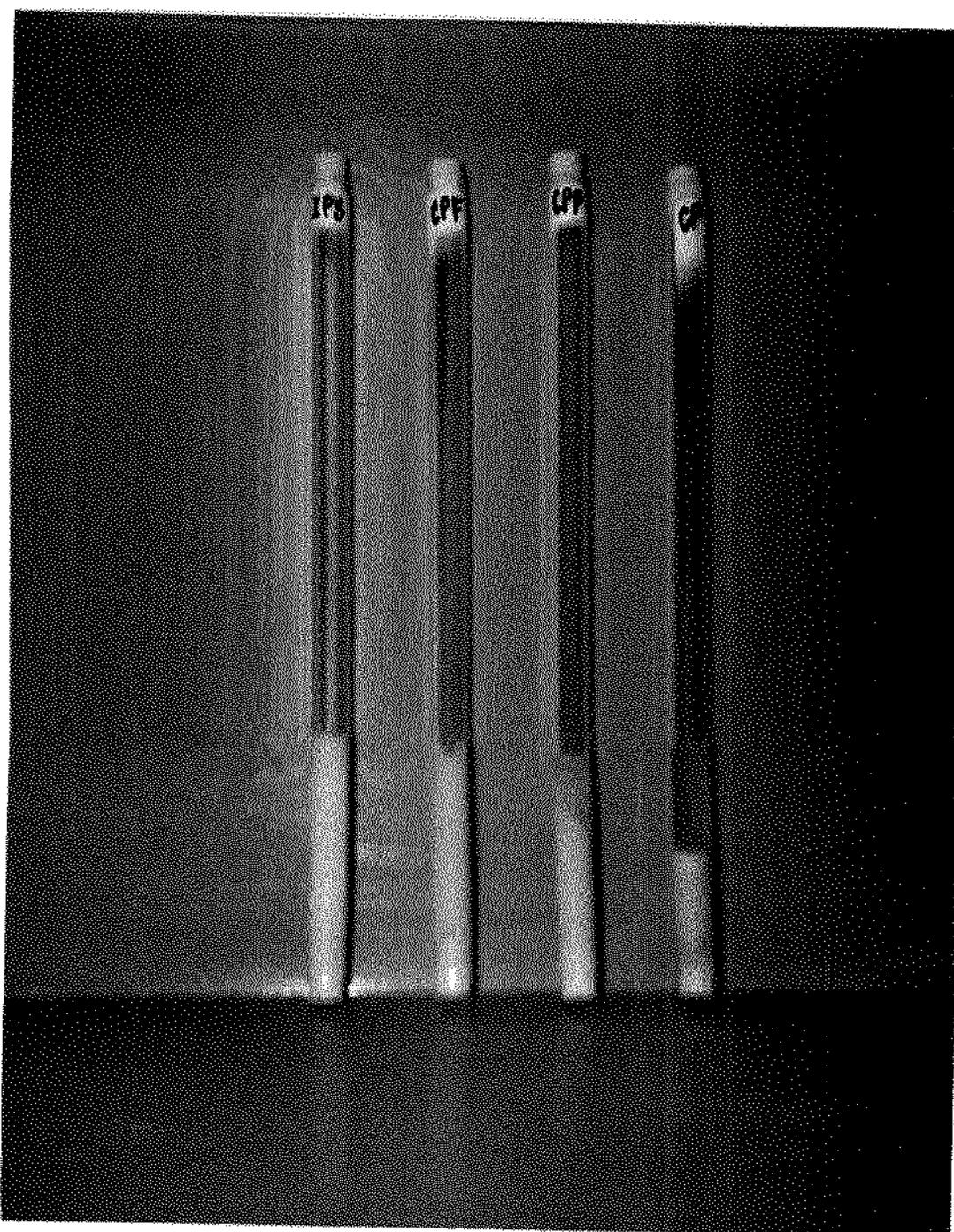


Figura 14. Capacidade de geleificação das amostras IPS, CPF, CPP e CP na concentração de 10%.

O efeito da adição de NaCl a diferentes concentrações de CPF a 10% pode ser observado na Figura 15. Com a adição de 5, 10 e 30 mM de  $\text{CaCl}_2$ , o gel tornou-se pastoso, sem consistência para realizar as medições de textura. A presença 0,6M de NaCl elevou tanto a dureza como, e principalmente, a fracturabilidade dos géis. Nas outras concentrações houve uma redução na dureza e fracturabilidade, sendo ligeiramente mais acentuada para a adição de 0,4M de NaCl.

De acordo com Murvihill e Kinsella (1988) a influência dos sais nos géis é bem variada, de acordo com a natureza da proteína. Géis de proteína de soro de leite apresentaram força máxima de compressão na presença de 0,2M de NaCl e 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . A dureza do gel de globulinas de arroz aumentou com a concentração de proteínas e força iônica (0,24; 0,6 e 0,9M), foi atribuído a presença de sais um efeito positivo pela supressão da repulsão eletrostática, ocasionando agregação das moléculas de proteína (Yuno-Otha, 1994).

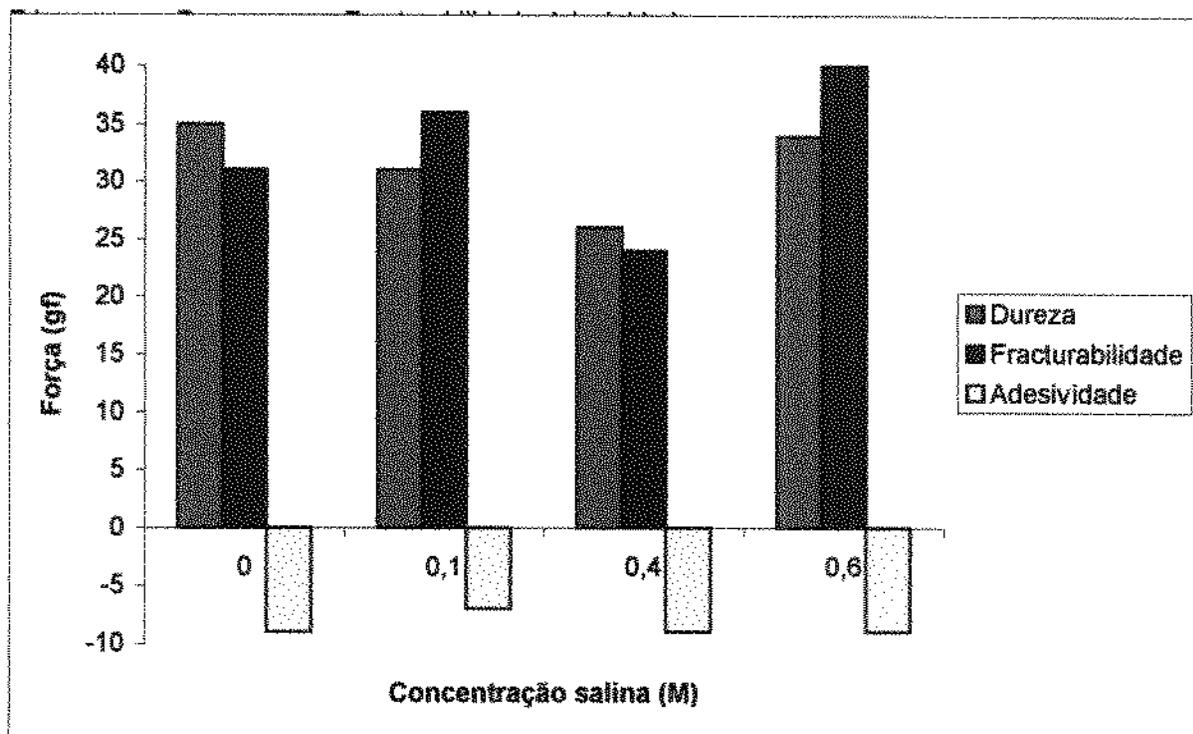


Figura 15. Efeito da força iônica (0,1; 0,4 e 0,6M NaCl) nos parâmetros de dureza, fracturabilidade e adesividade de géis com 10% de CPF.

Verifica-se que para 0,1 e 0,6M de NaCl, o valor da resistência do gel a compressão foi maior que a dureza. Esses resultados podem indicar um fortalecimento das interações hidrofóbicas e das pontes de hidrogênio intermoleculares.

#### 4.6.5 Propriedades emulsificantes

Em razão do grande número de variáveis presentes na avaliação das propriedades emulsificantes, criando dificuldade em comparar-se os dados obtidos, utilizou-se o isolado protéico de soja (IPS) como referência. Os valores da capacidade emulsificante (C.E.), estabilidade da emulsão (E.E.) e índice de atividade emulsificante encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados da capacidade emulsificante (C.E), estabilidade da emulsão (E.E.) e índice de atividade emulsificante (I.A.E.) para dispersões de proteína a 1% em pH 7.

Amostras	C.E. (mL óleo/g proteína)	E.E. (%)		I.A.E. m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
		2 horas	24 horas	
CP	312 ± 7,1 <sup>a</sup>	86,00 ± 3,17 <sup>a</sup>	76,26 ± 2,31 <sup>a</sup>	36,67 <sup>d</sup>
CPP	350 ± 5,6 <sup>b</sup>	75,02 ± 2,34 <sup>b</sup>	64,70 ± 3,47 <sup>b</sup>	52,16 <sup>b</sup>
CPF	492 ± 4,3 <sup>c</sup>	71,66 ± 2,90 <sup>b</sup>	62,68 ± 1,73 <sup>bc</sup>	73,70 <sup>a</sup>
IPS	448 ± 3,9 <sup>d</sup>	72,00 ± 2,61 <sup>b</sup>	61,23 ± 2,78 <sup>c</sup>	45,52 <sup>c</sup>

<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamentos.

A quantidade máxima de óleo que pode ser emulsificada pela dispersão 1% da proteína CPF foi superior as demais amostras, sendo mais próxima ao isolado protéico de soja. Neste caso como os concentrados protéicos a base de levedura não mostraram diferenças marcantes na composição centesimal e aminoacídica, as variações na capacidade emulsificantes poderiam ser atribuídas as alterações provocadas pelo método de extração na estrutura conformacional das moléculas,

mudanças na solubilidade, nas características lipofílicas e hidrofílicas, que conseqüentemente interferem no comportamento interfacial da proteína.

De acordo com Dickinson e Stainsby (1987), as modificações químicas geralmente ajudam a aumentar a carga líquida negativa da proteína, ocasionando mudanças na estrutura e hidrofobicidade da molécula, afetando sua atividade de superfície. Para dispersões a 5% de proteína de soja, Genovese e Lajolo (1993), encontraram o valor de 1143 g de óleo/g de proteína para a capacidade emulsificante e baixa estabilidade ao calor e a força centrífuga, conforme metodologia utilizada. Em preparações com a levedura *Candida utilis*, foram encontrados os valores de C.E. variando de 1213,8 a 1540,1 mL óleo/g de proteína e a estabilidade da emulsão obtida por aquecimento a 95°C/30min entre 79,1% a 87,5%, de acordo com o procedimento de preparo dos concentrados (Schachtel, 1981<sub>b</sub>).

Apesar da capacidade emulsificante da proteína de levedura ter sido aumentada pela adição de TMFS, ela perdeu em estabilidade (18%), quando comparada a núcleo-proteína de levedura (CP). Na avaliação da estabilidade da emulsão após dois períodos de tempo, a emulsão preparada com a amostra CP mostrou maior habilidade em permanecer inalterada. Em geral, proteínas de diferentes origens variam imensamente em sua habilidade de estabilizar emulsões, refletindo suas diferenças na composição, conformação e rigidez estrutural.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que houve uma pequena diferença entre os valores encontrados através da metodologia de Acton e Safle (1970) e daqueles obtidos pelas modificações propostas por McElwain et alii (1975). A diferença foi de 11%, 14%, 13% e 15%, respectivamente, para as amostras CP, CPP, CPF e IPS. Notou-se que dependendo da metodologia utilizada para estabilidade da emulsão o resultado estatístico diferiu. No tempo de 24 horas apenas a amostra CP diferiu estatisticamente das demais ( $p \leq 0,05$ ), enquanto que para o tempo de 2 horas, somente as amostras CP e CPF foram semelhantes.

A redução da estabilidade verificada para a amostra CPF pode ser devido ao excesso de cargas negativas dos grupos fosfóricos adicionados às proteínas adsorvidas aos glóbulos de gordura. Como as cargas dos glóbulos de gordura também são negativas, ocorre provavelmente um desequilíbrio de natureza hidrofóbica da proteína, causando redução da estabilidade. Fenômeno similar foi observado para proteínas de levedura succinilada, onde um aumento da carga negativa provocou um efeito indesejável na estabilidade da emulsão (McElwain et alii, 1975).

O I.A.E. das amostras, que denota a área interfacial coberta pela proteína, refletiu a grandeza dos valores obtidos para a capacidade emulsificante, com exceção do IPS. Os valores da proteína de levedura fosforilada, mostrados na Tabela 11, foram diferentes aos descritos por Huang e Kinsella (1987), que obtiveram  $109 \text{ m}^2/\text{g}$  de proteína fosforilada com  $\text{POCl}_3$  e  $34 \text{ m}^2/\text{g}$  para o IPS. A grande dificuldade em comparar os valores do IAE entre trabalhos, consiste no fato deste índice não ser uma propriedade só do material testado em si, mas uma propriedade do sistema como um todo. O volume de emulsão, tipo de aparelho emulsificante, velocidade e duração desta operação, tipo e quantidade de óleo são fatores que podem afetar o grau de dispersão do óleo (Pearce e Kinsella, 1978).

Em outras publicações, as proteínas de levedura modificadas por succinilação tiveram o IAE aumentado em função da extensão da succinilação. De acordo com Pearce e Kinsella (1978), o IAE foi de 332 e  $204 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  para 62% e 24% de succinilação respectivamente, em pH 8. Os valores elevados do IAE foram atribuídos ao fato das proteínas modificadas serem completamente solúveis, ao contrário das proteínas não modificadas que apresentaram o valor de apenas  $59 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  para o índice de atividade emulsificante. Para proteínas de levedura fosforiladas Huang e Kinsella (1987), encontraram valores de 109 e  $165 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ , para os pHs de 6,5 e 8,0, respectivamente.

As curvas da capacidade e estabilidade da emulsão em função da concentração podem ser observadas na Figura 16. A curva do comportamento da C.E. em função da concentração, traçada a partir dos dados experimentais, pode ser descrito pela

seguinte equação geral :  $C.E. = a_1C^3 + a_2C^2 + a_3C + a_4$  , onde o ajuste do polinômio foi feito pelo método dos mínimos quadrados, sendo o coeficiente de correlação de 0,9953.

A curva da variação de E.E. em função da concentração, foi ajustada por regressão linear, onde o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9714, indicando um ajuste preciso dos dados experimentais.

Verificou-se que ocorreu uma diminuição da capacidade emulsificante com o aumento da concentração, provavelmente devido a um excesso de proteína, onde nem toda proteína dispersa em água tornou-se adsorvida na camada interfacial, subestimando desta maneira o valor da quantidade de óleo emulsionada por grama de proteína. Numa avaliação da C.E. do proteinato de soja em pH 7, Pearson et alii (1965), verificaram que a medida que se elevava o teor de nitrogênio protéico, nas preparações de emulsões, o valor da capacidade de emulsificação era reduzida. Em testes com proteínas de células de levedura, a capacidade de emulsificação foi reduzida em função do aumento da concentração, e a estabilidade avaliada por simples observação visual após 12 horas de estocagem, foi de 55% (Hidalgo, 1978).

Verifica-se, contudo, que a estabilidade da emulsão foi afetada favoravelmente com o aumento da concentração. Os resultados foram concordantes com Elizalde et alii (1991a), que encontraram uma correlação significativa entre o aumento da concentração de proteína e de óleo, com a estabilidade da emulsão. De acordo com Leman e Kinsella (1989), as proteínas formam uma camada de cargas ao redor das gotículas de gordura, causando uma repulsão mútua, reduzindo a tensão interfacial e prevenindo a coalescência. O aumento da concentração de proteína facilita a adsorção de maior número de proteínas nos glóbulos de gordura, resultando num aumento da estabilidade da emulsão

A variação da capacidade emulsificante em função do pH pode ser observada na Figura 17. Conforme o pH se distancia do ponto isoelétrico da proteína ocorreu uma elevação da capacidade emulsificante, sendo observado valores semelhantes para o

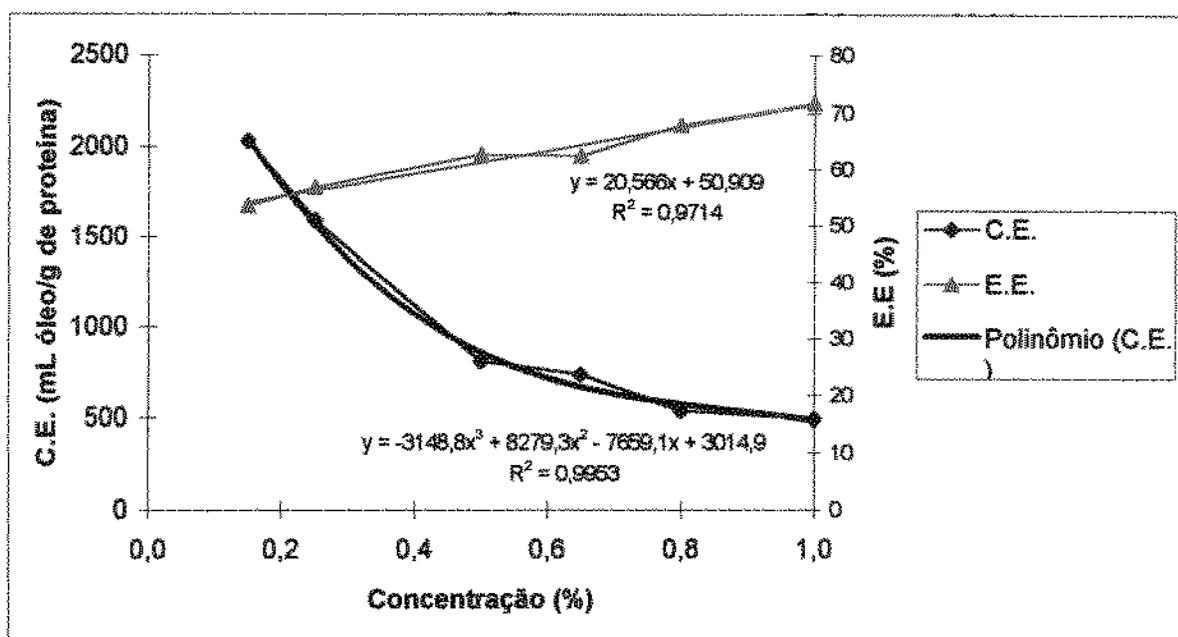


Figura 16. Valores da capacidade emulsificante (C.E.) e estabilidade da emulsão (E.E.) da amostra CPF em água.

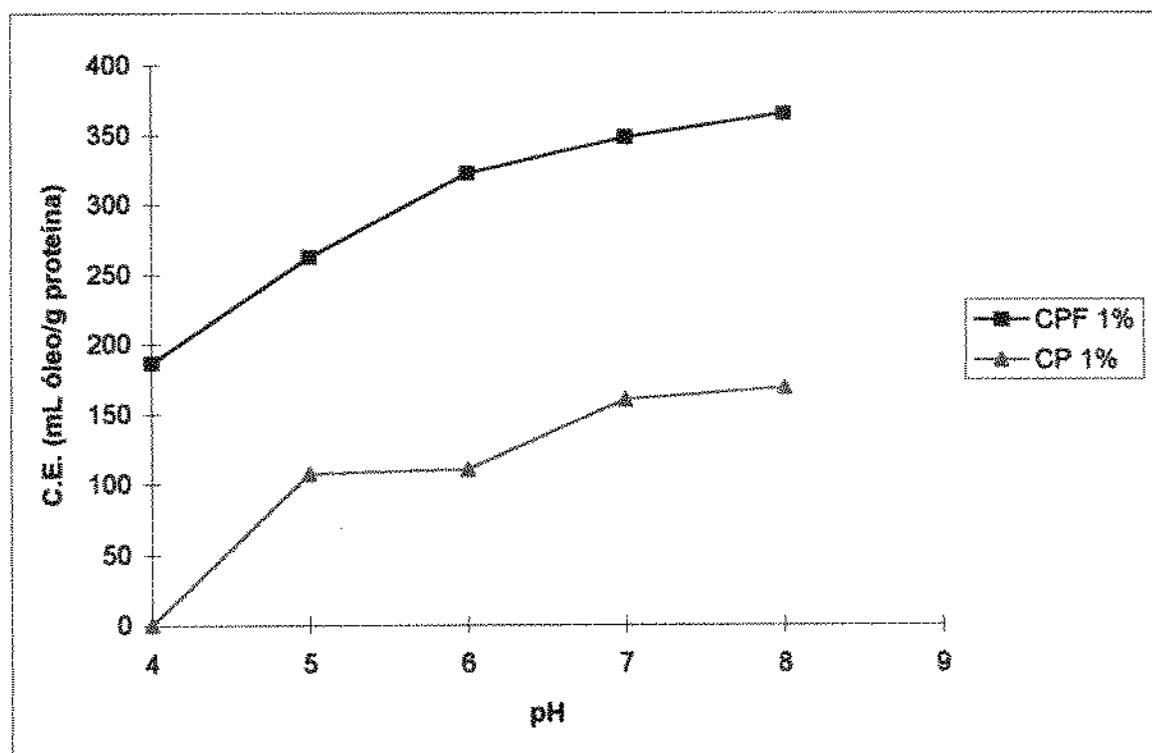


Figura 17. Capacidade Emulsificante dos concentrados protéicos de levedura em função do pH (velocidade de 10.000 rpm).

pHs 7 e 8. Esse comportamento foi verificado para proteínas de diversas origens, onde o distanciamento do pI ocasiona um aumento na carga elétrica e possivelmente melhora a solubilidade da proteína em água (MacWatters e Holmes, 1979; Shahidi et alii, 1984; Schachtel, 1981; Huang e Kinsella, 1987).

As propriedades emulsificantes da proteína de soja tem sido correlacionadas com sua solubilidade e decresce a um nível mínimo na região isoelétrica, no mesmo caminho que as outras proteínas (Aoki et alii, 1981). A correlação da capacidade emulsificante com a solubilidade está sujeita a controvérsias, sendo a emulsificação mais relacionada a hidrofobicidade de superfície das moléculas. Proteínas mais hidrofóbicas ocasionam maior decréscimo na tensão interfacial e conseqüentemente melhoram as propriedades emulsificantes (Voutsmas et alii, 1983).

Em nossos estudos mesmo em pH 5, onde apenas 30% do nitrogênio apresentaram-se solúveis, comparado a 81% de nitrogênio solúvel em pH 8, a capacidade de emulsificação foi relativamente elevada. A amostra CP não formou emulsão no pH 4, provavelmente devido a carga líquida da proteína ser próxima a zero, com a mínima reatividade e solubilidade, ficando coaguladas na dispersão. O fato da amostra CPF formar emulsão a pHs mais ácidos favorece seu campo de aplicação, uma vez que grande número de alimentos encontra-se nesta faixa de pH, como é o caso de embutidos cárneos, onde a proteína adicionada precisa apresentar capacidade de emulsificação na faixa de pH 5,1 a 5,3.

O comportamento da capacidade de emulsificação de dispersões 0,25% e 1,0% de concentrado protéico de levedura fosforilado, em função da força iônica encontra-se na Figura 18. As alterações das propriedades eletrovalentes da proteína, ocasionadas por mudanças no meio iônico, tiveram maior influência nas dispersões mais diluídas, sendo a percentagem de redução da C.E. menor a concentração de 1,0%. A capacidade do sal em reduzir a capacidade emulsificante pode ter sido devido ao efeito "salting out", ocasionando interações entre proteínas, diminuindo conseqüentemente sua disponibilidade a interface óleo-água (Huang e Kinsella, 1987).

#### 4.6.6 Propriedades espumantes

A análise comparativa da capacidade de formação de espuma ( $FE_s$ ) e sua habilidade em permanecer inalterada, detectada pela estabilidade da espuma ( $EE_s$ ) após o período de 30 e 60 minutos, encontram-se na Figura 19. Verificou-se que apenas a amostra CPP diferiu-se das demais, em relação a formação de espuma, não sendo constatada diferença significativa para as dispersões a 1% em pH 7, das amostras CP, CPF e PCO (proteína da clara do ovo). No entanto, para os valores da estabilidade da espuma após 30 e 60 minutos, a amostra CP mostrou-se inferior às demais amostras.

A proteína da clara de ovo desidratada foi escolhida como padrão de referência das condições experimentais, porque é a proteína mais utilizada pela indústria de alimentos, e conseqüentemente reúne um grande número de trabalhos publicados. Devido suas características físico-químicas, ela possui a capacidade de formar bolhas uniformes de bom volume, assegurando a estabilidade da espuma na presença de outros compostos e também sob aquecimento (Kinsella, 1981).

Geralmente são utilizados dois processos para caracterizar a estabilidade da espuma; a drenagem do líquido e o colapso da coluna de espuma. Pelos dados experimentais, obtidos da drenagem de líquido da espuma em função do tempo, utilizou-se modelo matemático proposto por Elizalde et alii (1991b), sendo que a equação permite descrever com precisão a drenagem do soro para as diferentes proteínas em estudo. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 12 .

Embora as amostras CP e CPF tenham apresentado a mesma capacidade em formar espuma ( $P \leq 0,05$ ) difiram quanto à habilidade de manter a espuma inalterada em função do tempo. A meia-vida da espuma, que corresponde ao tempo necessário para drenar metade do volume máximo de líquido ( $V$ ), serviu como parâmetro de comparação da estabilidade da espuma para as diferentes amostras.

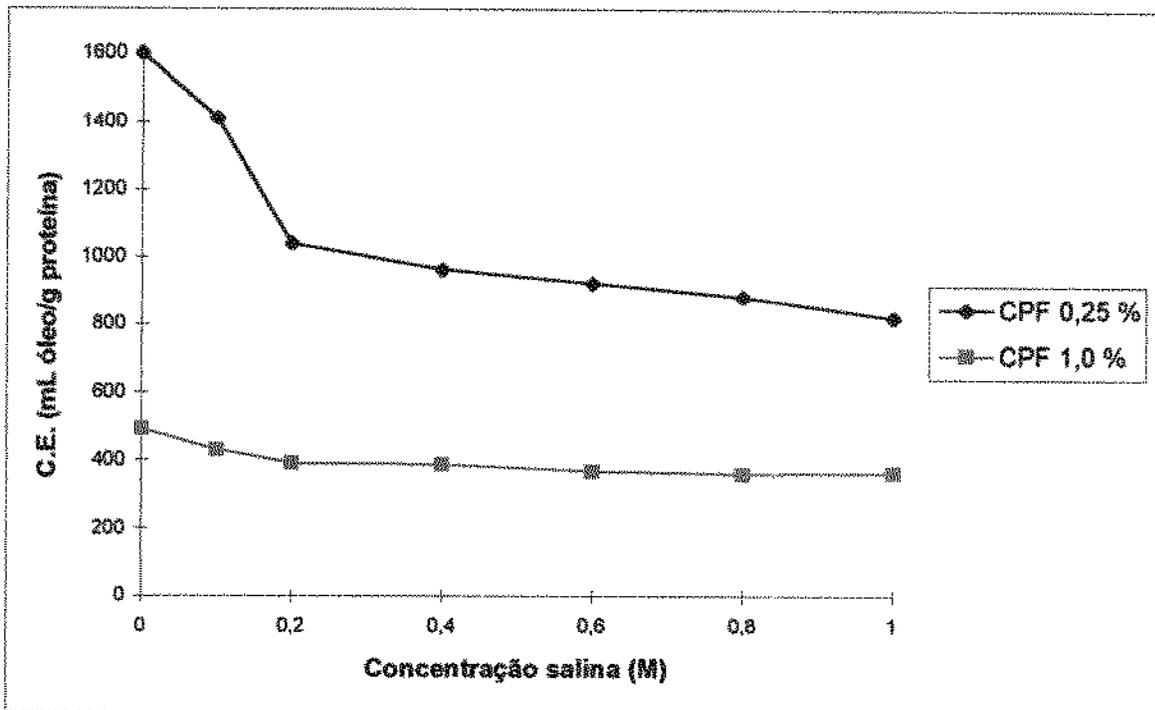


Figura 18. Valores da C.E. de concentrados Proteicos Fosforilados (1% e 0,25%) em função da concentração salina (NaCl) em pH 7.

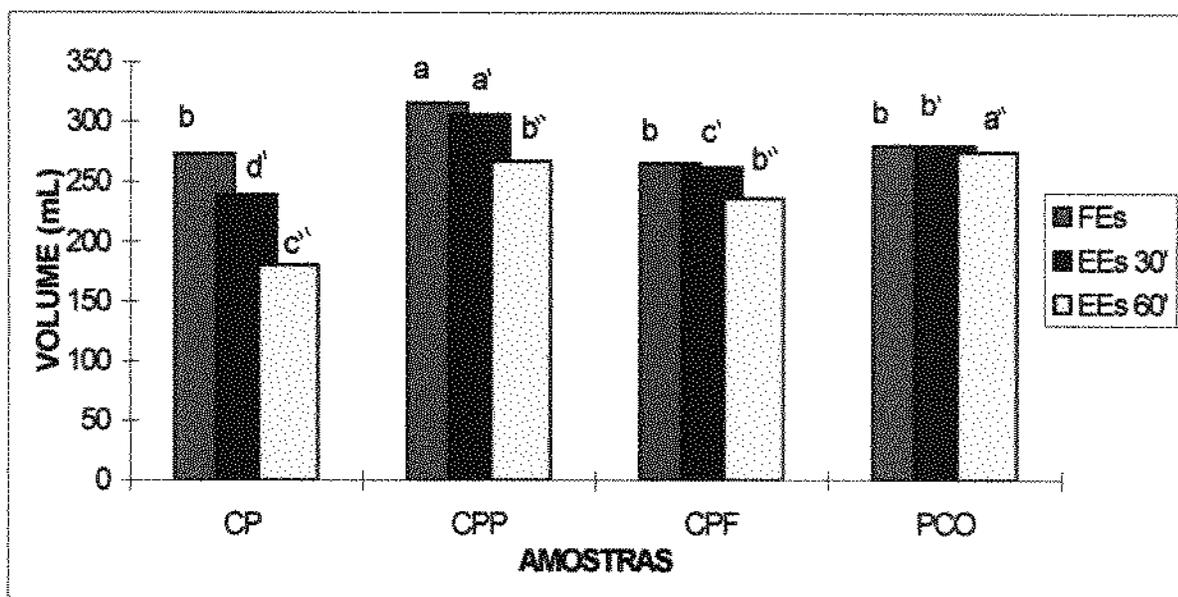


Figura 19. Propriedades de formação de espuma (FEs) e estabilidade da espuma (EEs) após 30 e 60 minutos para diferentes amostras de levedura e proteína de clara de ovo (PCO) a 1% em pH 7,0. a,b,c,d - indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )

Tabela 12. Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões a 1% e pH 7, de proteínas de levedura comparadas a proteína da clara de ovo.

AMOSTRA	V (mL)	B (min.)	$R_0$ (mL/min)	$K$ (mL.min) <sup>-1</sup>
CP	70	2,06	33,98	0,0071
CPP	75	4,50	16,67	0,0030
CPF	66	3,72	17,74	0,0041
PCO	70	3,75	18,67	0,0039

V= volume máximo de soro drenado; B= tempo de meia-vida da espuma; K= constante de drenagem;  $R_0$ = taxa de drenagem inicial; PCO= proteína da clara do ovo.

A meia-vida (B) da espuma CPF, registrada na Tabela 12, foi superior a CP, indicando que a amostra apresentou uma taxa média de drenagem inicial ( $R_0$ ) e constante de drenagem ao longo do tempo (K) inferiores a amostra CP.

A estabilidade superior, da espuma da proteína CPF em relação à CP, pode estar relacionada com o aumento da capacidade de retenção de água e viscosidade superficial da proteína modificada por fosforilação. Os grupos fosfatos adicionados aos resíduos serina podem ter facilitado a retenção de água na lamela formada entre as bolhas de ar, com isso retardando a drenagem. De acordo com German et alli (1985), uma vez formado o sistema de bolhas de espuma, sua estabilidade, ou seja, a resistência das lamelas à drenagem torna-se dependente das propriedades reológicas e adesivas do filme interfacial que circunda o gás.

Pelo fato da amostra CPP ter apresentado o perfil de solubilidade e capacidade de retenção de água inferiores às amostras CP e CPF, acredita-se que as características espumantes do concentrado CPP foram relacionadas a alterações estruturais da proteína, provocadas pelo processo de extração com perclorato de sódio. Após a extração dos ácidos nucleicos, localizados no interior das moléculas de proteína, e lavagens sucessivas para retirada do sal em excesso, os polipeptídios podem ter adquirido uma conformação mais densa, enovelada, com ligações

intermoleculares. Por efeito da energia introduzida ao sistema, produzida pela força mecânica do agitador, as proteínas foram capacitadas a adsorver e orientar-se na interface, onde as ligações intercadeias possibilitaram a formação de filmes mais coesos, com maior capacidade em aprisionar o ar introduzido ao meio líquido.

O valor médio da constante inicial de drenagem ( $R_0$ ) para a proteína da clara de ovo, foi superior aos valores citados na literatura. Elizalde et alii (1991<sub>b</sub>), encontraram o valor médio de  $R_0$  de 0,11 para o volume de 10 mL de dispersão, que corresponderia a  $R_0=1,1$ , para o volume de 100 mL, como utilizado em nossos estudos. Como as dispersões da literatura foram preparadas na concentração de 3%, acredita-se que a diferença entre os valores, seja devido a estabilidade adicional proporcionada pela concentração mais elevada de proteína, refletindo numa taxa de drenagem menor.

Pela análise comparativa da amostra CPF em diferentes concentrações, exposta na Tabela 13, percebeu-se que o valor da constante de drenagem inicial foi uma função inversa da concentração. À medida que as concentrações utilizadas no preparo das dispersões aumentaram, ocorreu uma diminuição tanto dos valores médios da taxa de drenagem inicial ( $R_0$ ) como das constantes de drenagem ao longo do tempo ( $K$ ), refletindo um acréscimo no tempo de meia-vida e na estabilidade da espuma. Em concentrações mais elevadas ocorreu a formação de filmes de proteínas mais densos, que facilitaram as interações entre proteínas, propiciando maior retenção de líquido entre as lamelas, aumentando a estabilidade das bolhas de ar tanto ao colapso quanto à drenagem.

O aumento da concentração interferiu positivamente na capacidade de formação de espuma e na estabilidade, indicando que houve difusão de maior número de proteínas à interface e conseqüentemente tornaram-se mais hábeis a reter o soro, pela formação de filmes mais coesos e elásticos. Como espumas mais estáveis apresentam maiores valores de B e os valores de K mais baixos, a amostra de CPF 1,5% ficou com a maior estabilidade.

Tabela 13. Capacidade de formação de espuma (FEs) e parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma para a amostra CPF em diferentes concentrações.

CPF (%)	FEs (%)	B (min.)	K (mL.min) <sup>-1</sup>	R <sub>0</sub> (mL/min.)
0,25	230 ± 5,02 <sup>a</sup>	2,15	0,008	32,09
0,50	268 ± 7,63 <sup>b</sup>	2,60	0,006	26,92
1,00	258 ± 7,51 <sup>b</sup>	3,72	0,004	17,74
1,50	328 ± 6,18 <sup>c</sup>	6,00	0,002	13,34

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ );

B= tempo de meia-vida da espuma; R<sub>0</sub>= taxa de drenagem inicial; K= constante de drenagem.

De acordo com Britten e Lavoie (1992), o índice B, pode ser o mais indicado para comparar a estabilidade da espuma, porque ele não depende do volume inicial da espuma. No trabalho realizado com albumina de ovo, Murphy e Fox (1991) observaram que tanto a formação de espuma como a estabilidade aumentaram com o aumento da concentração de proteína. Uma vez formado o sistema de bolhas de espuma, sua estabilidade ou seja, a resistência da lamela à drenagem, torna-se dependente das propriedades reológicas e adesivas do filme interfacial que circunda o gás. Entretanto, alta viscosidade superficial não é o único fator determinante da estabilidade do filme, inclusive porque excessiva rigidez impede que a superfície do filme se adapte aos choques localizados. Ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas são importantes para formar uma associação forte interpolímeros, envolvendo a bolha de gás. De maneira antagônica, a superfície dos filmes voltados para a região aquosa entre bolhas vizinhas, tendem a formar um ambiente eletrostático de repulsão entre elas, ocasionando um efeito importante para evitar a união das bolhas (German et alii, 1985; Halling, 1981).

De acordo com Mohanty et alii (1988), a natureza anfifática das proteínas, originada da mistura de resíduos de aminoácidos polares e apolares, capacitam-nas a reduzir a tensão interfacial e a energia mecânica necessária para formar a espuma.

Esse caráter anfifático é influenciado pelo pH e natureza iônica do meio-ambiente da proteína.

Os resultados da influência da variação do pH nas propriedades espumantes estão dispostos na Tabela 14. O pH exerce uma influência marcante nas propriedades de espuma, particularmente na estabilidade, por seu efeito direto na carga líquida da proteína. As amostras CPF apresentaram formação de espuma, mesmo a pH 4, no entanto a estabilidade da espuma foi inferior, provavelmente porque as proteínas ficaram parcialmente coaguladas neste valor de pH. De acordo com a literatura, desde que não ocorra coagulação, as proteínas formam filmes mais compactos, fortes e deformáveis, devido a máxima adesão eletrostática, onde as proteínas assumem uma estrutura mais compacta, resultando numa redução máxima da tensão interfacial. No entanto, a presença de proteínas coaguladas no filme reduz tanto a estabilidade como a vida da espuma, devido à perda de elasticidade do filme (Kinsella, 1981).

Tabela 14. Capacidade de formação de espuma (CFEs) e parâmetros de drenagem do líquido da espuma para a amostra CPF 0,5% em função do pH.

pH	CFEs (%)	B (min )	$R_0$ (mL/min)	$K$ (mL.min) <sup>-4</sup>
4	90 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,50	60,00	0,05
5	240 ± 5,00 <sup>b</sup>	1,82	39,56	0,008
6	263 ± 2,58 <sup>c</sup>	3,30	22,12	0,004
7	268 ± 7,63 <sup>cd</sup>	3,72	17,74	0,004
8	275 ± 2,53 <sup>d</sup>	4,07	17,65	0,003

<sup>a,b,c,d</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ );

B= tempo de meia vida da espuma;  $R_0$ = taxa de drenagem inicial; K = constante de drenagem.

A capacidade de formação de espuma foi crescente com o aumento do pH, pois proporcionou através do aumento da solubilidade, que as proteínas se difundissem rapidamente a superfície, desdobrando-se e orientando-se, ocasionando conseqüentemente a redução da tensão interfacial e permitindo o aprisionamento de

maior quantidade de gás pelo filme protéico. Os valores de meia-vida da espuma, observados na Tabela 14 refletiram o aumento da capacidade de formação de espuma.

Os valores resultantes da estabilidade da espuma, tanto pela análise da taxa de drenagem como do colapso da coluna de espuma, foram concordantes, demonstrando que há uma elevação da estabilidade quando o pH se eleva. Em relação ao pH verificou-se que os valores da formação e estabilidade da espuma foram superiores para o pH 7, onde a formação de espuma não mostrou-se afetada pela presença de sais. No pH 4 observou-se menor formação de espuma e menor estabilidade, ocorrendo ainda, uma drenagem rápida do excesso de líquido inter-lamelar, resultando em espumas mais secas e frágeis.

A Figura 20 faz uma ilustração da capacidade de formação de espuma (FEs) e a estabilidade da espuma (EEs) após 30 e 60 minutos, medidas pelo volume da coluna de espuma para os pH's 4 e 7 e na ausência e presença de NaCl (0,5 e 1 M).

Verificou-se que os íons que afetam a solubilidade e conformação das proteínas também influenciam as propriedades espumantes. O aumento da força iônica de dispersões em pH 7, não alteraram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a formação de espumas, mas ocasionou acentuado decréscimo na estabilidade da espuma nos intervalos de 30 e 60 minutos. Para o pH 7 a adição de 0,5M de NaCl em relação a amostra ausente de sa, ocasionou uma redução de aproximadamente 33% e 28%, respectivamente, para a  $EE_{30}$  e  $EE_{60}$ . A dispersão CPF 1,0M NaCl apresentou uma redução de 24% para a  $EE_{30}$  e 15% para a  $EE_{60}$ , em relação ao controle (0M NaCl),

A perda de estabilidade no pH 7 pode estar relacionada com a redução na viscosidade dos filmes protéicos, resultando em filmes finos e menos resistentes. Os resultados obtidos são concordantes com estudos realizados para várias preparações de levedura, onde a presença de 3% de NaCl aumentou o volume percentual das espumas, mas ocasionou decréscimo na estabilidade (Schahtel, 1987).

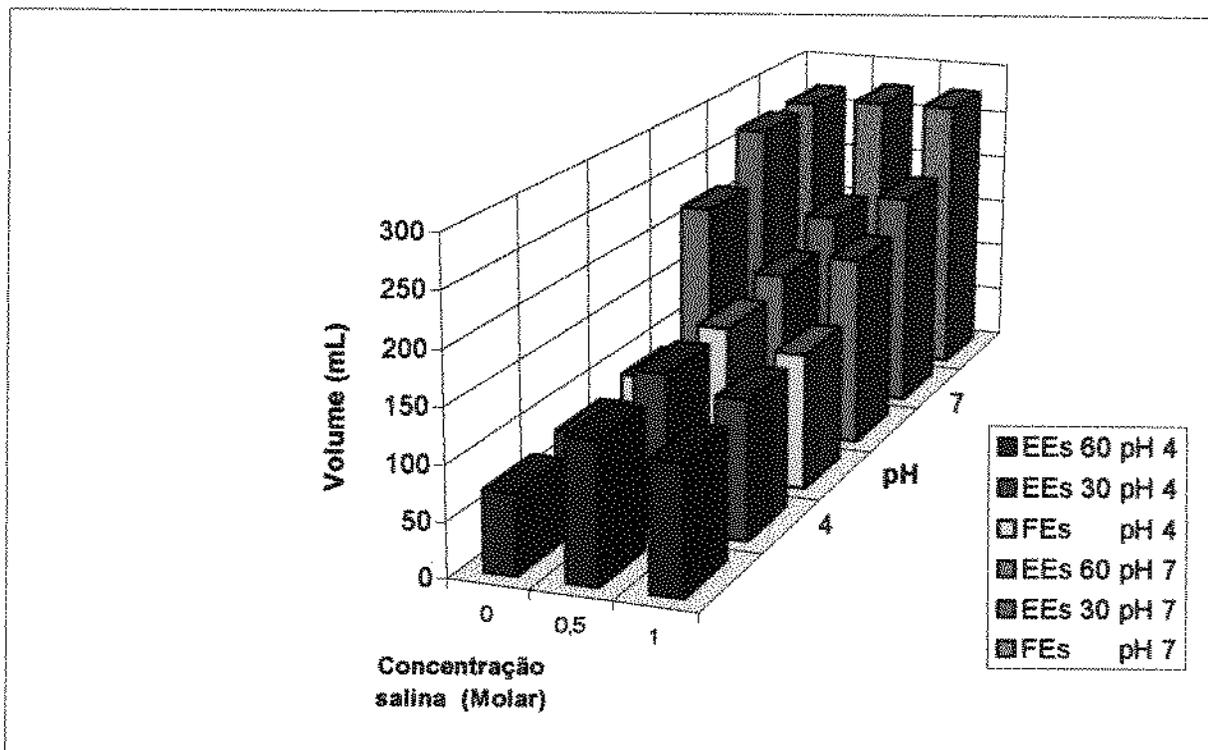


Figura 20. Capacidade de formação de espuma (FEs) e estabilidade da espuma após 30 e 60 minutos, da amostra CPF 0,5 % em função do pH e da concentração de NaCl (0; 0,5 e 1,0 M).

De acordo com Cheftel et alii (1989), o cloreto de sódio aumenta a perda de líquidos e reduz a estabilidade da espuma. No entanto, a contribuição do NaCl em elevar a capacidade de formação de espuma no pH 4 foi notável. Observou-se um aumento na formação de espuma de 61% e 42%, respectivamente, para as concentrações de 0,5M e 1M, em relação ao controle. Neste pH a presença de 0,5M de NaCl ocasionou um aumento de 79% para  $EE_{30}$  e 60% para a  $EE_{60}$ , em relação a CPF ausente de sal. No pH 4 o comportamento da espuma na presença de sal foi oposto ao observado para o pH 7. A elevação da capacidade de formação de espuma para o pH 4 pode ser devido ao aumento na taxa de difusão, proporcionada pelo sal, de acordo com Kinsella (1981), para muitas proteínas o aumento da taxa de difusão, refletem na formação de espumas melhores com bolhas grandes aumentando a quantidade de espuma

#### 4.7 Capacidade de ligar cálcio

As medidas de interação de íons cálcio com as proteínas de levedura fosforiladas, tiveram por objetivo avaliar o potencial das proteínas modificadas servirem como veículo deste íon. Observa-se na natureza, que os componentes da caseína formadas pelas glândulas mamárias, são fosfoproteínas,  $\alpha_{s1}$  -,  $\beta$ - e  $\kappa$ - caseína, contendo 8, 5 e 1 resíduos fosfoseril, respectivamente, onde as micelas de caseína, tem como componente essencial de estabilidade, os íons cálcio (Yoshikawa et alii, 1981).

O estudo da interação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  com a proteína de levedura foi realizado no concentrado protéico sem tratamento (CP); concentrado protéico fosforilado (CPF) e concentrado protéico fosforilado dialisado (CPFd). Todas as preparações continham entre 65-75% de proteína verdadeira e o CPF e CPFd níveis mais elevados de fósforo, 26,5 e 21,9 mg/g, respectivamente, em relação a CP (16,9mg/g).

Este estudo não foi conduzido com proteínas purificadas porque o objetivo principal foi avaliar a capacidade de ligação de cálcio com o concentrado como um todo, considerando a proteína como a maior responsável pela complexação, pois presume-se que a maior parte dos carboidratos se apresentam na forma de glicoproteínas. A precipitação das proteínas, da amostra CPF dispersa em água, com TCA 10% e análise dos carboidratos presentes no sobrenadante, resultaram em 2% de carboidratos solúveis.

A quantidade de cálcio ligado pela proteína foi determinada medindo-se a atividade do cálcio livre, através do eletrodo de membrana seletiva para íons cálcio. Uma vez conhecida a quantidade total de íons cálcio adicionada ao sistema, a quantidade ligada foi obtida pela diferença entre o cálcio inicial total e o cálcio livre, após homogeneização por dois minutos na presença da proteína. Utilizando os dados experimentais contruiu-se o gráfico de Scatchard, na Figura 21, onde compara-se as curvas obtidas para o concentrado protéico sem modificação, concentrado protéico fosforilado e concentrado protéico fosforilado dialisado.

Através do gráfico determinou-se o número de sítios de ligação (N) pela interseção da curva no eixo x e a constante de associação (K), pela inclinação da reta ajustada aos pontos. A constante de associação é uma medida da força de ligação e dá uma indicação da afinidade dos íons cálcio por seus sítios de ligação na molécula de proteína. Portanto, quando os valores da constante de ligação aumenta, mais fortes estes íons estão ligados (Edsall & Wyman, 1966).

Para construir o gráfico de Scatchard as medições são realizadas a baixas concentrações de cálcio ( $10^{-5}$  a  $10^{-3}$ ), para evitar ligações eletrostáticas do íon ao ligante e interações entre os sítios ativos. Caso contrário os gráficos não resultam em linhas retas, dificultando a extrapolação do número de sítios ativos e da constante de associação (Edsall e Wyman, 1966).

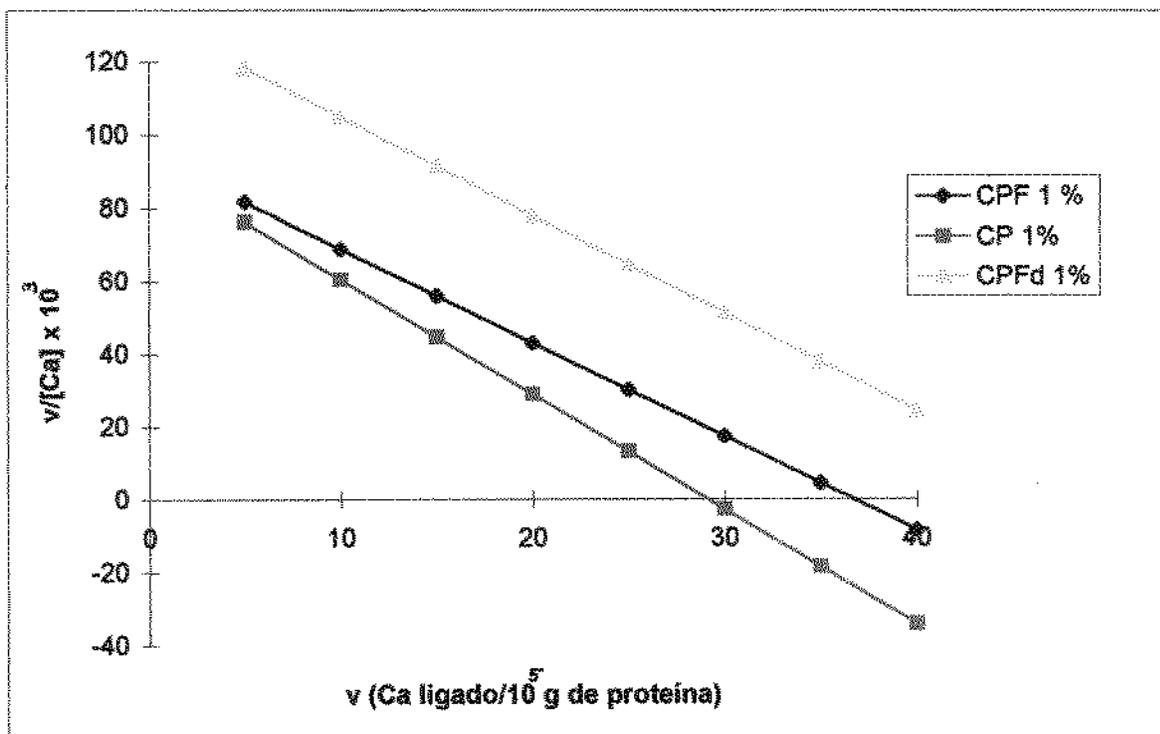


Figura 21. Gráfico de Scatchard para dados de ligação de cálcio ao concentrado protéico sem modificação (CP), concentrado proteico fosforilado (CPF) e concentrado protéico fosforilado dializado (CPFd) na concentração de 1% e pH 6,5

A inclinação das retas demonstrou que a constante de associação é ligeiramente superior para a amostra CP, podendo indicar que embora ocorresse um maior número de sítios de ligação nas amostras CPF e CPFd, as interações realizadas através dos radicais fosfóricos foram menos intensas do que aquelas realizadas com os grupos funcionais dos aminoácidos desprotonados no pH 6,5.

Os valores numéricos apresentados na Tabela 15 para o concentrado protéico fosforilado em diferentes concentrações, foram obtidos a partir do gráfico de Scatchard representado na Figura 22. Utilizou-se nos cálculos a expressão moles de cálcio por  $10^5$  g de proteína, conforme descrito por Carr (1953), para facilitar a comparação entre proteínas diferentes.

Tabela 15. Resultados dos valores de N e K obtidos do gráfico de Scatchard, em pH 6,5 e 0,02M de KCl, para concentrados protéicos de levedura..

AMOSTRA	sítios de ligação	
	N	K x 10 <sup>-3</sup>
CP 1,0%	29	3,16
CPFd 1,0%	49	2,68
CPF 0,5%	44	2,64
CPF 1,0%	37	2,58
CPF 2,0%	36	2,68

CP= Concentrado protéico sem modificação; CPF= Concentrado protéico fosforilado; CPFd= Concentrado protéico fosforilado dializado.

O valor da constante de associação foi a mesma para as amostras CPF e CPFd, reforçando a influência dos grupos fosfóricos na intensidade da associação. Embora a diálise com EDTA, realizada na amostra CPF, contribui favoravelmente para aumentar o número de sítios ligantes, a constante de associação foi a mesma obtida para o CPF sem diálise, podendo indicar que os íons foram complexados pelos mesmos grupos funcionais terminais das cadeias laterais das proteínas.

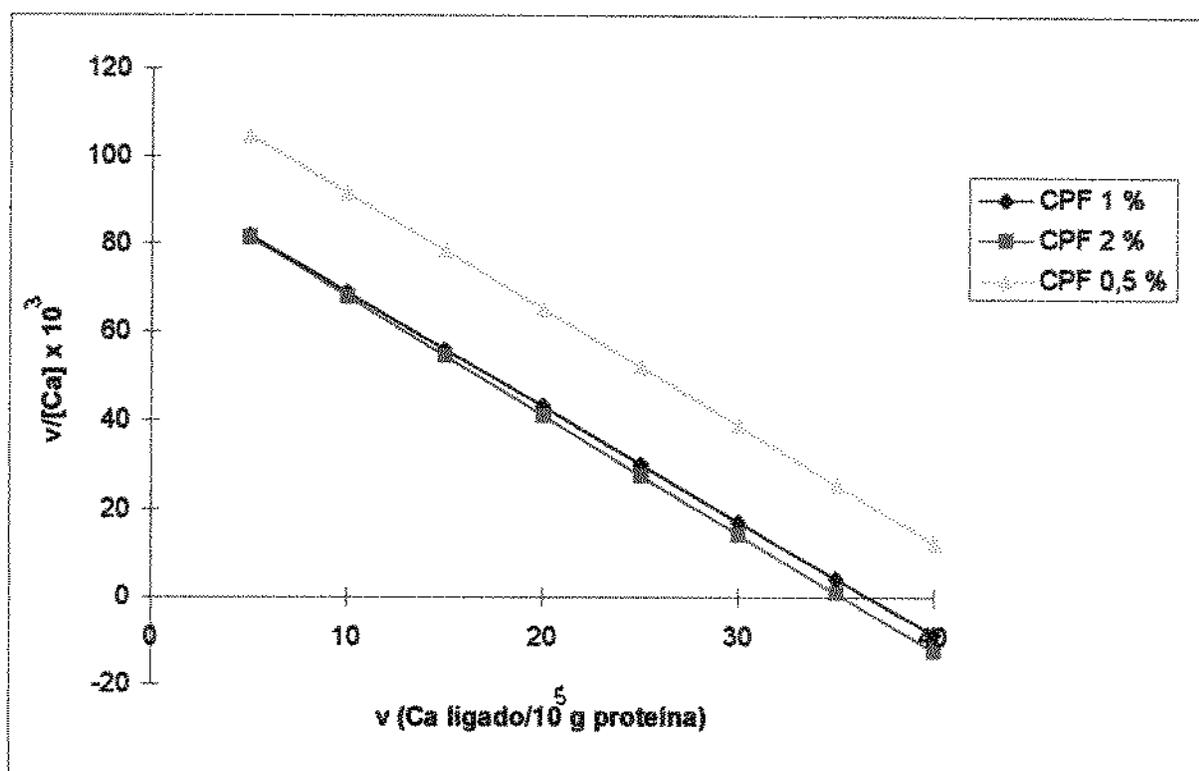


Figura 22. Gráfico de Scatchard para os dados de ligação de cálcio ao concentrado protéico fosforilado no pH 6,5 a diferentes concentrações de íons Ca.

O concentrado protéico sem modificação (CP) exibiu um número de vinte sítios de ligação a menos que o concentrado protéico fosforilado. Esse fato pode ser atribuído a ausência dos grupos fosfatos ligados ao terminal serina, que também realizam interações com o cálcio. Em estudos com proteína de soja nativa, utilizando-se o eletrodo de membrana seletiva, Kroll (1984) encontrou-se o valor de 45 sítios de ligação para  $10^5$  g de proteína e  $K = 2,07 \cdot 10^{-3}$ , nos pHs entre 7 e 8.

Variando a concentração da proteína do CPF em 0,5%, 1,0% e 2,0%, e mantendo as mesmas condições de pH, força iônica e concentração de cálcio, era de se esperar que os resultados fossem similares, uma vez que a concentração da proteína é extrapolada para  $10^5$  g. No entanto a amostra de CPF 0,5% apresentou um número maior de sítios de ligação em relação às demais. O fato da proteína estar dispersa numa quantidade maior de solvente pode ter propiciado uma maior interação soluto-solvente, permitindo a exposição de um maior número de grupos funcionais

laterais. Talvez a interferência, não considerada, da proteína à força iônica do meio, também tenha influenciado os resultados observados.

Os resultados das medidas experimentais para comparação da associação em função da quantidade de cálcio estão descritos na Tabela 16. Todas as medidas foram realizadas em pH (6,5) e força iônica constante (0,02M KCl), variando apenas a concentração de cálcio. Verifica-se que o aumento da concentração em todos os casos ocasionou um efeito positivo na ligação do íon à proteína. Observou-se que a ordem decrescente de ligação foi CPFd > CPF > CP. O concentrado protéico fosforilado (CPF) foi capaz de ligar duas vezes mais íons cálcio, nas duas concentrações estudadas, do que o concentrado núcleo-protéico (CP). Contudo, o CPFd ligou aproximadamente quatro vezes mais íons cálcio que o CP e duas vezes mais cálcio que o CPF.

No primeiro caso, o aumento de ligação do cálcio pela amostra CPF foi atribuído à presença do fósforo, pois de acordo com estudos da literatura realizados com as proteínas de soja, lactoalbuminas e caseína, a presença de fósforo interfere na complexação proteína-cálcio, elevando a medição do número de sítios ativos (Kroll, 1984; Yoshikawa et alii, 1981; Woo e Richardson, 1983).

Tabela 16. Ligação dos íons cálcio ao CP, CPF e CPFd em diferentes concentrações de cálcio ativo (pH=6,5).

Amostra	Ca <sup>2+</sup> ativo mmoles/ L	Ca <sup>2+</sup> ligado moles/ L	Ca <sup>2+</sup> ligado moles/ 10 <sup>5</sup> gProt
CP <sup>(a)</sup>	4,50	0,60	14,89
CP	0,42	0,26	6,45
CPF <sup>(b)</sup>	4,50	1,30	37,36
CPF	0,50	0,46	11,98
CPFd <sup>(c)</sup>	5,00	2,20	63,22
CPFd	0,50	0,49	14,00

<sup>(a)</sup>, concentração do CP = 4,0 (g/L); <sup>(b)</sup>, concentração do CPF = 3,5 (g/L); <sup>(c)</sup>, concentração do CPF dializado = 3.5 (g/L).

Outra questão a ser levantada, seria da conformação protéica, uma vez que o número de íons cálcio ligados à proteína depende tanto do grau de dissociação eletrovalente dos aminoácidos como e principalmente das mudanças conformacionais que acompanham a dissociação (Edssal e Wyman, 1966). Como a amostra CP apresentou um teor elevado de RNA, formando um complexo núcleo-proteína de grande estabilidade, essa conformação estereoquímica pode ter dificultado a associação  $\text{Ca}^{2+}$ -proteína. A fosforilação desestabilizou o complexo núcleo-protéico e introduziu cargas negativas à proteína, resultando num afrouxamento da estrutura e conseqüentemente possibilitando a exposição de um maior número de resíduos laterais dos aminoácidos (Huang e Kinsella, 1987).

Os aminoácidos que compõem as proteínas podem ser divididos em três tipos: os básicos ( $\text{NH}_3^+$ ), os hidroxílicos ( $\text{OH}^-$ ) e os carboxílicos ( $\text{COO}^-$ ) de acordo com seu grupo funcional predominante. Em proteínas de alto peso molecular ocorre tanto a interação entre alguns grupos de cargas oposta como o ocultamento de outros, onde o valor do pI será o resultado da estruturação protéica. Portanto de acordo com o pH, os aminoácidos ionizáveis das cadeias laterais da molécula de proteína, dissociam seus prótons, sendo que o número de cada grupo ligante pode ser medido através de uma curva de titulação (Farfán, 1990). As interações do íon  $\text{Ca}^{+2}$  ocorrem com maior intensidade para valores de pH acima de 4, quando inicia a desprotonização dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Considera-se que em pH ácido (em torno de 4) estão desprotonados os grupos carboxílicos, em neutro os grupamentos imidazólicos e no básico os aminos e fenólicos

A representação gráfica dos dados experimentais da variação de cálcio ligado em função do pH encontra-se na Figura 23, e os valores obtidos através destas curvas na Tabela 17.

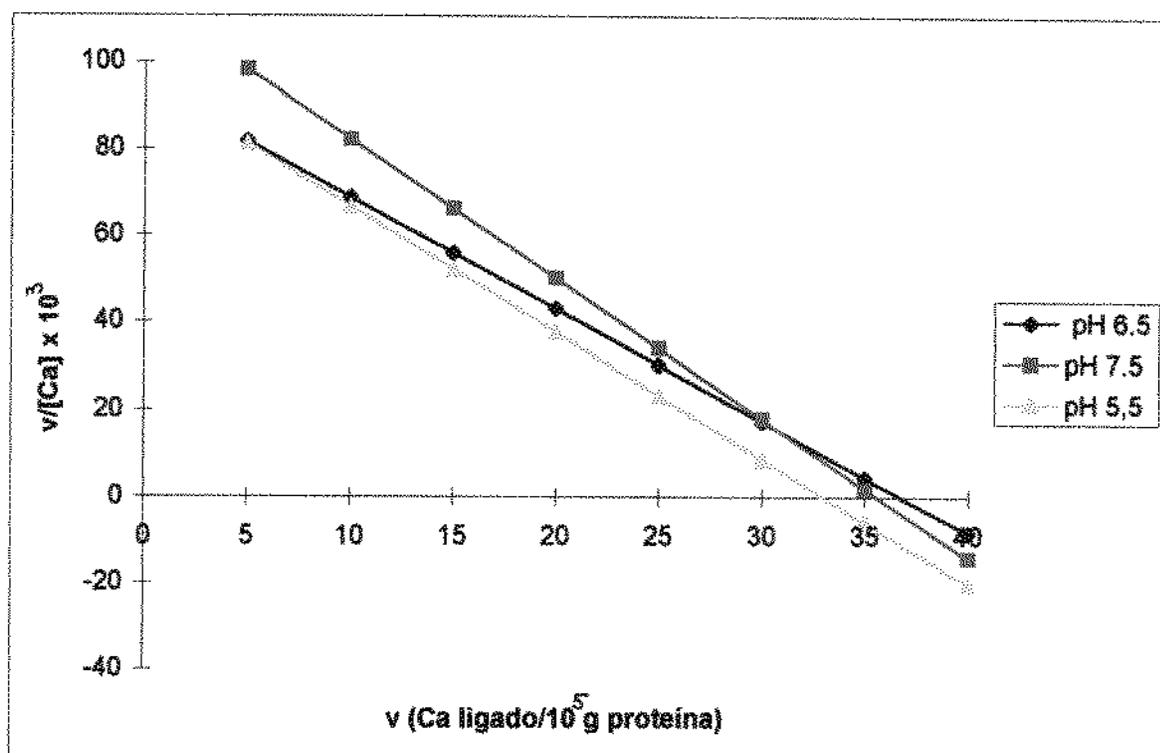


Figura 23. Gráfico de Scatchard para os dados de ligação de cálcio ao concentrado protéico fosforilado (CPF) 1% em diferentes pH's

Tabela 17. Resultados dos valores de N e K obtidos do gráfico de Scatchard, para CPF(1%) em função do pH.

pH	N (sítios de ligação/10 <sup>5</sup> g proteína)	K x 10 <sup>-3</sup> (Cte associação)
5,5	33	2,91
6,5	37	2,58
7,5	36	3,22
7,8	39	1,76

A variação no número de sítios de ligação foi pequena, sendo as maiores alterações em relação a constante de dissociação. Para valores de pH acima de 7,8 não foi possível realizar medições, pelo fato de que todo cálcio adicionado foi precipitado, provavelmente na forma de hidróxido de cálcio, não ficando cálcio livre

para ser dosado. O maior valor da constante de associação ocorreu no pH ao redor de 7,5, onde tanto os grupos carboxílicos e imidazólicos como os fosfóricos encontram-se desprotonados e portanto reativos à complexação com cátions (Kuntz, 1971).

#### 4.8 Propriedades nutritivas

##### 4.8.1 Avaliação "in vitro"

Os resultados das análises nutricionais "in vitro" encontram-se na Tabela 18. Os valores da análise da lisina biodisponível para as diferentes amostras comparadas aos valores da composição aminoacídica da Tabela 7, forneceram a porcentagem de biodisponibilidade da lisina em relação ao conteúdo total.

TABELA 18. Teor de lisina disponível, digestibilidade "in vitro", utilização líquida da proteína (NPU-C) e valor biológico calculado (VB-C).

Índices de avaliação (%)	CLR	CP	CPF	CPP
Lisina disponível	6,39	5,69	7,07	5,06
Digestibilidade	83,06	87,98	89,45	91,72
VB-C	86,22	86,85	83,59	83,83
NPU-C	71,61	76,42	75,76	76,89

CLR = levedura rompida; CP = concentrado protéico sem modificação; CPF = Concentrado protéico fosforilado; CPP = Concentrado protéico extraído com perclorato.

Para as células rompidas 89% da lisina presente apresentou-se biodisponível. A amostra CPF apresentou 83% da lisina biodisponível, indicando que apesar da reação de fosforilação com TMFS ter sido realizada em meio fortemente alcalino (pH 11) a lisina foi pouco afetada. Portanto confirmou-se a hipótese de Sung et alii (1983), de que os grupos  $\epsilon$ -amino da lisina são protegidos durante o processo de fosforilação, ficando biodisponíveis à medida que o pH é acidificado. O procedimento de extração da proteína com perclorato de sódio embora seja realizada em condições mais brandas

de pH (8) e a temperatura ambiente, ocasionou maior perda na biodisponibilidade da lisina.

Os concentrados protéicos sem tratamento (CP), fosforilado (CPF) e extraído com perclorato de sódio (CPP) apresentaram digestibilidade superiores à da proteína de células rompidas, o que pode ser atribuído à possibilidade de parte das proteínas permanecerem associadas a fragmentos de paredes celulares. Embora derivados do TMFS permaneceram ligados a 35% dos resíduos de aminoácido serina na proteína, o aquecimento moderado e a ausência de parede celular contribuiu para que a digestibilidade da proteína fosse elevada. Foi observado por Giec et alii (1989) uma redução de 10% na digestibilidade "in vitro", quando a proteína foi submetida à 50% de fosforilação. Os autores atribuíram essa redução tanto em consequência do tratamento alcalino como ao número de radicais fosfatos que permanecem ligado à proteína, dificultando a ação de enzimas.

O valor biológico para as diferentes preparações calculado pelo método de Oser ficou na faixa de 82 a 86% em relação à proteína padrão ovo. O VB-C diferiu pouco entre as amostras, devido a composição semelhante em aminoácidos essenciais. Como o parâmetro NPU foi calculado em função da digestibilidade, as células de levedura rompidas mostraram a menor percentagem de utilização líquida da proteína.

#### **4.8.2 Ensaio biológico**

O registro do ganho de peso semanal dos grupos de animais utilizados no ensaio, durante o período de 28 dias, foi utilizado para construção de curvas de crescimento médio, ilustradas na Figura 24. O grupo de animais alimentados com dieta onde a proteína foi proveniente do concentrado protéico fosforilado e de células rompidas, pesaram em média 38 e 35% respectivamente menos, do que o grupo alimentado com dieta de caseína. O grupo tratado com caseína inicialmente destacou-se menos, sendo a diferença mais acentuada a partir da segunda semana de tratamento.

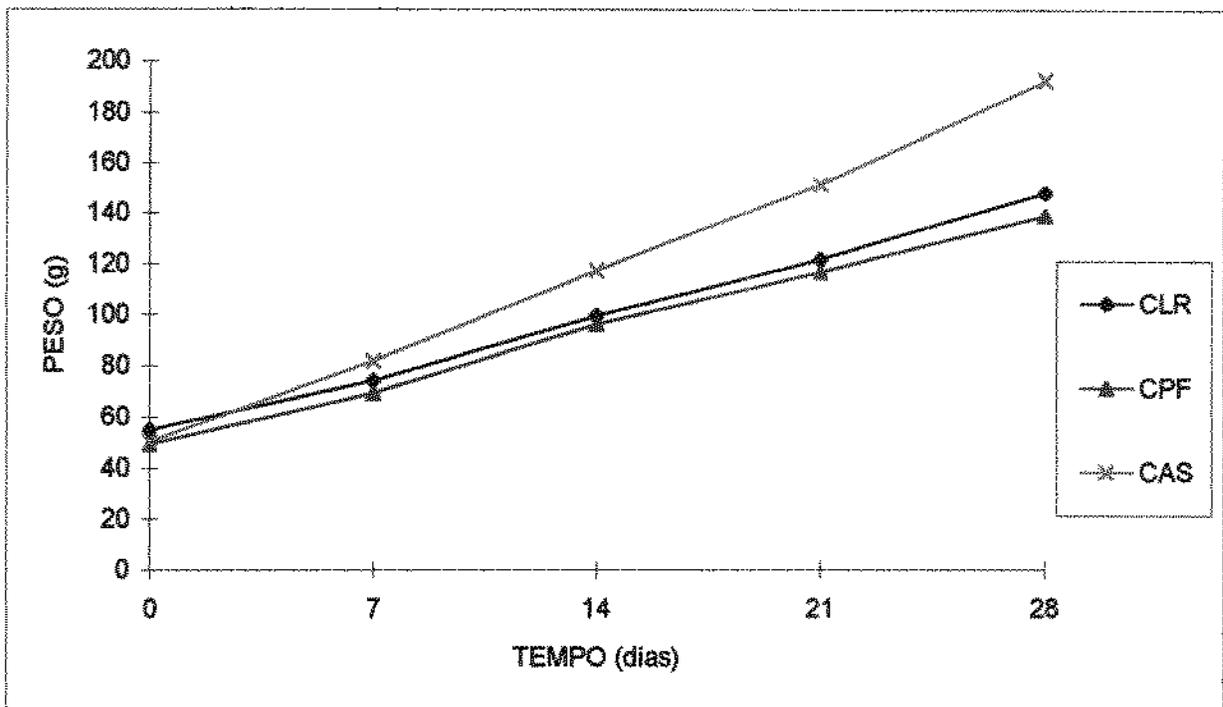


Figura 24. Ganho de peso de ratos alimentados por 28 dias com dietas contendo 10 % de proteína proveniente de caseína (CAS), células levedura rompida (CLR) e concentrado protéico fosforilado (CPF).

Os dados referentes ao consumo de proteína, ganho de peso e PER encontram-se na Tabela 19. Embora o consumo de dieta tenha sido estatisticamente menor para o grupo que consumiu dieta a base de concentrado protéico fosforilado, a eficiência da proteína em promover o crescimento foi semelhante ( $p \leq 0,05$ ) ao grupo CLR. O valor do PER para os tratamentos CPF e CLR revelaram que a proteína não foi tão eficiente quanto a caseína em promover o crescimento, embora a proteína de levedura apresente um balanço quase perfeito de aminoácidos. Os valores de PER concordam com os resultados de Seeley (1977), que obteve o PER de 2,2 para levedura de panificação livres de ácidos nucléicos.

A relação consumo de proteína/ganho de peso, na Figura 25, possibilita a visualização da eficiência da proteína dos diferentes tratamentos no crescimento dos ratos. Os tratamentos CLR e CPF não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), demonstrando que o tratamento utilizado para fosforilação não diminuiu a eficiência protéica em promover o crescimento quando comparada a CLR.

Tabela 19. Resultados do consumo de proteína, ganho de peso e taxa de eficiência protéica (PER) para os tratamentos CAS, CLR e CPF, durante 28 dias.

Tratamento	Cons. Proteína (g)	Ganho de peso (g)	PER
CAS	46,77 ± 4,86 <sup>a</sup>	142,59 ± 17,21 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,19 <sup>a</sup>
CLR	43,45 ± 4,09 <sup>b</sup>	93,43 ± 5,38 <sup>b</sup>	2,16 ± 0,17 <sup>b</sup>
CPF	38,84 ± 3,81 <sup>c</sup>	87,43 ± 4,29 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,11 <sup>b</sup>

CAS= caseína, CLR= levedura rompida; CPF= Concentrado Protéico Fosforilado. a,b,c letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes.

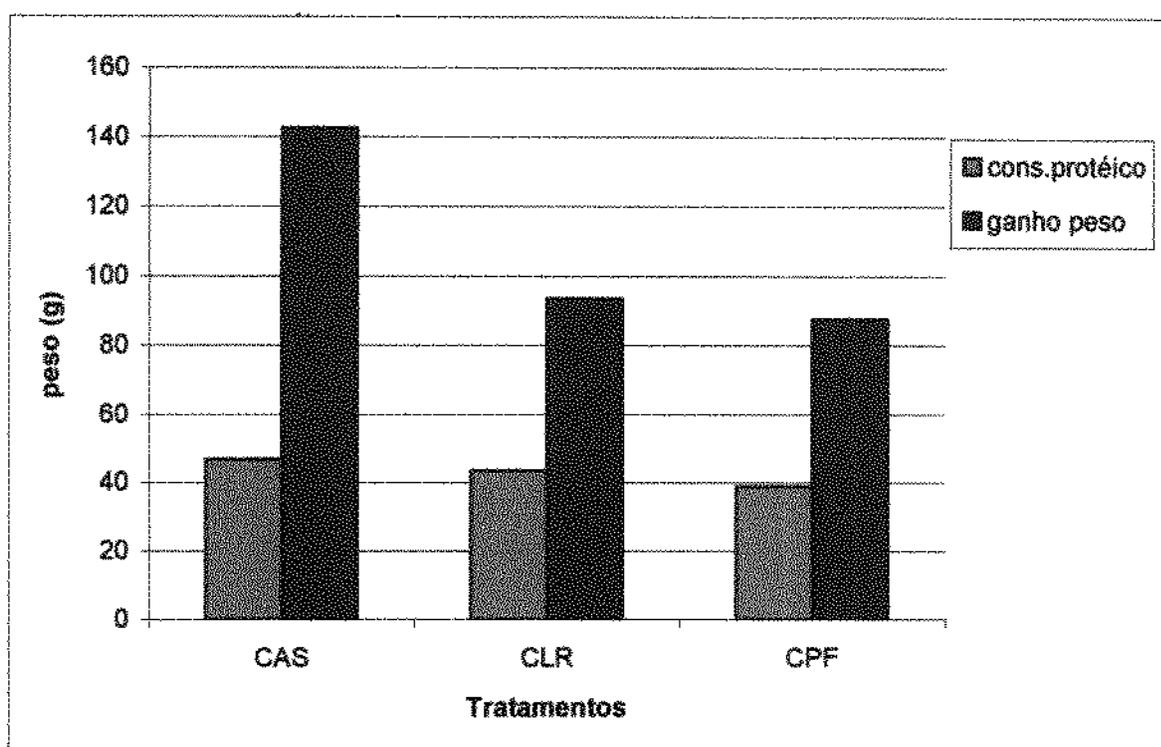


Figura 25. Consumo de proteína e ganho de peso de ratos alimentados com 10% de proteína de da caseína (CAS); de células de levedura rompidas (CLR) e concentrado protéico fosforilado (CPF).

O balanço de nitrogênio foi realizado durante a segunda semana do ensaio biológico, com a coleta de fezes e urina, para cálculo do nitrogênio excretado e mostrou a retenção do nitrogênio proveniente da dieta. O balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) e utilização líquida

aparente da proteína (NPUa), encontram-se na Tabela 20. Os valores médios referentes ao nitrogênio ingerido, excretado e retido durante a semana de balanço, mostram um balanço positivo, geralmente encontrado em fase de desenvolvimento saudável, onde o nitrogênio proveniente da proteína alimentar é utilizado na síntese de tecidos para crescimento.

A retenção de nitrogênio para as dietas CLR e CPF foram respectivamente de 0,187 e 0,183 gN/dia, comparadas a 0,219 gN/dia para a dieta padrão. A maior excreção de nitrogênio urinário, nos grupos alimentados com dietas de levedura, foi atribuído a a presença de nitrogênio proveniente do catabolismo dos ácidos nucléicos como ácido úrico e alantoína, excretados principalmente na urina. O nitrogênio fecal da amostra CLR apresentou-se elevado, provavelmente, devido a presença de nitrogênio proveniente de proteínas constituintes da estrutura da parede celular, que são indigeríveis pelo rato, e conseqüentemente excretadas nas fezes. Sarwar et alii (1986), encontraram uma correlação altamente positiva entre a quantidade de bases purínicas ingeridas na dieta e os níveis de ácido úrico e alantoína dosados na urina.

Tabela 20. Nitrogênio retido (NR), Utilização líquida aparente da proteína (NPUa), Digestibilidade aparente(Da), Valor biológico aparente (Vba).

ÍNDICES NUTRICIONAIS	CAS	CPF	CLR
N ingerido (g)	1,83 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,95 ± 0,27 <sup>a</sup>
N urinário (g)	0,16 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,07 <sup>c</sup>
N fecal (g)	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>b</sup>
NR (g)	1,54 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,31 ± 0,16 <sup>b</sup>
NPUa (%)	83,36 ± 2,51 <sup>a</sup>	78,43 ± 3,75 <sup>ab</sup>	75,10 ± 3,69 <sup>b</sup>
Da (%)	92,98 ± 1,01 <sup>a</sup>	90,86 ± 1,18 <sup>a</sup>	85,36 ± 1,41 <sup>b</sup>
VBa (%)	89,64 ± 2,11 <sup>a</sup>	86,26 ± 3,59 <sup>a</sup>	87,96 ± 4,93 <sup>a</sup>

CAS= Caseína, CPF= Concentrado Protéico Fosforilado, CLR= levedura rompida. a,b,c Letras diferentes na mesma linha indicam resultados estatisticamente diferentes (p<0.05).

O valor biológico aparente não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, indicando que o pool de aminoácidos ingerido, que chegaram ao metabolismo dos animais são equivalentes. Embora a quantidade absorvida pelo grupo CLR tenha sido menor em função da menor digestibilidade. Os resultados da digestibilidade aparente (Da) foram idênticos para os tratamentos CAS e CPF, diferindo apenas para CLR ao nível de significância de 0,05%. Isso pode indicar de que o processo de modificação da proteína, principalmente a etapa de aquecimento a 35°C por três horas, pode ter ocasionado algum grau de desnaturação na proteína melhorando sua digestibilidade e igualando-a ao controle caseína. A presença da parede celular no concentrado de células de levedura rompida pode ter contribuído para os valores menores de digestibilidade. Com relação a utilização líquida aparente de proteína (NPUa), verifica-se que os valores dos tratamentos apenas o grupo CLR diferiu estatisticamente da CAS.

Comparando os índices nutricionais calculados pelo método de Oser com aqueles obtidos em experimentos "in vivo", verificou-se que tanto o VB-C como o NPU-C resultaram em valores ligeiramente inferiores. Essa diferença pode ser atribuída ao elevado conteúdo de aminoácidos da proteína do ovo, utilizada como padrão de referência, que subestima as proteínas testes. Os resultados da digestibilidade "in vitro" foi um pouco superior para o tratamento CLR e similar para o CPF.

O índice de avaliação da qualidade da proteína, através do escore químico dos aminoácidos (FAO/WHO/UNU 1985), corrigidos pela digestibilidade (Da) da proteína, foi de 0,9 para o concentrado protéico fosforilado, sendo necessário a ingestão de 134g diárias de proteína para suprir as necessidades diárias de crianças com idade superior a 4 anos e adultos. Esse índice de avaliação foi inferior aos obtidos para o isolado protéico de soja e carne bovina (PDCAAS=1,0), sendo no entanto superior as proteínas de origem vegetal (Henley e Kuster, 1994).

Pelas recomendações do "Protein-Calorie Advisory Group" (PAG, 1975), a ingestão de quantidades superiores a 2 g/dia de RNA pode ser prejudicial à saúde,

consequentemente seria indicado somente a ingestão de 55g/dia de CPF. Muitas vezes alimentos com elevados teores de ácidos nucléicos podem conter quantidades reduzidas de bases uricogênicas, tais como a adenina e hipoxantina. Foi encontrado que valores até 0,1% de adenina não provoca efeitos prejudiciais a saúde em ratos (Sarwar et alli, 1986). Como o nível de 0,1% de adenina corresponde à 0,5% de RNA, o nível tolerável para a ingestão diária para um adulto de 70 quilos, pode ser de 3g RNA/dia, um pouco superior ao limite estabelecido pela PAG (1975).

#### **4.8.3 Avaliação toxicológica**

Os estados doentes em animais experimentais são acompanhados por alterações de vários componentes bioquímicos do sangue, os quais por sua vez, estão sujeitos a variações de espécie e alguns deles com a idade dos animais. Os resultados das determinações séricas de ratos com 7 semanas de vida, alimentados com as dietas CPF e CLR, indicaram modificações em alguns componentes, quando comparados ao grupo que recebeu dieta controle (CAS).

Os níveis séricos para os compostos transaminases glutâmico oxalacético (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina, ácido úrico, uréia, cálcio e fósforo encontram-se na Tabela 21. Em relação ao nível de TGO, verificou-se que apesar do teor encontrado ser ligeiramente superior para o grupo CPF em relação a caseína, estatisticamente não diferiram entre si. No caso da TGP houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento CPF em relação a CLR e Caseína, que poderia ser o indício da presença de componente tóxico na dieta CPF. Verificou-se, no entanto, que o valor embora um pouco mais elevado que os demais grupos, situou-se dentro da faixa de normalidade citada pela literatura, podendo sugerir apenas um estado de adaptação dos organismos aos teores ligeiramente mais elevados de fósforo e RNA na dieta CPF.

Tabela 21. Resultados dos níveis séricos de TGP, TGO, creatinina, ácido úrico, uréia, fósforo e cálcio de ratos wistar com 7 semanas de idade, alimentados contendo 10% de proteína de levedura, comparados a valores da literatura.

ÍNDICES SÉRICOS	CAS	CLR	CPF	C.V.(%)	VALORES LITERATURA*
TGO (U/L)	67,10 <sup>a</sup>	73,53 <sup>a</sup>	74,02 <sup>a</sup>	6,23	15,7 - 80,8
TGP (U/L)	18,78 <sup>a</sup>	17,39 <sup>a</sup>	24,77 <sup>b</sup>	9,34	17,5 - 30,2
Creatinina(mg/dL)	1,08 <sup>a</sup>	1,41 <sup>b</sup>	1,56 <sup>b</sup>	7,29	0,20 - 0,80
Ác. Úrico(mg/dL)	2,46 <sup>a</sup>	3,22 <sup>b</sup>	3,03 <sup>b</sup>	8,49	1,2 - 7,5
Uréia (mg/dL)	16,33 <sup>a</sup>	15,40 <sup>a</sup>	18,66 <sup>a</sup>	8,98	5,0 - 29,0
Fósforo (mg/dL)	10,46 <sup>a</sup>	nd	12,53 <sup>b</sup>	7,30	3,11 - 11,0
Cálcio (mg/dL)	11,04 <sup>a</sup>	nd	10,71 <sup>a</sup>	3,30	7,2 - 13,9

CAS= caseína, CPF= Concentrado Protéico Fosforilado. a,b Letras diferentes na mesma linha indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). \* faixa de valores normais para ratos albinos sadios (Mitruka e Rawnsley, 1981), nd = não determinado.

O ácido úrico e a creatinina, diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiabilidade, entre os tratamentos que receberam proteínas de levedura e o controle caseína. Embora a creatinina esteja mais elevada no tratamento CPF ela foi comparável ao valor de  $1,50 \pm 0,79$  descrito por Ringler e Dabich (1979), para ratos Wistar sadios. Neste caso, os valores mais elevados de creatinina não indicaram um quadro de disfunção renal pois os níveis medidos de uréia no sangue foram normais. Os valores médios de uréia foram semelhantes para os três tratamentos, situando-se dentro da faixa de normalidade (15 a 22 mg/mL), descrita por Ringler e Dabich (1979).

A dosagem de ácido úrico encontrou-se elevada para o tratamento CPF e CLR como consequência da presença de ácido ribonucléico nas dietas. Embora o teor de ácido ribonucléico se encontre bem mais elevado na dieta CLR (0,8 g de RNA/ 100 g de dieta) em relação à dieta CPF (0,38 g de RNA/ 100 g de dieta), os níveis séricos de ácido úrico foram estatisticamente semelhantes para os respectivos tratamentos e superiores ao controle. As alterações de ácido úrico no sangue não foram relacionadas a disfunção renal, uma vez que os teores de uréia encontram-se sem alteração. No

caso de ocorrer diminuição da filtração glomerular, outros compostos como creatinina e uréia estariam presentes em concentrações elevadas no sangue (Berndt e Davis, 1989).

Em estudos de toxidez de extratos de levedura (3,3% RNA), estimada com o sistema teste *Tetrahymena* em comparação à caseína, foi observado que ocorria uma adaptação dos organismos, onde o crescimento era lento nas primeiras 48 horas, estabelecendo-se um ritmo normal após 72 horas (Lyutskanov, 1990). Embora os dados dos índices séricos indiquem diferenças entre os tratamentos, acredita-se que não representam um quadro toxicológico, mas sim uma adaptação às dietas com níveis mais elevados de ácido ribonucléico.

A determinação da concentração de cálcio apontada na Tabela 21 indicou que não houve diferença entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), ficando dentro da faixa de 5,3 a 13,0 mg/100L descrita para ratos em geral (Harkness, 1993). A concentração de fósforo no sangue diferiu significativamente entre os tratamentos, ficando o tratamento CPF acima dos valores médios citados pela literatura. Segundo Linder (1991), dietas muito ricas em fósforo elevam a relação P:Ca no sangue, desencadeando a liberação do paratormônio para elevar o teor de cálcio e ao aumento na excreção de fosfato via urinária e fecal. Embora os níveis de fósforo tenham sido ligeiramente mais elevados nos animais tratados com CPF, em relação a caseína, não houve alteração nos teores de cálcio, não diferindo estatisticamente entre os dois grupos.

Considerando a quantidade de dieta consumida durante a semana de balanço e o teor de fósforo presente nas mesmas, a ingestão de fósforo foi de 60 mg/dia e 49 mg/dia, para as dietas CPF e CAS, respectivamente. A excreção de fósforo pelas fezes foi 16,28 mgP/ dia para o grupo de animais alimentados com dieta CPF, superior ao valor de 12,94 mgP/ dia excretado pelos animais que receberam dieta padrão. Portanto, o fósforo absorvido, sem considerar a excreção urinária, foi de aproximadamente 73% para ambas dietas, indicando que a homeostase do fósforo ocorre em parte via excreção fecal.

Acredita-se que as alterações de alguns parâmetros bioquímicos do sangue de ratos tratados com a dieta CPF em relação ao controle, para o período de 30 dias de ensaio, não representem um quadro toxicológico, mas uma adaptação à dieta com níveis mais elevados de fósforo e ácido ribonucléico. Apesar de alguns índices medidos diferirem entre os grupos, eles se encontram dentro da faixa de normalidade para ratos albinos saudáveis.

## 5. CONCLUSÕES

1. O processo de rompimento mecânico mostrou-se eficiente na ruptura celular possibilitando um rendimento de extração de proteína em torno de 97%. A composição centesimal, das células íntegras de levedura, revelaram um alto teor de carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos, respectivamente.
2. A biomassa de levedura é uma boa fonte de proteína, tanto quantitativamente como qualitativamente. O perfil aminoacídico é semelhante para as diferentes preparações de levedura, atende basicamente o padrão de referência da FAO, apresentando uma deficiência marginal em metionina, teor adequado de triptofano e treonina e alto teor de lisina.
3. Considerando o elevado teor de ácido nucléico das células de levedura, o que limita sua participação na dieta, a levedura não poderá contribuir com quantidades muito significativas de macro-nutrientes. Com relação aos micro-elementos ela pode ser considerada uma fonte excelente de selênio e cromo.
4. As proteínas tendem a interagir com os ácidos nucléicos, que se precipita na forma de complexo núcleo-protéico no ponto isoelétrico. O processo de extração com perclorato de sódio ou trimetafosfato de sódio permite a obtenção de concentrados protéicos com teores reduzidos de RNA.
5. O processo de extração com perclorato de sódio, embora seja o método mais eficiente para remover os ácidos nucléicos, ocasiona perda de propriedades funcionais das proteínas, exceto para as propriedades da espuma.
6. O uso de trimetafosfato de sódio resultou em melhoria das propriedades funcionais das proteínas, principalmente capacidade de retenção de água, viscosidade e geleificação. Essas propriedades foram melhoradas principalmente na faixa de pH ligeiramente ácida.

7. A eletroforese mostrou que a fosforilação não ocasiona a formação de ligações cruzadas intermoleculares nas proteínas. As proteínas fosforiladas apresentaram elevada capacidade ligante para íons cálcio.

8. Os métodos de obtenção dos concentrados protéicos influenciaram diferentemente as suas propriedades funcionais.

9. Ensaio biológico com ratos mostrou que valor nutritivo das preparações de levedura equivaleu a 73% da caseína relativo ao PER e 90% da caseína em relação ao NPUa.

10. Os ensaios toxicológicos demonstraram que os índices séricos avaliados situaram-se dentro da faixa de normalidade para ratos saudáveis e não revelaram quadro de toxidez, para o período de 30 dias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACTON, J.C.; SAFLE, R.L. Stability of oil-water emulsion 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. Journal of Food Science, Chicago, v.35, n.9, p.852-855, 1970.
2. AIN. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. Journal of Nutrition, Bethesda, v. 107, p.1340-1348, 1977.
3. AKESON, W.R. ; STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. Journal of Nutrition, Bethesda, v.83, n.2, p.257-261, 1964.
4. ALVAREZ, R.; ENRIQUEZ, A. Nucleic acid reduction in yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v.29, v.8/3, p.208-210, 1988.
5. ANFAR. Associação Brasileira dos fabricantes de rações. Matérias primas para alimentação animal. 4 ed. São Paulo, 1985. 65p
6. AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. HORWITZ, W. Washington, D.C, 1975.
7. AOKI, H.; TANEYAMA, O.; KITAGAWA, I. Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. Journal of Food Science, Chicago, v.46, n.4, p.1192-1195, 1981.
8. APPURAO, A.G.; RAO, M.S.N. Binding of Ca (II) by the 11S Fraction of soybean proteins. Cereal Chemistry, Saint Paul, v.52, n.1, p.21-33, 1975.
9. ARMSTRONG, H.J.; HILL, S.E.; SCHROOYEN, P.; MITCHEL, J.R. A comparison of the viscoelastic properties of conventional and maillard protein gels. Journal of Texture Studies, Westport, v.25, n.3, p.285-298, 1994.
10. ARRIOLA, M.C.; ZEPEDA, M.; ROLZ, C. A proten concentrate from distillery yeast and its application to supplement corn tortillas. Archivos Latinoamericano de Nutricion, Guatemala, v.39, n.4, p.565-575, 1989.

11. BAKER, R.C.; WONGHAHN, P.; ROBBINS, K.R. Fundamentals of new food product development. New York: Elsevier, 1988, 287p.
12. BARBOSA-CÁNOVAS, G.; IBARZ, A.; PELEG, M. Propiedades reológicas de alimentos fluidos. Alimentaria, Madrid, n.4, p.39-59, 1993.
13. BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Ress: a short review for non-taxonomists. Yeast, Chichester, v.8, n.1, p.1-23, 1992.
14. BERNDT, W.O.; DAVIS, M.E. Renal methods for toxicology. In: Principles and methods of toxicology. HAYES. A.W. 2ª ed. New York: Raven Press Ltda, 1989. 929p.
15. BEUCHAT, L.R. Functional and electrostatic characteristics of succinylated peanut flour protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.25, n.2, p.258-261, 1977.
16. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Ottawa, v.37, n.7, p.911-917, 1959.
17. BORDERAS, A.H.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. Revista Agroquímica y Tecnológica de Alimentos, Valencia, v.28, n.2, p.159-169, 1988.
18. BOURNE, M.C. Texture profile analysis. Food Technology, Chicago, v.32, n.7, p.62-72, 1978.
19. BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Production of food and fodder yeasts. Critical Reviews in Biotechnology. London, v.12, n.1/2, p. 65-86, 1992.
20. BRESSANI, R. The use of yeast in human foods. In: MATELES, R.I.; TANENBAUM, S.R. Single cell protein. Massachusetts: MIT Press, 1968. 480p.
21. BRITTEN, M. & LAVOIE, L. Foaming properties of protein as affected by concentration. Journal of Food Science, Chicago, v.57, n.5, p.1219-1222-1241, 1992.

22. CANTE, J.C.; FRANZEN, R.W.; SALEEB, F.Z. Proteins as emulsifiers: methods for assessing the role. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v.56, n.1. p.71a-77a, 1979.
23. CARR, C.W. Studies on the binding of small ions in protein solutions with the use of membrane electrodes. IV. The binding of calcium ions in solutions of various proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v.46, p.424-431, 1953.
24. CASTRO, A.C.; SINKEY, A.J.; TANNENBAUM, S.R. Reduction of nucleic acid content in Candida yeast cells by bovine pancreatic ribonuclease A treatment. Applied and Environment Microbiology, Washington, v.22, n.3, p.422-427, 1971.
25. CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. Proteinas alimentarias. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.
26. CHEN, S. H.; CHEN, H.J.; SUNG, H.Y. Studies on the protein isolates and nucleic acids from brewer's yeast. Journal Chinese Agriculture Chemistry society, v.23, p.318, 1986. Apud: HÁLASZ, A. & LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boston: CRC Press, 1991.312p.
27. CHOU, D.H.; MORR, C.V. Protein-water interations and functional properties. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v.56, n.1, p.53a-62a,1979.
28. CLIFFORD, A.J.; STORY, D.L. Level of purines in foods and their metabolic effects in rats. Journal of Nutrition, Bethesda, v.106, n.3, p.435-442, 1976.
29. COOK, B.B.; LAU, E.W.; BAILEY, B.M. The protein quality of waste green algae. Journal of Nutrition, Bethesda, v.81, n.1, p.23-26, 1963.
30. CORNISH, H.H. Problems posed by observation of serum enzyme changes in toxicology. CRC Critical Reviews in Toxilogoly, Cleveland, v.1,n.1, p.1-32, 1971.
31. DAMODARAN, S.; KINSELLA, E. Dissociation of yeast 80S ribossomes by chaotropic salts. Biochemica et Biophysica Acta, Amsterdan, v.801, p.416-423, 1984<sub>a</sub>.

32. DAMODARAN, S.; KINSELLA, J.E. Dissociation of yeast nucleoprotein complexes by chemical phosphorylation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.32, n.5, p.1030-1032, 1984<sub>b</sub>.
33. DAMODARAN, S.; KINSELLA, J.E. The use of chaotropic salts for separation of ribonucleic acids and proteins from yeast nucleoproteins. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.25, n.3, p.761-770, 1983.
34. DAVIS, B.J. Disc eletroforese II: method and application to human serum proteins. Annual New York Academic Science, New York, v.121, n.2, p:404-427, 1964.
35. DeGROOT, A.P. Minimal necessary to evaluate the nutricional qualities and safety of SCP. In: DAVIS, P. Single cell protein. London: Academic Press, 1974. p.75.
36. DE KANTEREWICZ, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Water-oil absorption index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.
37. DICKSON, E.; STAINSBY, G. Progress in formulation of food emulsions and foams. Food Technology, Chicago, v.41, n.9, p.74-81,1987.
38. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analitical Chemistry, Washington, D.C., v.28, p.350-356, 1958.
39. EDSALL, J.T.; WYMAN, J. Biophysical Chemistry. 3<sup>a</sup> ed. New York: Academic Press,1966. 672p. v.1.
40. ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI,G.B. Prediction of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins. Journal of Food Science, Chicago, v.56, n.1, p.116-120, 1991a.
41. ELIZALDE, B.E.; GIACCAGLIA, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. Journal of Food Science, Chicago, v.56, n.1, p.24-30, 1991b.

42. ELLINGER, R.H. Phosphates in food processing. In: FURIA, T.E. CRC Handbook of food aditives. 2ª ed. Cleveland: CRC Press, 1972. 531p. v.1
43. ENGLER, C.R. New method of measuring cell-wall rupture. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.XXI, n.10, p.1861-1869, 1979.
44. FAO/ WHO/ UNU. Energy and protein requeriments. Report of the Joint FAO/ WHO/ UNU Expert Consultation Technical Report. Series nº 724, FAO/ WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.
45. FARFÁN, J.A. Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos. Campinas: UNICAMP, 1990. 134p.
46. FARNUN, C. & CLELAND, J. Extraction of protein from mechanically disrupted freeze-dried brewer's yeast. Journal of Milk and Food Technology, Orange, v.38, n.2, p.219-222. 1975.
47. FENEMA, O.R. Introducion a la ciencia dos alimentos. Barcelona: Reverté, 1989. 445p.
48. FLASCHKA, H.A.; BERNARD, A.J.; STURROCK,D.E. In: Quantitative Analytical Chemistry, New York: Barnes and Noble Inc., 1969, 142p. v. 2.
49. FIORA, F.A.; PILOSOFF,A.M.R.; BARTHOLOMAY,G.B. Phisicochemical properties of soybean proteins related to flow, viscoelastic, mechanical and water-holding characteristics of gels. Journal of Food Science, Chicago, v.55, n.1, p.133-136, 1990.
50. FURUKAWA, T.; OTHA, S. Mechanical and water-holding properties of heat-induced soy proteins cels as related to their structural aspects. Journal of Texture Studies, Westport, v.13, n.1, p.59-69, 1982.
51. GASSMANN, B.; KROLL, J.; CIFUENTES, S. Determination of foaming properties of proteins. Die Nahrung, Berlim, v.31, n.4, p.321-330, 1987.

52. GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds. Journal of Food Science, Chicago, v.58, n.1, p.148-157, 1993.
53. GERMAN, J.B.; O'NEILL, T.E.; KINSELLA, J.E. Film foaming behavior of foods protein. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v.62, n.9, p.1358-1366, 1985.
54. GIEC, A.; SKUPIN, J. Single cell protein as food and feed. Die Nahrung, Berlin, v.32, n.3, p.219-229, 1988.
55. GIEC, A.; STASINSKA, B.; SKUPIN, J. A protein isolate for food by phosphorylation of yeast homogenate. Food Chemistry, Washington, v.31, n.4, p.279-288, 1989.
56. GIERHAT, D.L.; POTTER, N.N. Effects of ribonucleic acid removal methods on composition and functional properties of *Candida utilis*. Journal of Food Science, Chicago, v.43, n.6, p.1705-1713, 1978.
57. GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. Food Technology, Chicago, v.58, n.10, p.50-60, 1994.
58. GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10ª ed. São Paulo, Nobel, 1982. 430p.
59. GUEGUEN, J.; BOLLECKER, S.; SCHWENKE, K.D.; RAAB, B. Effects of succinylation on some physicochemical and functional properties of the 12s storage protein from rapeseed (*Brassica napus L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.38, n.1, p.61-69, 1990.
60. GUTMAN, A.B.; YÜ, T. Uric acid metabolism in normal man and in primary gout. New England Journal of Medicine, Waltham, v.29, n.5, p.252-260, 1965.
61. GUZMAN-JUAREZ, M. In: HUDSON, B. J. F. Development in foods proteins 2. London: Applied Science Publishers, 1983. 339p.
62. HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production, Boca Raton: CRC Press., 1991, 312p.

63. HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; MÁTRI, B. Yeast as a human protein source. Acta Alimentaria, Budapest, v.17, n.4, p.374-375, 1988.
64. HALLING, P.J. Protein-stabilized foams and emulsions. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.15, n.2, p.155-203, 1981.
65. HARKNESS, J.E. Biologia clínica de coelhos e roedores. 1ª ed. São Paulo. Roca. 1993. p.49-55.
66. HEBERT, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells. In: NORRIS, J.R. & RIBBORS, P.W. Methods of microbiology. London: Academic Press, 1971. 695p. v. 5B.
67. HEDENSKOG, G.; EBBINGHAUS, L. Reduction of the nucleic acid content of single-cell protein concentrates. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.14, n.3, p.447-457, 1972.
68. HEDENSKOG, G.; MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.15, n.1, p.129-142, 1973.
69. HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. Food Technology, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.
70. HERMANSSON, A.M. Functional properties of proteins for foods-flow properties. Journal of Texture Studies, Westport, v.5, n.4, p.425-439, 1975.
71. HERMANSSON, A.M.; AKESSON, C. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. 2. Effect of salt on water binding properties of model meat systems. Journal of Food Science, Chicago, v.40, n.3, p.603-610, 1975.
72. HIDALGO, J. Functional properties of food proteins from a biophysical point of view. FEBS-Federation European Bioch. Soc. 11<sup>th</sup> Meeting Copenhagen. Oxford: Pergamon Press, 1978. p:89-98.

73. HIROTSUKA, M.; TANIGUCHI, H.; NARITA, H., KITO, M. Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein. Agricultural and Biological Chemistry Journal, Tokyo, v.48, n.1, p. 93-100, 1984.
74. HUANG , Y.T.; KINSELLA, J.E. Phosphorilation of yeast protein: reduction of ribonucleic acid and isolation of yeast protein concentrate. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.XVIII, p.1690-1698, 1986<sub>a</sub>.
75. HUANG, Y.T.; KINSELLA, J.E. Functional properties of phosphorylated yeast protein: solubility, water-holding capacity and viscosity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.34, n.4, p.670-674, 1986<sub>b</sub>.
76. HUANG, Y.T.; KINSELLA, J.E. Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.6, p.1684-1688, 1987.
77. HUANG, F.; RHA, C. Rheological properties and spinnability of single-cell protein/additive mixtures. Journal Food Science, Chicago, v.43, n.3, p. 772-774, 1978<sub>a</sub>.
78. HUANG, F.; RHA, C. Formation of single-cell protein filament with hidrocolloids. Journal Food Science, Chigaco, v.43, n.3, p.780-786, 1978<sub>b</sub>.
79. HUGLES, D.E.; WINPENNY, J.W.T.; LLOYD, D. The desintegration of microorganisms. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS,D.W. Methods in Microbiology. London: Academic Press, 1971. v. 5B.
80. HUMMEL, W.; KULA, M.R. Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeast. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, n.9, p.201-209, 1989.
81. KAKADE, M.L.; LIENER,I.R. A simplified procedure for determination of "available" lysine in protein foodstuffs. Analytical Biochemistry, New York, n.27, p.273-276, 1969.
82. KILARA, A.; SHARKASI, T.Y. Effects of temperature on food proteins and its implication on funcional properties. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.23, n.4, p.323-395, 1986.

83. KIHMBERG, R. The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.26, n.4, p.426-465, 1972.
84. KINSELLA, J.E.; SHETTY, K. J. Yeast protein recovery, nutritional and functional properties. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v.107, n.5, p.797-825, 1978.
85. KINSELLA, J.E. Functional properties in foods; a survey. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.7, n.3, p.219-280, 1976.
86. KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins; possible relationship between structure and function in foams. Food Chemistry, Barking, v.7, n.4, p.273-288, 1981.
87. KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In Food Biochemistry. KNORR, D. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 363-391. cap. 14.
88. KNIPE, C.L.; FRYE, C.B. Characteristics of bovine plasma gels as affected by pH sodium chloride, and sodium tripolyphosphate. Journal of Food Science, Chicago, v.55, n.1, p.252-253, 1990.
89. KOHN, D.F.; BARTOLD, S.W. Biology and diseases for rats. In: BAKER, H.J.; LINDSAY, J.R.; WEISBROTH, S.H. The laboratory rat. VI. Biology and diseases. New York: Academic Press, 1979. 435p.
90. KOIVURINTA, J.; JUNNILA, M.; KOIVISTOINEN, P. Functional properties of brewer's grain, brewer's yeast and distiller's stillage in food systems. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, London, v.13, n.3, p.118-122, 1980.
91. KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIVISTOINEN, P. Functional properties brewer's grain, brewer's yeast and distiller's stillage in food systems. Part 2. Application to sausages and meat balls. Fleishwirtschaft, Frankfurt, v.61, n.7, p.1024-1026, 1981.
92. KROLL, R.D. Effect of pH on binding of calcium ions by soybean proteins. Cereal Chemistry, Saint Paul, v.61, n.6, p.490-495, 1984.

93. KUNTZ, I.D. Hydration of macromolecules III. Hydration of polipeptides. Journal of the American Chemical Society, Easton, v.27, n.1, p.514-518, 1971.
94. LABUZA, T.P.; JONES, K.A.; SINSKEY, A.J.; GOMEZ, R; WILSON, S.; MILLER, B. Effect of drying conditions on cell viability and functional properties of single-cell protein. Journal of Food Science, Chicago, v.37, n.1, p.103-107, 1972.
95. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, n.227, p.680-685, 1970.
96. LEMAN, J.; KINSELLA, J.E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.28, n.2, p.115-138, 1989.
97. LEVANDER, O.A. Selenium, chromium and manganese. In: SHIIS, M.D.; VERMON, R.Y. Modern nutrition in health and disease. 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1989. p.263-267
98. LIM, S.; SEIB, P.A. Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. Cereal Chemistry, Saint Paul, v.70, n.2, p.137-144, 1993.
99. LIMA, A.D.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. Métodos de laboratório aplicados à clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1985. 699p.
100. LIN, J.C.M.; CHASTAIN, M.F.; STRENGTH, D.R. Sensory and nutritional evaluation of wheat bread supplemented with single-Cell protein from *Torula yeast (Candida utilis)*. Journal of Food Science, Chicago, v.51, n.3, p.647-651, 1986.
101. LINDER, M.C. Nutritional Biochemistry and metabolism with clinical applications. Connecticut: Appleton & Lange. cap.6. 1991, 573p.
102. LINDBLON, M. The influence of alkali and heat treatment on yeast protein. Biotechnololy & Bioengineering, New York, v.16, n.11, p.1495-1506, 1974.

- 103.LYUTSKANOV, N; KOLEVA, L.; STATEVA, L.; VENKOV, P.; HADJIOLOV, A. Protein extract for nutritional purposes from fragile strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Reduction of nucleic content and applicability of the protein extracts. Journal of Basic Microbiology, Berlin, v.30, n.7, p.523-528, 1990.
- 104.MARTINI, A.E.; MILLER, M.W.; MARTINI, A. Amino acid composition of whole cells of different yeasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.27, n.5, p.982- 984, 1979.
- 105.MATELES, R.I.; TANNENBAUM, S.R. Single cell protein. Massachussets: MIT Press, 1969. 480p.
- 106.MATHEIS, G. Phosphorilation of food proteins with phosphorus oxychloride- improvement of functional and nutritional properties: A Review. Food Chemistry, Barking, v.39, n.1, p.13-26, 1991.
- 107.MATHEIS, G.; PENNER, M.H.; FEENEY, R.E.; WITHAKER, J.R. Phosphorilation of casein and lysozyme by phosphorus oxychloride. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.31, n.2, p.379-387, 1983
- 108.MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R. Chemical phosphorilation of food proteins: An overview and a prospectus. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.32, n.4, p.699-705, 1984<sub>a</sub>.
- 109.MATHEIS, G. WITHAKER, J.R. <sup>31</sup>P NMR chemical shifts of phosphate covalently bound to proteins. International Journal of Biochemistry, Elmsford, v.16, n.8, p.867-873, 1984<sub>b</sub>.
- 110.McELWAIN, M.D.; RICHARDSON, T.; AMUNDSON, C.H. Some functional properties of succinylated single cell protein concentrate. Journal of Milk and Food Technology, Orange, v.38, n.9, p.521-526, 1975.
- 111.MEDINA, A.L.; COLAS, B.; LEMESTE, M.; RENAUDET, I.; LORIENT, D. Physicochemical and dynamic properties of caseins modified by chemical phosphorylation. Journal of Food Science, Chicago, v.57, n.3, p.617-620, 1992.

112. McWATTERS, K.H.; HOLMES, M.R. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. Journal of Food Science, Chicago, v.44, n.3, p.770-773, 1979.
113. MINE, Y.; NOUTOMI, T.; HAGA, N. Emulsifying and structural properties of ovalbumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.39, n.3, p.443-446, 1991.
114. MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. 2 ed. New York: Masson Publishing USA, 1981, 314p.
115. MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Emulsifying properties of acidic caseins and sodium caseinate. Food Chemistry, Barking, v.28, n.1, p.17-30, 1988.
116. MOMOSE, H.; GREGORI, K.F. Temperature sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Variable in the methionine content of their protein. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.35, n.4, p.641-647, 1978.
117. MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E. REGENSTEIN, J.M.; VAN-BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. Journal of Food Science, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.
118. MORRISSEY, P.A.; MULVIHILL, D.M.; O'NEILL, E.M. Functional properties of muscle proteins. In: HUDSON, B.J.F. Development in food proteins-5. London: Elsevier Applied Science, 1987. 341p.
119. MULVIHILL, D.M.; KINSELLA, J.E. Gelation of  $\beta$ -lactoglobulin: Effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. Journal of Food Science, Chicago, v.53, n.1, p.231-236, 1988.
120. MURPHY, J.M.; FOX, P.F. Functional properties of  $\alpha_s$ -/  $\kappa$ - or  $\beta$ -rich casein fractions. Food Chemistry, Barking, v.9, n.2, p.211-228, 1991.

- 121.NAND, K. Debittering of spent brewer's yeast for food purposes. Die Nahrung, Berlin, v.31, n.2, p.127-131, 1987.
- 122.NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Recommended dietary allowances. 10.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1989. 284p.
- 123.NELSON, G.E.N. ANDERSON, R.F.; RHODES, R.A.; SHEKLETON, M.C.; HALL, H.H. 1960. Apud: VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. Amino acid composition of protein isolates from *Saccharomyces fragilis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.23, n.3, p. 595- 597, 1975.
- 124.OAKENFULL, D. Gelling agents. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.26, n.1, p.1-25, 1987.
- 125.OKEZIE, B.O. & KOSIKOWISKI, F.V. Extractability and frctionality of protein from yest cells grown on cassava hydrolysate. Food Chemistry, Barking, v.7, n.1, p.7-18, 1981.
- 126.OLSER, B.L. Guidelines for evaluation of SCP for human consumption. In: MATELES,R.I. & TANNENBAUM,S.R. Single-cell protein II. Massachussets: MTI Press, 1975.
- 127.OTERO, M.A. & CABELLO, A.J. Single cell protein low in nucleic acid by alkaline treatment. Biotechnology Letters, New England, v.4, n.1, p.149-152, 1980.
- 128.OTERO, M.A.; GONZÁLEZ, A.C.; BUENO, E.G.; GARCIA-REVILLA, J.L. Acid treatment for RNA removal from yeast. Biotechnology Letters, New England, v.4, n.3, p.149-152, 1982.
- 129.PAG. PAG ad hoc working group on clinical evaluation and accetable nucleic acid levels of SCP for human consumption. Protein-Calorie Advisory Group of the United Nations System. Protein-Calorie Advisory Group Bolletin, New York, v.3, p.17-23, 1975.

- 130.PATEL, P.D. & FRY, J.C. The search for standardised methods for assessing protein functionality. In: HUDSON, B.J. Developments in food protein-4. London: Elsevier Applied Science, 1987. 341p.
- 131.PATTEL, P.D.; STRIPP, A.M.; FRY, J.C. Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. International Journal of Food Science and Technology, New York, n.23, v.1, p.57-63, 1988.
- 132.PEARSON, A.M.; SPOONER, M.E.; HEGARTY, G.R.; BRATZLER, L.J. The emulsifying capacity and stability of soy sodium proteinate, potassium caseinate, and nonfat dry milk. Food Technology, Chicago, n.103, v.12, p.1841-1845, 1965.
- 133.PEARCE, K.N.; KINSELLA, J.E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.26, n.3, p.716-723, 1978.
- 134.PENY, C. Rinsing prospects for yeast products. Food Ingredient & Processing International, Hertfordshire, n.10, p.18,20-21, 1991.
- 135.PHILLIPS, L.G.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. A method for the measurement of foam formation and stability. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.4, p.1074-1077, 1987.
- 136.PHILLIPS, L.G.; GERMAN, J.B.; O'NEILL, T.E.; FOEGEDING, E.A.; HARWALKAR, V.R.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E.; MORR, C.V.; REGENSTEIN, J.M.; SMITH, D.M.; KINSELLA, J.E. Standardized procedure for measuring foaming properties of three proteins, a collaborative study. Journal of Food Science, Chicago, v.55, n.5, p.1441-1447, 1990.
- 137.PILOSOFF, A.M.R.; LOPEZ DE OGARA, M.C.; BARTHOLOMAI, G.B. Effect of slurry preparation methods on the rheological and gelling behavior of soy protein. Journal of Texture Studies, Westport, v.17, n.4, p.347-355, 1987.
- 138.PLAA, G.L.; HERWITT, W.R. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In: . HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 2<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press Ltda, 1989. 929p.

139. REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. Yeast Technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 378p.
140. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN 93. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76. A rodent diet. Committee Report. Journal of Nutrition, Bethesda, n.123, p.1939-1951, 1993.
141. REGENSTEIN, J.M.; GORIMAR, T.S.; SHERBON, J.W. Measuring the water holding capacity of natural actomyosin from chicken breast muscle the presence of pyrophosphate and divalent cations. Journal of Food Biochemistry, Westport, v.3, n.1, p. 204-211, 1979.
142. RHEINBOLD, P.H.H.; LEIMER, K.H.; ROSSEL, G.G.V. Sangria e secagem de levedura-Processo CTC. Boletim Técnico da Coopersucar, São Paulo, v.39, n.1, p.8-12, 1987.
143. RINGLER, D. H.; DABISCH, L. Hematology and clinical biochemistry. In: BAKER, H.J. & LINDSEY, J.R.; WEISBROT, S.H. The laboratory rat. Biology and diseases. New York: Academic Press, 1979. 435p. v.1.
144. ROSÁLES, F.H. Yeast as protein source for human nutrition. A review. Acta Microbiológica Academical Scientiarum Hungaricae, Budapest, v.31, n.3, p.159-172, 1984.
145. ROSHKOVA, Z.; DUKIANDJIEV, S.; PVLOV, K. Biochemical characterization of yeast protein isolates. Die Nahrung, Berlin, v.30, n.1, p.3-4, 1986.
146. ROTH, F.X. Microorganisms as a source of protein for animal nutrition. Advances in Applied Microbiology, San Diego, p.663-676, 1982.
147. SAIO, K.; KOYAMA, E.; WATANABE, T. Protein-calcio-phitic acid on combination of calcium with soybean meal protein. Agricultural and Biological Chemistry Journal, Tokio, v.32, n.3, p.448-453, 1968.

- 148.SANEST. Programa estatístico desenvolvido pelo CIAGRE . Centro de informática na Agricultura da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Departamento de Matemática e estatística. ESALQ-USP, Piracicaba, SP.
- 149.SARWAR, G.; PEACE, R.W.; BOTTING, H.G. Protein quality of food yeast and metabolism of their purines by rats. Nutrition Reports International, Los Altos, v.34, n.5, p.709-720, 1986.
- 150.SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU,R.; HOPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. Journal of Food Science, Chicago, v.50, n.2, p.353-357, 1985.
- 151.SATHE,S.K.: SALUNKE,D.K. Functional properties of great northern bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins. Emulsion, foaming, viscosity and gelatin on properties. Journal of Food Science, Chicago, v.46, n.1, p.71-74, 1981.
- 152.SATTERLEE, L.D. Proteins for use in foods. Food Technology, Chicago, v.35, n.6, p.53-70, 1981.
- 153.SCHACHTEL, A.P. Assessment of the changes in *Candida utilis* proteins produced by preparative process. Journal of Food Science, Chicago, v.46, n.6, p.1822-1826, 1981<sub>a</sub>.
- 154.SCHACHTEL, A.P. Effects of preparative process on the composition on the composition and functional properties of protein preparations from *Candida utilis*. Journal of Food Science, Chicago, v.46, n.2, p.377-382, 1981<sub>b</sub>.
- 155.SCHAFFELD, G.; SINSKEY, A.J.; RHA, C. Release of single-cell protein by induced cell lysis. Journal of Food Science, Chicago, v. 47, n.6, p.2072-2074, 1982
- 156.SCHAY, L.K.; WEGNER, G.H. Improved fermentation process for producing Torula yeast. Food Technology, Chicago, v.39, n.1, p. 61-65, 1985.
- 157.SCHNELL, P.G.; AKIN, C. Functional properties of yeast grown on ethyl alcohol. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v.56, n.1, p.82A-85A, 1979.

- 158.SEELEY, R.D. Fractionation and utilization of baker's yeast. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T.N. Yeast technology. New York: Van Nostrand Reinhold. 1991.
- 159.SGARBIERI, V.C. Alimentação e nutrição. Fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. 387p.
- 160.SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- 161.SHAHIDI, F.; NACZKA, M.; RUBIN, L.J.; DIOSADY, L.L. Functional properties of blood globin. Journal Food Science, Chigaco, v.49, n.2, p.370-372, 1984.
- 162.SHEFFNER, A.L. In vitro evaluation. In: ALBNESE, A.A. Never methods of nutritional biochemistry. 2ª ed. New York: Academic Press, 1967. vol.3
- 163.SHETTY, K.J.; KINSELLA, J.E. Preparation of yeast protein isolate with low RNA content . Journal of Food Science, Chicago, v.44, n.3, p.633-638, 1979.
- 164.SHETTY, K.J.; KINSELLA, J.E. Ready separation of protein from nucleprotein complexes by reversible modification of lysine residues. Biochemical Journal, v.191, n.1, p.269-272, 1980.
- 165.SHETTY,K.J.; KINSELLA,J.E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some poperties of the isolated protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.30, n.6, p.1166-1971, 1982.
- 166.SNYDER, H.E.; KNOW, T.W. Soybean utilization. New York: Van Nostrand Reinold, 1987. 345p.
- 167.SOBOLEVA, G.A.; POPOVA, E.A. Fractional composition of proteins of hidrolized nutrient yeast. Applied Biochem. Microbiol.22(3):305-308, 1986.
- 168.SUNG, H.; CHEN, H.; LIU, T.; SU, J. Improvement of the funcionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. Journal of Food Science, Chicago, v.48, n.3, p.716-721, 1983.

- 169.TANG, Q.; MUNRO, P.A.; McCARTHY, O.J. Rheology of whey protein concentrate solutions as a function of concentration, temperature, pH and salt concentration. Journal Dairy Research, v.60, n.3, p.349-361, 1993.
- 170.TANNENBAUM, S.R.; WANG, D.I.C. Single cell protein II. Massachussets: MIT Press, 1975. 707p.
- 171.TELLER, E.; GODEAU, J.M. Evaluation of the nutritive value of single-cell protein (Pruteen) for lactting dairy cows. Journal of Agricultural Science, Cambrige, v.106, n.3, p.593-599, 1986.
- 172.TOMBS, M.P. Biotechnology in the food industry. New Jersey: Prentice Hall, 1991. 182p.
- 173.TSANG, S.; LEE, C.; RHA, C.K. Desintegration of cell wall and extraction of protein from *Candida lipolitica*. Journal of Food Science, Chicago, v.44, n.1, p.97-103, 1979.
- 174.TUNG, M.A. Rheology of protein dispersions. Journal of Texture Studies, Westport, v.9, n.1, p.3-31, 1978.
- 175.TUSÉ, D. SCP: Current status and future prospects. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.19, n.4, p.273-325, 1984.
- 176.VANANUVAT,P.; KINSELLA,J. Some functional properties of protein isolates from yeast, *Sacharomyces fragilis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.23, n.4, p.613-616, 1975.
- 177.VANANUVAT,P.; KINSELLA,J.E. Preparation of succinylated yeast protein: composition and solubility. Biotechnology & Bioengineering, New York, v.20, n.9, p. 1329-1344, 1978.
- 178.VILKARI,L.; LINKO,M. Reduction of nucleic acid content of SPC. Process Biochemistry, London, v.12, n.4, p.17-19,35, 1977.

- 179.VOUTSINAS, L.P.; CHENG, E.; NAKAY, S. Relationship of hidrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. Journal of Food Science, Chicago, v.48, n.1, p.26-36, 1983.
- 180.WAGNER, J.R.; SORGENTINI, D.A.; AÑÓN, M.C. Effect of physical and chemical factors on rheological behavior of commercial soy protein isolates: Protein concentration, water imbibing capacity, salt addiction, and thermal treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v.40, n.10, p.1930-1937, 1992.
- 181.WALLACE, G.W.; SATTELEE, L.D. Calcium binding and its effects on the properties of several food protein sources. Journal of Food Science, Chicago, v.42, n.2, p. 473-478, 1977.
- 182.WASLIEN, C.I.; CALLOWAY, D.H.; MARGEN, S.; COSTA, F. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. Journal of Food Science, Chicago, v.35, n.2, p.294-298, 1970.
- 183.WEBER, K.; OSBORN, M. The realibility of molecular weigt determination by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel eletroforesis. Journal of Biological Chemistry, v.244, n.16, p.4406-4412, 1969.
- 184.WOO, S.L.; RICHARDSON, T. Funcional properties of phosphorylated  $\beta$ -lactoalbumin. Journal of Dairy Science, Champaign, v.66, n.5, p.984-987, 1983.
- 185.WOODARD, C.J.; SHORT, D. D. Toxicity of alcali-treated soybean in rats. Journal of Nutrition, Bethesda, n.103, p. 569-574, 1973.
- 186.YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Effects of chemical phosphorilation of bovine casein components on the properties related to casein micelle formation. Agricultural and Biological Chemistry, Tokio, v.45, n.4, p. 909-914, 1981.
- 187.YUNO-OHTA, N.; MAEDA, H.; OKADA, M.; OTHA, H. Heat induced of rice globulin: Comparison properties with soybean and sesame globulins. Journal of Food Science, Chicago, v.59, n.2, p.366-370, 1994.

188.ZEE, J.A.; SIMARD, R.E. Simple process for reduction in the nucleic acids content in yeast. Applied and Environment Microbiology, Washington, v.29, n.1, p.59-62, 1975.