



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

*DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

*OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS  
DA BIOMASSA DE LEVEDURA (*Saccharomyces sp.*):  
PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Elke Simone Dias Vilela, aprovada pela Comissão Julgadora em 14 de dezembro de 2000.

*Elke Simoni Dias Vilela*

*Química*

Campinas, 14 de dezembro de 2.000

*Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri*

*Orientador*

*Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri*  
Presidente da Banca

Campinas-SP

2000



04670 1000

UNIDADE	30		
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP		
V. 7110			
V.	Ex.		
TOMBO BC/	43688		
PROC.	16-392101		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00		
DATA	09/02/01		
N.º CPD			

CM-00153242-1

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

D5430 V7110	<p><i>Vilela, Elke Simoni Dias</i> Dias, Vilela Elke Simoni</p> <p>Obtenção e caracterização de derivados da biomassa de levedura (<i>Saccharomyces sp.</i>): propriedades nutritivas e funcionais / Vilela Elke Simoni Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.</p> <p>Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1.Levedos como alimento. 2.Autólise. 3.Extratos. 4.Avaliação nutricional. I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.</p>
----------------	---

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**  
Universidade Estadual de Campinas  
Orientador

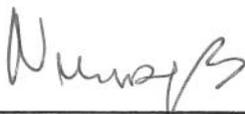


---

**Prof. Dr. Carlos Ferreira Grosso**  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

---

**Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira**  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro



---

**Prof.ª Dr.ª Neura Bragagnolo**  
Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANTE

*“Feliz o homem que acha sabedoria e adquire conhecimento. Andará com confiança  
no caminho e não tropeçará o pé.”*

***Provérbios 3:13 e 23***

*Ao meu marido, Gabriel*

*que compartilhou dos meus ideais  
e os alimentou, incentivando-me a  
prosseguir e transpor os obstáculos; à  
você que esteve sempre ao meu lado,  
lutando comigo, dedico esta conquista,  
pois ela também pertence à você...*

*Aos meus filhos, Alexandre e Guilherme  
com profunda gratidão e amor*

*Às minhas irmãs Marlene e Dóris,*

*pelo apoio e carinho nas horas boas e difíceis.  
A amizade é plena de afeto e novas descobertas,  
quem recebe esse dom compartilha coisas maravilhosas...*

*Aos meus irmãos e sobrinhos,  
pelo companheirismo e atenção.  
A presença de pessoas amigas,  
faz com que a vida se torne muito especial...*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela orientação segura, bem como pelo apoio e disponibilidade na realização desta pesquisa ;*

*Aos professores da banca examinadora, pelo carinho com que receberam o convite para participação da banca;*

*Às pesquisadoras Dra Vera Lúcia Baldini e Dra Maria Tereza Bertoldo Pacheco, pela amizade, apoio e atenção;*

*Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL, Beth Gomes, Ercília, Luzimara, Sandra e Renato, pela colaboração e companheirismo recebidos durante a elaboração da parte prática;*

*Ao pesquisador Marcelo A. Morgano do Laboratório de Química do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL, pelo fornecimento da composição mineral da levedura e derivados;*

*Às pesquisadoras e companheiras Sônia, Vera, Elaine e Nádia pelas trocas de experiência, companheirismo e amizade;*

*Ao Gontijo, do Núcleo de Cirurgia Experimental da UNICAMP, pela colaboração na avaliação do segundo ensaio biológico;*

*À PRODESA, por ter cedido a levedura proveniente das cervejarias;*

*Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;*

*À Fapesp pelo auxílio financeiro à pesquisa;*

*Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.*

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>xxix</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>xxxv</b>
<b>1.LEVEDURA E PRODUTOS DE LEVEDURA: ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.Revisão da literatura.....</b>	<b>3</b>
1.2.1.Levedura como matéria-prima para as indústrias de alimentos e farmacêuticas.....	3
1.2.2.Processamento de levedura: produtos de levedura .....	6
1.2.3.Composição e valor nutritivo da levedura íntegra e dos derivados de levedura.....	12
1.2.4.Propriedades funcionais tecnológicas: levedura íntegra e derivados.....	16
Solubilidade.....	19
Propriedade emulsificante.....	22
Capacidade de Absorção Espontânea de Água (C.A.A.) e Capacidade de Retenção de Água (C.R.A.).....	25
Capacidade de Absorção Espontânea de Óleo (C.A.O.).....	28

1.2.5. Propriedades funcionais fisiológicas de alguns componentes da levedura.....	29
1.2.6. Referências bibliográficas.....	33
<b>2. PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE LEVEDURA (<i>Saccharomyces sp.</i>) E MELHORIAS DO PROCESSAMENTO ATRAVÉS DE AVALIAÇÕES DE RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO PRODUTO FINAL.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1. Introdução.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2. Material e métodos.....</b>	<b>47</b>
<b>2.3. Resultados e discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>2.4. Conclusões.....</b>	<b>62</b>
<b>2.5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>63</b>
<b>3. DETERMINAÇÃO DO VALOR PROTÉICO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS, AUTOLISADO TOTAL E EXTRATO DE LEVEDURA (<i>Saccharomyces sp.</i>) ORIGINÁRIA DE CERVEJARIA.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1. Introdução.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2. Material e métodos.....</b>	<b>71</b>
<b>3.3. Resultados e discussão.....</b>	<b>76</b>
<b>3.4. Conclusões.....</b>	<b>85</b>
<b>3.5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>86</b>
<b>4. VALOR NUTRITIVO GLOBAL DA BIOMASSA DE CÉLULAS ÍNTEGRAS, DO AUTOLISADO TOTAL E DO EXTRATO DE LEVEDURA (<i>Saccharomyces sp.</i>).....</b>	<b>91</b>

4.1.Introdução.....	92
4.2.Material e métodos.....	94
4.3.Resultados e discussão.....	99
4.4.Conclusões.....	111
4.5.Referências Bibliográficas.....	112
<b>5.PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA LEVEDURA INTEGRAL, DO AUTOLISADO DE LEVEDURA E DO EXTRATO DE LEVEDURA (<i>Saccharomyces sp</i>).....</b>	<b>119</b>
5.1.Introdução.....	121
5.2.Material e métodos.....	123
5.3.Resultados e discussão.....	127
5.4.Conclusões.....	137
5.5.Referências Bibliográficas.....	138
<b>ANEXO – Trabalhos publicados.....</b>	<b>142</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Papel da funcionalidade das proteínas em sistemas alimentícios..... 18

### Capítulo 2

Tabela 1. Rendimento do primeiro processo de lavagem de levedura proveniente de cervejaria .....47

Tabela 2. Rendimento do segundo processo de lavagem de levedura proveniente de cervejaria .....50

Tabela 3. Composição centesimal aproximada da biomassa de células íntegras de levedura, do autolisado total e do extrato de levedura, todos em base seca....55

Tabela 4. Composição em aminoácidos das células de levedura íntegra, do autolisado total e do extrato .....58

Tabela 5. Composição mineral de levedura de cervejaria (*Saccharomyces sp.*): LI, levedura integral; AT, autolisado total; Ex, extrato de levedura..... 59

Tabela 6. Perfil dos principais ácidos graxos nas células íntegras de levedura (LI), no autolisado total (AT) e no extrato de levedura (Ex).....60

### Capítulo 3

Tabela 1. Composição básica da dieta (AIN-93G) para ratos em crescimento..... 73

Tabela 2. Consumo de dieta, ingestão de proteína e variação de peso de ratos submetidos aos tratamentos: **CAS**, caseína (padrão); **LI**, levedura íntegra e **Ex**, extrato de levedura: 8 ratos por tratamento, duração 28 dias ..... 79

Tabela 3. Nitrogênio ingerido com as dietas (NI), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio retido (BN) nas dietas de caseína (CAS), células íntegras de levedura (LI), autolisado total de levedura (AT) e extrato de levedura (Ex). Balanço de 8 dias .....	80
Tabela 4. Índices de valor protéico para caseína (CAS), células íntegras de levedura (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex) .....	81
Tabela 5. Adequação de aminoácidos essenciais das células íntegras de levedura (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex) tendo por base o padrão de referência FAO/WHO .....	82

#### **Capítulo 4**

Tabela 1. Composição centesimal aproximada da biomassa de células íntegras de levedura (LI), do autolisado total (AT) e do extrato de levedura (Ex), todos em base seca .....	99
Tabela 2. Consumo de dieta, ingestão de proteína e variação de peso em ratos submetidos às dietas de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10, 20 e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivados de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas .....	101
Tabela 3. Resultados dos níveis séricos de ácido úrico em ratos Wistar após serem alimentados, em 15, 31 e 50 dias com dieta-padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta-padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas .....	105

Tabela 4. Resultados dos níveis séricos de uréia em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias à dieta-padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta-padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas .....	106
Tabela 5. Resultados dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias à dieta-padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta-padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.....	107
Tabela 6. Resultados dos níveis séricos de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias à dieta-padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta-padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.....	108

## Capítulo 5

Tabela 1. Composição centesimal da biomassa de levedura formada de células íntegras de levedura (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex), todos em base seca.....	127
Tabela 2. Razão entre a capacidade de absorção de água e a capacidade de absorção de óleo (WOAI) para amostras de levedura integral (LI), autolisado total (AT), extrato de levedura (Ex) e farinha de soja desengordurada (FSD) .....	136

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Capítulo 1

- Figura 1. Perfil típico da solubilidade das proteínas de levedura ..... 21
- Figura 2. Princípio fundamental da emulsificação (sistema óleo/água): (A) formação da película contínua de emulsificante, estabilizando as gotículas de óleo ou gordura líquida; (B) características da molécula do agente emulsificante mostrando suas porções hidrofílicas e hidrofóbicas..... 23

## Capítulo 2

- Figura 1. Primeiro processo de limpeza (lavagens) e desamargamento da biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente de cervejarias ..... 48
- Figura 2. Segundo processo de limpeza (lavagens) e desamargamento da biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente de cervejarias ..... 49
- Figura 3. Fluxograma para obtenção de células de levedura íntegras desidratadas, autolisado total desidratado e extrato bruto..... 51
- Figura 4. Fluxograma seguido na purificação parcial (clarificação) e desidratação (Spray Dryer) do extrato de levedura ..... 52

## Capítulo 3

- Figura 1. Representação gráfica do PER (Quociente de Eficiência Protéica) e NPR (Quociente de Eficiência Protéica Líquida) para ratos em dietas de caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT) e extrato de levedura (Ex) ..... 78

Figura 2. Evolução do peso corporal de ratos submetidos durante 20 dias a dieta contendo como única fonte de proteína: caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT); extrato de levedura (Ex) e dieta aprotéica (AP)..... 79

Figura 3. Representação gráfica dos índices séricos de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol em ratos alimentados com dietas contendo: caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) na base de 10% de proteína e uma dieta comercial (COM) .... 84

#### Capítulo 4

Figura 1. Organograma geral de execução dos experimentos;  $T_0$  = tempo zero (início);  $T_{15}$ ,  $T_{31}$  e  $T_{50}$ , respectivamente 15, 31 ou 50 dias após o início do experimento.....96

Figura 2 A, B, C. Curvas de crescimento para ratos recém desmamados mantidos em dietas-padrão (CAS 20%) e dietas em que 10, 20 ou 30% da dieta de caseína foi substituída por misturas (amido de milho + produto de levedura +óleo de soja) contendo, respectivamente, 4, 8 e 12% de produto de levedura. **A)** dieta-padrão e dietas substituídas contendo células íntegras de levedura; **B)** dieta-padrão e dietas contendo autolisado total de levedura; **C)** padrão de caseína e dietas contendo extrato de levedura. As substituições foram feitas mantendo as dietas isoprotéicas e isocalóricas .....102

## Capítulo 5

- Figura 1. Equipamento utilizado para medir a capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e a capacidade de absorção espontânea de óleo (CAO).....126
- Figura 2. Perfil de solubilidade protéica em função para amostras de levedura integral (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e farinha de soja desengordurada (FSD).....129
- Figura 3. Representação gráfica da absorção de água em função do tempo para amostras de levedura integral (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).....131
- Figura 4. Representação gráfica da absorção de óleo para as amostras: levedura integral (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e farinha de soja desengordurada (FSD) .....131
- Figura 5. Perfil da capacidade de retenção de água (CRA) em função do pH para: levedura integral (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e farinha de soja desengordurada (FSD) .....132
- Figura 6. Representação gráfica da capacidade emulsificante (CE) da mistura de solução de ovalbumina 0,2% em concentrações crescentes de autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).....133
- Figura 7. Variação do volume de óleo incorporado à solução de ovalbumina 0,2% em função da adição crescente de autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD) para que ocorra a quebra da emulsão. ....135

## RESUMO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as propriedades funcionais e nutritivas do autolisado e extrato de levedura após a otimização do processamento da biomassa para a obtenção dos produtos a serem avaliados (levedura íntegra seca – LI, autolisado total – AT e extrato de levedura – Ex). A levedura íntegra utilizada foi a do gênero *Saccharomyces sp.* proveniente de cervejarias (resíduo) que possui um sabor acentuadamente amargo. O trabalho consistiu em quatro etapas, sendo que na primeira procurou-se otimizar os processos de obtenção de autolisado e extrato que foram analisados para composição centesimal, perfil de aminoácidos, composição mineral e perfil de ácidos graxos. Na composição centesimal os resultados foram: proteínas (46% - 61%), sendo o maior valor para o extrato e o menor para o autolisado; fibra total (2,7 - 25%), sendo o menor valor para o extrato e o maior para o autolisado; minerais ( 6,8 - 12,5%), sendo o menor valor para o autolisado e o maior para o extrato. O perfil de aminoácidos essenciais apresentou concentrações superiores ao padrão de referência da FAO/WHO para o extrato e levedura íntegra, sendo que para o autolisado os aminoácidos sulfurados totais representaram 85% do padrão de referência. A composição em minerais revelou que o autolisado e o extrato atendem, em boa parte ou no todo, as recomendações de ingestão diária. Os derivados de levedura apresentaram um bom perfil de ácidos graxos essenciais sem grandes variações nas concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados, comparados com a levedura íntegra. Na segunda etapa realizou-se o primeiro ensaio com ratos cujo objetivo foi determinar o valor nutritivo da proteína na levedura e seus derivados. Não houve diferença estatística quanto aos índices PER e NPR quando a comparação foi feita entre os produtos de levedura, sendo que todos apresentaram valores inferiores ao da caseína. Quanto à capacidade de promover crescimento, os resultados foram: LI > Ex > AT, sendo que a caseína apresentou o maior valor. Para a utilização líquida da proteína

(NPU) o melhor resultado foi para a caseína seguido das outras três fontes protéicas que não diferiram entre si. De uma maneira geral o valor nutritivo da proteína de levedura foi 80 – 85% do valor da caseína. Na terceira etapa determinou-se o valor nutritivo global dos derivados de levedura. Todas as dietas preparadas com adição de 4, 8 e 12% de produtos de levedura na dieta padrão, mantendo-se isoprotéicas e isocalóricas, promoveram um crescimento ligeiramente superior nos ratos quando comparados com a dieta de caseína. O ritmo de crescimento aumentou proporcionalmente ao aumento dos produtos de levedura nas dietas. Os índices séricos avaliados (ácido úrico, uréia e atividade das transaminases TGO e TGP), não indicaram sintomas de intoxicação pelos produtos de levedura. Na quarta etapa do trabalho os produtos foram avaliados para algumas propriedades funcionais. O índice de solubilidade do nitrogênio apresentou-se 17% inferior para o autolisado e 33% superior para o extrato, comparados com a levedura íntegra. Observou-se que o processamento produziu uma queda significativa nos valores de absorção espontânea de óleo, tendo ocorrido uma redução de 43% para o autolisado e de 59% para o extrato, comparados com a da levedura íntegra. O processo provocou um aumento relativo na capacidade de retenção de água do autolisado, sendo 43% superior à da levedura íntegra. A adição de 0,5 a 4,0% de autolisado ou de extrato de levedura em solução de ovalbumina 0,2%, promoveu um aumento na capacidade de incorporação de óleo de até 2,4 vezes para o autolisado e de até 1,7 vezes para o extrato.

A análise global da pesquisa permite concluir: a) foi possível desenvolver processos de produção de autolisado e de extrato de levedura que representaram excelentes fontes de proteínas, minerais e fibra dietética (exceto extrato), apresentando composição adequada em aminoácidos essenciais, sendo que somente o autolisado se mostrou ligeiramente limitante em aminoácidos sulfurados totais; apresentaram ainda um bom perfil de ácidos graxos e de minerais essenciais; b) Quanto ao valor protéico (PER, NPR e NPU), os compostos de levedura apresentaram um resultado equivalente

a 80-85% do valor da caseína, sendo que a parede celular diminuiu significativamente o índice de digestibilidade para a levedura íntegra e para o autolisado, embora não tenha afetado a utilização líquida da proteína (NPU); os produtos de levedura não provocaram elevação nos níveis sanguíneos de ácido úrico acima da faixa considerada normal; c) A levedura e seus derivados se mostraram eficientes na substituição de uma dieta completa em 4, 8 e 12%, permitindo aos ratos um ganho de peso ligeiramente superior ao da dieta padrão de caseína, além de não afetarem os índices de ácido úrico, uréia e transaminases, sugerindo não ter havido nenhum tipo de lesão hepática e/ou renal; d) Quanto às propriedades funcionais (solubilidade, retenção de água, absorção de água e de óleo) observou-se que o processamento provocou alterações de forma diferenciada em cada fração; o uso dos produtos de levedura (autolisado e extrato) em emulsões aumentou o volume de óleo incorporado ao sistema bem como a sua viscosidade e a consistência.

## GENERAL SUMMARY

The general objective of this investigation was to evaluate the functional and nutritive properties of the yeast autolysate and yeast extract after processing of the yeast biomass to obtain the products (dehydrated yeast cells – LI, total autolysate – AT, and yeast extract – Ex). The yeast cells utilized was a *Saccharomyces sp.* originated in breweries as a residue and possessing a strong bitter flavor. Practically the work was divided in four phases. The first phase consisted in the optimization of the processes for obtaining autolysate and extract from dehydrated yeast cells which were characterized for proximate percent composition, amino acids, minerals and fatty acids profiles. Percent composition was as follows: proteins (46 – 61%), the highest value for the extract and the lowest for the autolysate; total fiber (2.7 – 25%), the lowest value for the extract and the highest for the autolysate; minerals (6.8 – 12.5%), the lowest value for the autolysate and the highest for the extract. The essential amino acids profile showed concentrations higher than the FAO/WHO reference pattern for the extract and yeast unbroken cells; for the autolysate total sulfur amino acids was 85% of the reference standard. Mineral composition revealed that the autolysate and the extract fulfill, in a whole or in part, the recommendations of daily intake. The yeast derivatives presented good essential fatty acids profiles and no great variations were detected between saturated and unsaturated acids, compared with the whole yeast cells. In the second phase the first rat assay was performed for determining the protein nutritive value for the whole yeast cells and derivatives. No statistical differences were found for the PER and NPR among the yeast products which produced lower values than the casein values. Regarding growth promoting power the results were: LI > Ex > AT, all inferior to casein. For net protein utilization (NPU) better result was found for casein followed by the yeast products which did not differ among themselves. Overall the yeast protein nutritive value was 80-85% the casein value. In the third phase the

nutritive value of the whole yeast products was determined, on diets in which 4, 8 and 12% yeast products were introduced in a standard rat diet. The yeast enriched diet promoted slightly superior growth to the rats than the standard casein diet. Uric acid, urea and the transaminases (TGO and TGP) activities determined in the rat serum revealed no symptoms of intoxication by the yeast and yeast products. In a fourth phase some functional properties were evaluated in the yeast cells and yeast derivatives. Compared to the yeast cells, nitrogen solubility was 17% lower in the autolysate and 33% higher in the extract. Processing decreased significantly spontaneous oil absorption (43%) for the autolysate and (59%) for the extract, compared with the whole yeast cells. Processing promoted a relative increase in the water retention capacity of the autolysate of 43% in relation to the whole yeast cells. Addition of 0.5% to 4.0% autolysate or extract to a 0.2% ovalbumin solution increased oil incorporation (emulsification) up to 2.4 fold for the autolysate and 1.7 fold for the yeast extract.

The overall appreciation of the results permit to conclude: a) processes were developed to produce yeast autolysate and extract which are good sources of proteins, mineral and dietary fiber (except for extract), presenting adequate essential amino acid composition; only the autolysate presented slight limitation of total sulfur amino acids; b) protein values (PER, NPR and NPU) for the yeast and yeast derivatives were equivalent to 80-85% of the casein values. Cellular wall interfered negatively with digestibility of the whole yeast cells and autolysate protein; although NPU were not affected. Yeast products did not cause elevation of uric acid above normal range for the rat; c) replacement of 4, 8 and 12% of nutrients of a complete rat diet for equivalent amounts of yeast cells or yeast derivatives improved rat growth without significantly increase blood levels of uric acid, urea, and transaminases, suggesting that no liver or kidney lesions had occurred; d) as to functional properties (solubility, water retention, water and oil absorption) differential processing effects were observed for each

fraction. The use of yeast products (autolysate or extract) in O/W emulsions, increased the volume of oil incorporated into the system as well as its viscosity and consistency.

# CAPÍTULO 1

## LEVEDURA E PRODUTOS DE LEVEDURA: ESTADO DA ARTE

### 1.1.Introdução

A produção insuficiente de alimentos com alto teor de proteínas e o agravamento da contaminação ambiental tem impulsionado a procura de novos recursos e metodologias para enfrentar e solucionar o problema da escassez alimentar e deterioração do ambiente.

CHEFTEL (1989) afirmou que, segundo dados da ONU, no ano 2000 haveria deficiência de 400 milhões de toneladas em cereais, tendo em vista o aumento da população. Tem-se, com isto, a oportunidade do uso de fontes não convencionais de proteína, especialmente a levedura. As leveduras são organismos unicelulares classificadas como fungos. Elas têm sido grandemente utilizadas na indústria de cerveja por sua capacidade fermentativa tanto com o objetivo da produção de álcool quanto da produção de dióxido de carbono.

Pode-se obter 226,8g de sólidos de levedura *Saccharomyces cerevisiae* por barril de cerveja produzido. Segundo DZIEZAK (1987b) os Estados Unidos da América do Norte produzem sozinhos, em um ano, cerca de  $3,4 \times 10^{10}$  gramas de sólidos de levedura usadas na fabricação de cerveja da qual somente uma pequena quantidade é reciclada.

Além de seu uso na indústria cervejeira, a levedura e seus derivados são frequentemente adicionados ao processo de produção de alimentos com o fim de enriquecimento de seu valor nutritivo aumentando o teor de proteínas e o conteúdo vitamínico.

O extrato de levedura obtido por autólise é composto de proteínas, polipeptídios de baixo peso molecular e outros materiais intracelulares que têm sido grandemente utilizados como aditivos para a produção de sopas, molhos, flavorizantes com sabor à carne, temperos e produtos com sabor de queijo. Estes extratos são preparados por autólise, plasmólise e hidrólise. A autólise, cuja função principal é a ruptura das paredes celulares e hidrólise das proteínas em moléculas menores, é considerada um processo irreversível pois resulta na morte das células. A autólise das células de qualquer idade pode ser induzida pelo aumento da temperatura, adição de substâncias plasmolizantes, ruptura mecânica e outros fatores que facilitem o rompimento da parede celular e ativação das enzimas da própria célula.

A biomassa de levedura, utilizada para a produção do autolisado, tem um conteúdo de proteínas de cerca de 50% com um perfil aceitável de aminoácidos. Contudo, apesar do valor nutritivo de suas proteínas, é necessário a remoção de seus ácidos nucleicos devido à baixa capacidade do organismo humano de metabolizá-los.

## 1.2.Revisão da Literatura

### 1.2.1. Levedura como matéria-prima para as indústrias de alimentos e farmacêutica

As leveduras são fungos unicelulares empregados, em sua maior parte, na fabricação de cerveja e na panificação. As leveduras são classificadas em duas formas: ativas e inativas. As leveduras ativas são aquelas utilizadas em fermentação, enquanto que as inativas, também chamadas leveduras secas, são substâncias não fermentativas, utilizadas principalmente como flavorizantes ou suplemento nutricional (LEE, 1996). Ainda quanto à sua classificação em nível de importância industrial, pode-se dizer que existem as leveduras verdadeiras (que têm a capacidade de formar esporos) e as leveduras assexuadas, conhecidas como falsas leveduras (DZIEZAK, 1987b).

Neste trabalho, será avaliado o uso da *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura pertencente a classe das verdadeiras obtida como subproduto do processo de fabricação de cerveja (DZIEZAK, 1987b).

MARQUES et alii (1998), afirmaram que, segundo o Instituto Cubano de Investigação sobre Derivados de Cana de Açúcar - ICIDCA (1988), de todas as leveduras a *Saccharomyces cerevisiae* é a que tem maior valor industrial e comercial devido ao seu elevado teor de lisina.

A maior produção de biomassa de levedura do Brasil é derivada da indústria cervejeira e de álcool, sendo seu produto de descarte um sério problema de poluição ambiental (PACHECO et alii, 1997).

Segundo PEIXOTO (1996) a biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) tem sido produzida no Brasil, no setor cervejeiro, em quantidade aproximada de 3500 ton/ano.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando utilizada como suplemento alimentar para animais, provou ser uma boa fonte de nutrientes produzindo uma melhora em ganho de peso, um aumento no tamanho dos ovos e uma maior resistência às doenças das aves (UMA & POLASA, 1990).

Atualmente tem-se reconhecido os usos da levedura em diversas áreas como em substituição aos extratos de carne, produção esta viabilizada pelo fato das leveduras possuírem flavorizantes como glutamato de sódio e potenciadores de flavor como os 5' nucleotídeos (guanosina-5'-monofosfato, GMP e inosina-5'-monofosfato, IMP). Em estudos feitos para avaliação do uso destes nucleotídeos na área de saúde, observou-se a função dos mesmos na recuperação do trato gastrointestinal de animais submetidos a uma diarreia crônica. Sabe-se que a diarreia produz, entre outros efeitos, a perda do tecido epitelial do intestino. Observou-se os efeitos benéficos da dieta de nucleotídeos para a recuperação deste tecido epitelial, uma vez que se obteve um aumento nos conteúdos de DNA e a atividade das enzimas lactase, maltase e sacarase, havendo uma recuperação rápida do tecido. Além da recuperação intestinal, observou-se também a melhora de ratos com problemas hepáticos ao se fornecer uma dieta intravenosa com 70% de nucleotídeos, havendo uma melhora na recuperação do fígado (BEHELOVÁ et alii, 1991; OTERO et alii, 1996; WILLIS, 1993; CARVER et alii, 1990; ALBRECHT & DEINDOERFER, 1966).

Em estudo realizado por CARÍAS & MILLÁN (1996), observou-se que o resíduo de cervejaria poderia ser utilizado como fonte protéica complementar em dietas para frango, sendo que, com a substituição de 20% de proteína de soja por proteína do resíduo de cervejaria na dieta, não houve diferença significativa no crescimento e ingestão de alimento dos frangos quando comparados com frangos alimentados com dieta preparada com proteína de soja. Os valores de PER e NPR foram muito similares para as dietas contendo somente proteína de soja.

NEKLYUDOV et alii (1998), ao utilizarem a levedura de cervejaria *Saccharomyces Carlsbergensis*, em uma hidrólise de sangue bovino, conseguiram um aumento do rendimento da hidrólise de 11% para 55%. Além desta melhoria no rendimento, os autores obtiveram um produto final com nível de composição aminoacídica balanceado adicionando pancreatina na mistura reativa contendo levedura.

Apesar de todos esses possíveis usos da levedura, sabe-se que a maior parte do resíduo de cervejaria tem sido utilizada para a fabricação de ração animal, havendo a necessidade de mais estudos para a elaboração de derivados para uso em alimentação humana, uma vez que se trata de um material rico em proteínas, vitaminas e minerais (BENASSI et alii, 1990; BEHELOVÁ et alii, 1991; BELEM et alii, 1997).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* derivada de cervejaria é considerada fonte alimentar para consumo humano, segundo a American Pharmaceutical Association, após ter sido liberta de seu sabor amargo característico. A composição desta levedura, segundo essa mesma associação, não deve ser inferior a 45% de proteína

(N x 6,25), 120 µg/g de tiamina, 40 µg/g de riboflavina e 30 µg/g de niacina (MARQUES et alii, 1998).

### **1.2.2. Processamento da levedura: produtos de levedura**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser utilizada como fonte de alimentação humana não somente por suas boas características de fermentação mas também por seu elevado valor nutritivo e propriedades funcionais tecnológicas de sua proteína, sendo que o fator limitante de seu uso como fonte protéica é a necessidade de redução de seu teor de RNA para diminuir a toxidez, bem como o rompimento da parede celular para aumentar sua digestibilidade. Com relação ao elevado conteúdo de ácidos nucleicos (principalmente RNA) sabe-se que os humanos não possuem algumas das enzimas necessárias para metabolizá-lo (enzima uricase), provocando um aumento no índice de ácido úrico no sangue e em alguns tecidos (MARQUES et alii, 1998; HALÁSZ et alii, 1988; ALVAREZ & ENRIQUEZ, 1988).

O teor de ácidos nucleicos na levedura varia de 8 a 25g por 100g de proteína, sendo a maior parte de RNA (ácido ribonucleico). Do ponto de vista nutricional, a ingestão de ácido nucleico acima de 2g/dia causa desordens como: uricemia, gota e formação de pedra nos rins. Deve-se, portanto, reduzir o teor de ácidos nucleicos a níveis mais seguros (MARQUES et alii, 1998).

ALVAREZ & ENRIQUEZ (1988), testaram a redução do nível de ácidos nucleicos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da fabricação de cerveja através de um tratamento alcalino com hidróxido de amônio de onde obtiveram bons resultados, com uma redução a menos de 2% para os extratos.

BENASSI et alii (1990), obtiveram uma redução no teor de RNA em levedura proveniente da produção de álcool de cana através de tratamento enzimático. Conseguiram uma redução de 28% no teor de RNA, mas houve redução no teor de vitaminas e minerais em cerca de 70%.

Para se obter o valor nutritivo desejável das proteínas de microorganismos como a levedura deve-se prosseguir com o rompimento da parede celular e a liberação dos componentes da célula, além da complementação com os aminoácidos limitantes. Pode-se conseguir a ruptura da parede celular através de vários processos como autólise, hidrólise, ação enzimática, ação química e ação mecânica. O processo de hidrólise é feito com um ácido forte, tendo como maior inconveniente a necessidade de neutralização do ácido utilizado, o que produz um elevado teor de sais, podendo chegar à 40%. No uso de métodos químicos os principais problemas estão relacionados à posterior eliminação dos reagentes, sua recuperação e possível formação de resíduos tóxicos provenientes das reações. O processo de autólise utiliza a ação de enzimas da própria célula para o rompimento da parede celular. Este processo será tratado mais profundamente, uma vez que nele não há o inconveniente da produção de sais como no caso da hidrólise ácida e não tem o problema de formação e/ou contaminação por resíduos tóxicos como no caso do uso de métodos químicos (SGARBIERI, 1996).

Pode-se preparar o material que irá sofrer autólise (chamado pré-autolisado) por meio de um rompimento da parede celular, onde ocorre a liberação de enzimas da própria célula, o que auxilia o início do processo de autólise (OTERO et alii, 1996; SGARBIERI, 1996).

Para o processo de rompimento mecânico observou-se a necessidade de homogeneizadores eficientes especialmente adaptados para a quebra da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, visto que ela possui uma estrutura bastante rígida (BEHELOVÁ et alii, 1991).

LINDBLOM & MOGREN (1974), adicionaram 3% de NaCl a uma solução de células homogeneizadas e observaram que a 50°C, com o pH de 5,6 e 5% do material seco de levedura ocorreu uma redução de RNA para 1,4%, equivalente a uma redução de 85% em relação ao teor inicial, e chegaram à conclusão de que o NaCl melhora a degradação dos ácidos nucleicos pelas RNases endógenas.

NAUMENKO & GORDIENKO (1985), testaram vários solventes para a redução do tempo de autólise e observaram que o clorofórmio e o toluol proporcionaram um menor tempo mas que haveria maior vantagem no uso de etanol, uma vez que, apesar de ser menos efetivo na redução do tempo, obteve-se a formação de um produto com melhor qualidade sem a contaminação de solventes prejudiciais a saúde.

KOLLAR et alii (1992), desenvolveram um método para fracionamento completo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde efetuaram a desintegração das células por autólise a 50°C induzida com NaCl e etanol além de um material anteriormente autolisado, chamado pré-autolisado. Após a autólise procederam a secagem em spray dryer. Os produtos obtidos foram um extrato e uma parede celular que foram testados em diferentes aplicações nas indústrias farmacêuticas e de alimentos apresentando resultados satisfatórios. Com este tratamento conseguiram uma redução de aproximadamente 28% no teor de RNA.

## **Autólise**

É um processo lento, requerendo de 2 a 24 horas, podendo ser induzido pelo aquecimento da levedura a uma temperatura na qual a parede celular é destruída (40-50°C), em que ocorre a morte celular, promovendo a atividade das enzimas proteolíticas intracelulares como as proteases, carboidrases e nucleases. A morte das células resulta na ação indiscriminada das enzimas proteolíticas sobre os constituintes celulares. As enzimas proteolíticas intracelulares degradam as proteínas em peptídios e aminoácidos, e as nucleases atuam sobre os ácidos nucleicos para produzir nucleotídeos e nucleosídeos. O rendimento em geral não é superior à 50-60% e requer assepsia durante o processo (CRUEGER & CRUEGER, 1984; GERALD & HENRY, 1973; LINDBLOM & MOGREN, 1974; SGARBIERI, 1996).

O andamento da autólise pode ser avaliado pela variação da viscosidade da suspensão das células de levedura, e pela medida quantitativa dos produtos acumulados da hidrólise no espaço extracelular como proteínas e ácidos nucleicos. Em um experimento realizado por BABAYAN et alii (1981), observou-se que, logo após uma queda excessiva de viscosidade durante os primeiros 30 minutos de autólise, ocorre um rápido aumento na concentração de nitrogênio amínico e componentes dos ácidos nucleicos, indicando que a queda de viscosidade pode nos auxiliar na avaliação do grau de autólise.

### **• Ativadores de Autólise**

O processo autolítico pode ser acelerado através da variação de suas etapas como alterações de temperatura e utilização de ativadores de autólise como

plasmolizantes, ajustes de pH e até mesmo a adição de enzimas externas (BABAYAN et alii, 1981; LINDBLOM & MOGREN, 1974; NAUMENKO & GORDIEKO, 1985).

**Sal.** De acordo com LINDBLOM & MOGREN (1974), o cloreto de sódio é um composto que pode acelerar o processo de autólise já que funciona como plasmolizante, contribuindo para a decomposição da parede celular, o que facilita a liberação de enzimas intracelulares como a RNase promovendo, assim, uma redução no teor de ácidos nucleicos o que torna o material mais aceitável ao organismo humano, (BABAYAN et alii, 1981; GERALD & HENRY, 1973; LINDBLOM & MOGREN, 1974; NAUMENKO & GORDIENKO, 1985). O possível inconveniente do uso do cloreto de sódio no processo é o fato de o material final possuir uma quantidade muito elevada de sal (NAUMENKO & GORDIENKO, 1985; BEHELOVÁ et alii, 1991; LEE, 1996).

**Etanol.** O etanol produz uma aceleração do processo de autólise por ser um aditivo membranotrófico facilitando a retenção e a atividade das enzimas intracelulares da levedura.

NAUMENKO & GORDIENKO (1985), testaram o uso dos seguintes solventes como ativadores de autólise: clorofórmio, tolueno, etanol e formalina, a uma concentração de 1% do peso de levedura diluída em água a 75% da mistura total. Os melhores rendimentos obtidos foram os seguintes:

- Com etanol: liberação de 37% de nitrogênio amínico em 40h de autólise.
- Com tolueno: liberação de 44,7% de nitrogênio amínico em 40h de autólise.

- Com clorofórmio: liberação de 35,7% de nitrogênio amínico em 40h de autólise.
- Com formalina: liberação de 21% de nitrogênio amínico em 30h de autólise.

Pode-se observar que o tolueno como plasmolizante liderou a extração do nitrogênio amínico. Embora haja esta diferença de 8% a mais de extração ao se comparar tolueno e etanol, tem-se preferido o uso de etanol para a indústria alimentícia, devido ao efeito tóxico do tolueno. Para que se possa conseguir a redução do tempo de autólise pode-se aumentar o conteúdo de etanol. Segundo estudos feitos por KOLLAR et alii (1992), obteve-se uma redução para 24 horas, utilizando juntamente com outros meios de aceleração, 5% de etanol em peso.

**Temperatura.** LINDBLON & MOGREN (1974), testando a redução enzimática do RNA em células de levedura desintegradas, propuseram que a função do choque térmico é iniciar a autólise. Durante a incubação o RNA é degradado pelas RNases e os nucleotídeos saem de dentro das células. Estes autores testaram diversas temperaturas e chegaram à conclusão de que o melhor resultado é obtido entre 50 e 60°C, onde se constata uma forte redução do teor de ácidos nucleicos e o melhor rendimento em extração de nitrogênio.

**pH.** BELEM et alii (1997) constataram que, para extração de nucleotídeos do autolisado de *Kluyveromyces marxianus*, os resultados mais efetivos foram obtidos na faixa de pH entre 6,5 e 7,5. Avaliando a interação entre pH e temperatura, observou-se que a melhor interação está em pH 6,5 a uma temperatura de 50°C .

**Pré-autolisado.** O pré-autolisado é constituído do material obtido da ruptura mecânica e autólise o que ocasiona a liberação das enzimas endógenas da célula

para auxiliar na ruptura de novas células. Para o uso deste autolisado torna-se necessário uma temperatura entre 40 a 55°C, o que promove a atividade das enzimas intracelulares (CARVER et alii, 1990; KOLLAR et alii, 1992; MOHAMED et alii, 1995).

**Enzimas.** O processo de autólise, como mencionado, utiliza as enzimas da própria célula para obtenção do autolisado (GRIMBLE, 1996).

Existe a possibilidade de se prosseguir a uma autólise induzida, onde se faz a adição de enzimas extracelulares. Com o uso destas enzimas tem-se a vantagem da redução do tempo para obtenção do mesmo rendimento, além destas enzimas auxiliarem no rompimento da parede celular da levedura, podendo inclusive, aumentar o rendimento da autólise. KNNOR et alii (1979), utilizaram duas enzimas, zimolase/lisozima, para extração de proteínas de levedura e conseguiram a redução do tempo de autólise de 35 horas para 1 hora.

### **1.2.3.Composição e valor nutritivo da levedura íntegra e dos derivados de levedura.**

Ao se avaliar uma alimentação ou dieta deve-se levar em conta os nutrientes essenciais à vida, que podem ser distribuídos nas seguintes categorias: hidratos de carbono ou glicídios, lipídios, proteínas, vitaminas, água e minerais. Dada a importância das fibras, também podem ser classificadas como nutrientes. Os nutrientes energéticos (glicídios, lipídios e proteínas) são encontrados nos alimentos na forma de moléculas complexas, não sendo imediatamente aproveitáveis pelo organismo. É no tubo digestivo que acontece a fragmentação molecular desses

nutrientes, tornando-os facilmente absorvidos pela mucosa do trato gastrointestinal de onde passam para a corrente sanguínea e tecido hepático.

A biomassa de levedura possui um elevado conteúdo de proteínas ( $\cong$  50%) com um perfil de aminoácidos compatível com as necessidades humanas, precisando de suplementação, em geral, somente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). O teor de lipídios varia entre 2 e 7%, os glicídios de 26 a 36% e cinza entre 5 e 10%. É a maior fonte de vitaminas do complexo B, exceto B12 (MARIATH & ZUCAS, 1983; OTERO et alii, 1996; SARWAR et alii, 1985). A levedura é uma boa fonte auxiliar de nutrientes para dietas deficientes em determinados micronutrientes. A suplementação com levedura tem melhorado total ou parcialmente as dietas deficientes em cromo, selênio e molibdênio (REED & NAGODAWITHANA, 1991).

Lin et alii, em 1986, citados por MARQUES et alii (1998) avaliaram o perfil de aminoácidos da célula íntegra de cervejaria e compararam com o isolado protéico de soja e o padrão de referência da FAO/WHO/UNU, observando que este perfil se iguala ao da proteína de soja, considerada uma das melhores proteínas de origem vegetal, indicando que as proteínas de levedura na forma de concentrado, constituem ótimos complementos para produtos elaborados com cereais, onde existe carência de determinados aminoácidos como lisina e treonina.

As proteínas devem estar presentes na alimentação humana em quantidades adequadas, sendo que, para haver um balanceamento da alimentação a nível de proteínas deve-se considerar o valor nutritivo das mesmas, o qual irá depender de quatro fatores, que são: 1) composição em aminoácidos, 2) digestibilidade, 3)

biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e 4) ausência de toxicidade e/ou propriedades antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

A avaliação da digestibilidade, bem como de índices relativos à nutrição, a saber, Balanço de Nitrogênio (BN), Quociente de Eficiência Protéica (PER), Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR) e Índice de Utilização Líquida da Proteína (NPU) devem ser determinados preferencialmente por ensaios biológicos, uma vez que através destes podemos obter valores mais próximos à realidade humana, conseguindo uma estimativa do valor nutritivo sem a necessidade de estudos mais detalhados sobre biodisponibilidade, além de nos fornecer uma avaliação sobre toxidez por meio da análise do sangue dos animais.

Para uma avaliação eficaz do valor nutritivo de uma proteína de levedura deve-se prosseguir com a avaliação do balanço de aminoácidos essenciais e posterior comparação com tabelas que nos indicam a necessidade de ingestão diária para seres humanos, juntamente com a digestibilidade e a biodisponibilidade da proteína (HALÁSZ & LASZTITY, 1991; YOUNG & PELLETT, 1991).

O uso da levedura *in natura* como fonte protéica não é indicado porque irá apresentar baixa digestibilidade devido a presença de parede celular, ocorrendo uma redução de seu valor nutritivo (MOURA, 1986).

PACHECO et alii (1997), utilizaram os métodos de balanço nitrogenado e quociente de eficiência protéica (PER) para determinar o valor nutritivo da biomassa de levedura *Saccharomyces sp.*, bem como de concentrados protéicos obtidos a partir desta biomassa e observaram que a biomassa de levedura tem a capacidade de promover crescimento, além de fornecer uma retenção de nitrogênio estatisticamente

idênticas à caseína, podendo-se concluir que a levedura de cerveja é uma excelente fonte protéica.

Em um estudo do valor nutritivo da proteína isolada de levedura proveniente do resíduo de cervejaria, MARIATH & ZUCCAS (1983), observaram que a utilização líquida da proteína (NPU) em dietas com levedura aumentou de 49,52% para 71,90% com o acréscimo de metionina, chegando a ser maior do que o do grupo alimentado com a dieta controle de caseína (67,30%)

COZZOLINO & ZUCAS (1984), ao estudarem o valor nutritivo de uma biomassa protéica obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvida em melaço de cana, observaram que a biomassa possui um valor nutritivo levemente inferior ao da caseína e que o coeficiente de digestibilidade foi 10% inferior ao da caseína, além de não se observar efeitos tóxicos provenientes de sua ingestão.

De acordo com a “Food and Drug Administration” (FDA), somente células secas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Kluyveromyces fragilis* podem ser utilizadas como aditivos em gêneros alimentícios porque já foram submetidas aos testes toxicológicos exigidos por este órgão (BOZE et alii, 1992).

Ao avaliar os dados das referências bibliográficas, pode-se dizer que, se houver um tratamento prévio na levedura *in natura* para retirada de seu amargor (melhoria do sabor), quebra de sua parede celular (melhoria de sua digestibilidade) e redução do teor de RNA (redução de sua toxidez) podemos utilizar a levedura processada com êxito.

#### **1.2.4. Propriedades funcionais tecnológicas: levedura íntegra e derivados**

O termo propriedade funcional tecnológica aplicado a ingredientes alimentícios pode ser definido como toda a propriedade não nutricional que influi na produção de um determinado alimento. A maior parte das propriedades funcionais influem no caráter sensorial (principalmente a textura) mas também podem ter um importante papel no comportamento físico dos alimentos, bem como dos ingredientes usados nestes alimentos durante sua preparação, transformação e armazenamento (CHEFTEL et alii, 1989).

Os produtos protéicos são importantes ingredientes funcionais para grande número de produtos alimentícios formulados. Normalmente esses produtos são secos e na maioria dos casos possuem um alto grau de solubilidade (MORR et alii, 1985).

As proteínas podem ser adicionadas aos alimentos como ingrediente funcional para ligar água ou gordura, para formar géis ou espuma, emulsificar e alterar o sabor, a aparência e dar textura. As propriedades funcionais das proteínas podem ser modificadas por agentes físicos, químicos e biológicos, nos processos de obtenção ou isolamento, com o tipo de extração empregada, a temperatura, a força iônica, o pH e as condições de secagem e estocagem da proteína isolada (SGARBIERI, 1996; GIESE, 1994).

A levedura e seus extratos são bons exemplos de ingredientes multifuncionais, sendo que suas propriedades são obtidas de acordo com o produto final de seu tratamento. Pode-se utilizar suas propriedades nutricionais de forma a se obter um suplemento alimentar e, ao mesmo tempo, promover certas propriedades funcionais como, por exemplo, formação de géis e espumas. A levedura possui

proteínas e carboidratos que, ao serem hidrolisados enzimaticamente, fornecem aminoácidos e açúcares que podem reagir mais adiante para fornecer flavorizantes com sabor à carne ou queijo. Algumas das propriedades funcionais da levedura dependem da estrutura de seus polímeros na parede celular. Os atributos funcionais da levedura podem ser manipulados pela modificação da estrutura da parede celular de forma a alcançar as propriedades desejadas. A levedura tem sido conhecida principalmente por suas propriedades como agente flavorizante em sopas e enlatados, molhos para carnes e para doces (PENY, 1991; BATT & SINSKEY, 1984; WILLIS, 1993).

VAN IERSEL et alii (1999), ao estudarem o uso das características da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para formação do flavor em cerveja sem álcool, conseguiram um ótimo perfil de flavor trabalhando com períodos aeróbicos regulares para estimular o crescimento da levedura.

A utilização da levedura de cervejaria e seus derivados na formulação de alimentos como ingrediente funcional pode ser feita em proporções reduzidas, o que irá evitar a ingestão de grandes quantidades de RNA. Para este fim, além de conhecermos suas propriedades nutritivas, devemos também avaliar sua funcionalidade.

Na Tabela 1 pode-se ver as propriedades funcionais das proteínas que são relevantes ao sistema alimentício. Ao avaliar esta tabela observa-se que a funcionalidade de uma proteína está diretamente ligada ao sistema em que a mesma é incorporada e à sua fonte protéica (HETTIARACHCHY & ZIEGLER, 1994).

**Tabela 1-** Papel da funcionalidade das proteínas em sistemas alimentícios

<b>Propriedade</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Sistema de Alimentos</b>	<b>Fonte Protéica</b>
1. Solubilidade	Hidrofilicidade.	Bebidas	Soro protéico
2. Viscosidade	Ligação com água, hidrodinamicidade, formato (configuração).	Sopas, molhos, temperos de saladas.	
3. Ligação com água	Ligação de hidrogênio.	Embutidos de carne, bolos e pães.	Proteínas de músculo Proteínas de ovo
4. Gelatinização	Aprisionamento da água pela molécula de proteína, formação de rede.	Carnes, géis, bolos, assados e queijos.	Proteínas de músculo Proteínas do ovo Proteínas do leite
5. Coesão/Adesão	Ligação hidrofóbica, iônica e de hidrogênio.	Carnes, embutidos, pastas, materiais de panificação.	Proteínas do músculo Proteínas do ovo Proteínas do soro
6. Elasticidade	Ligações hidrofóbicas e pontes dissulfeto.	Carnes, massa de panificação.	Proteínas do músculo Proteínas do trigo
7. Emulsificação	Adsorção nas interfaces, formação de filmes.	Embutidos, mortadelas, sopas, bolos, temperos.	Proteínas de músculo Proteínas do ovo Proteínas do leite
8. Formação de Espumas	Adsorção nas interfaces e formação de filmes.	Coberturas em forma de espumas, sorvetes, bolos, sobremesas.	Proteínas do leite Proteínas do ovo
9. Gordura e Ligação de Aroma	Ligação hidrofóbica e aprisionamento do “flavor”.	Materiais de panificação, roscas, produtos com flavor de carne.	Proteínas do leite Proteínas do ovo

Fonte: HETTIARACHCHY et alii (1994)

De acordo com os possíveis usos dos produtos de levedura, pode-se considerar a importância da avaliação das seguintes propriedades funcionais: solubilidade, propriedades emulsificantes, absorção de água, retenção de água e absorção de óleo.

### **Solubilidade**

A solubilidade é uma propriedade físico-química das proteínas também avaliada como propriedade funcional devido a sua forte influência sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos (SGARBIERI, 1996). A solubilidade de uma proteína pode ser alterada de acordo com o estado físico-químico de suas moléculas. A variação de estado de uma molécula pode alterar tanto positiva quanto negativamente a sua solubilidade. Alterações em seu processo de secagem, aquecimento e outros tratamentos durante o processo de manufatura e estocagem provocam uma variação de estado da molécula com consequente alteração em sua solubilidade (MORR et alii, 1985).

As alterações físico-químicas do meio podem modificar a solubilidade de uma proteína porque podem provocar mudança (ou mudanças) em sua estrutura quaternária, terciária ou secundária o que se costuma denominar desnaturação protéica. Os meios físico-químicos de desnaturação são aqueles que perturbam as ligações físico-químicas, provocando alterações nas estruturas. Dentre estes meios podemos citar o calor, o tipo de solvente e o pH. Por exemplo, à medida em que a temperatura aumenta e as condições do pH se afastam do p.I. (pH isoelétrico), tem-se um aumento da solubilidade (FARFÁN, 1994).

Normalmente os testes mais utilizados para o estudo de solubilidade são: 1) a proporção de solubilidade do nitrogênio e 2) o perfil de solubilidade em função do pH, da força iônica e do tratamento térmico.

PACHECO & SGARBIERI (1998), testaram a solubilidade de concentrados protéicos de levedura preparados por precipitação isoeletrica, extração com perclorato de sódio e extração com trimetafosfato de sódio. Os três extratos protéicos apresentaram uma curva de solubilidade que varia consideravelmente em função do pH, sendo que a solubilidade foi maior para a proteína extraída com trimetafosfato de sódio em todos os pH's, exceto para o pH 4,0. O mesmo ocorreu para a proteína extraída com perclorato de sódio, sendo que a proteína extraída por precipitação isoeletrica foi a menos solúvel.

Em estudo da composição de frações do hidrolisado protéico de levedura do gênero *Candida*, SOBOLEVA & POPOVA (1986) concluíram que a desnaturação, causada principalmente pelos métodos de secagem, fez com que a solubilidade aumentasse consideravelmente em pH's alcalinos.

Na Figura 1 observa-se um perfil típico da solubilidade das proteínas da levedura, onde podemos detectar uma solubilidade mínima no pH entre 4,0 e 4,5 e uma maior solubilidade obtida a pH alcalino.

HUANG & KINSELLA (1986), prepararam uma amostra de levedura fosforilada e observaram que a proteína de levedura apresentou um aumento de solubilidade na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 em relação à levedura integral.

HASSAN et alii (1981), prepararam isolados protéicos de levedura por meio da extração alcalina de diferentes fontes de levedura e determinaram suas propriedades funcionais, sendo que o perfil de solubilidade dos preparados foram similares e o volume de espuma produzido pelos mesmos foi significativamente menor do que o produzido pela levedura íntegra.

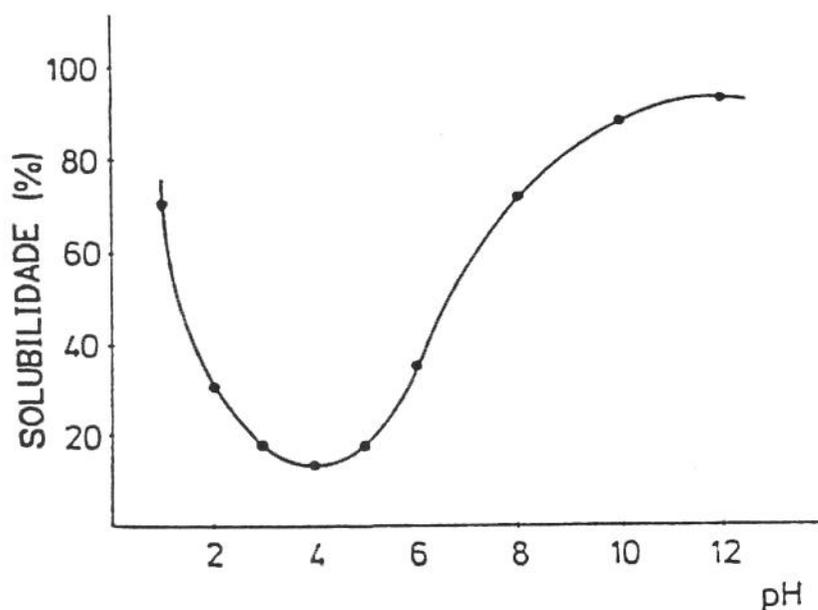


Figura 1 – Perfil típico da solubilidade das proteínas de levedura

Fonte: HALÁSZ & LÁSZTITY (1991)

A solubilidade das proteínas de levedura, principalmente em pH's mais comuns nos alimentos, é muitas vezes inferior ao de outras proteínas como a soja. Contudo, de acordo com o processo de extração, precipitação e secagem, pode-se alterar esta propriedade (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

O teor de nitrogênio solúvel da biomassa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida por precipitação isoelétrica é superior a 75% próximo do pH 9,0 e a solubilidade mínima ocorre na faixa de pH entre 3,0 e 5,0 (SCHWENKE et alii, 1980).

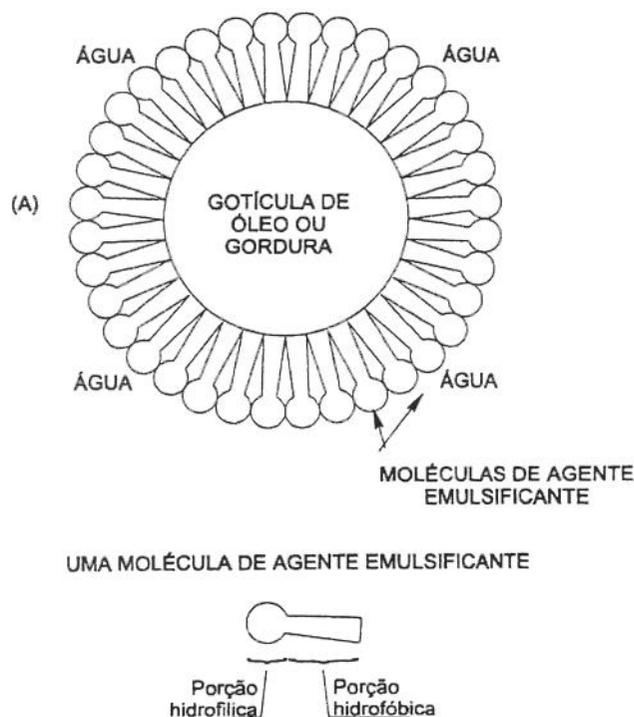
## Propriedade Emulsificante

Pode-se definir emulsão como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo que um é disperso na forma de glóbulos no outro líquido. Existem basicamente dois tipos de emulsão: a) de óleo em água (O/A), por exemplo, salsichas, leite, maionese e b) de água em óleo (A/O), por exemplo, manteiga e margarina (SGARBIERI, 1998).

Como a água e o óleo são imiscíveis, há necessidade de uma agitação mecânica para que se forme uma dispersão homogênea dos dois líquidos. Contudo, esta dispersão não constituirá uma emulsão em virtude da tendência natural de separação dos dois líquidos. Pode-se obter uma emulsão estável adicionando ao sistema um agente emulsificante, como, por exemplo, uma proteína. As proteínas funcionam como agente emulsificante devido a sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre as duas fases (óleo/água), pelo fato de possuir em sua molécula partes hidrofílicas e hidrofóbicas com localizações distintas em sua estrutura (SGARBIERI, 1998; HALLING, 1981).

Na formação da emulsão as moléculas de proteína se difundem e são adsorvidas na interface óleo/água. A migração da proteína para a interface é termodinamicamente favorável porque uma certa energia conformacional de hidratação da proteína é perdida na interface. Atingida a interface, a maioria das proteínas sofre um desdobramento, se reorienta e se espalha para formar um filme contínuo e coeso. O lado hidrofóbico da proteína se orienta para a face apolar (óleo) enquanto que as cargas e/ou seguimentos polares se orientam para contactar a fase aquosa e a maior parte das moléculas ocupa a interface, interagindo com as moléculas vizinhas e conferindo força e viscoelasticidade ao filme (SGARBIERI,

1998). O princípio de formação da emulsão com o uso de um agente emulsificante pode ser visto na Figura 2.



**Figura 2.** Princípio fundamental da emulsificação (sistema óleo/água): (A) formação da película contínua de emulsificante, estabilizando as gotículas de óleo ou gordura líquida; (B) características da molécula do agente emulsificante mostrando suas porções hidrofílicas e hidrofóbicas.

Para se comparar as propriedades emulsificantes das proteínas pode-se utilizar a análise da capacidade de emulsificação (CE), dada pela relação entre o volume de óleo que se pode emulsionar (mL) e a massa de amostra ou de proteína (g) até que se obtenha uma inversão de fases. A inversão de fases pode ser observada pela quebra da viscosidade, mudança de cor (normalmente utilizando-se um corante lipossolúvel) ou pelo aumento de resistência elétrica.

De KANTEREWICZ et alii (1987) estudaram a relação entre a capacidade de absorção espontânea de água (WAC) e de óleo (OAC) e a capacidade de emulsificação e chegaram à conclusão que a capacidade emulsificante (CE) está diretamente relacionada com a razão entre a absorção de água e a de óleo (WOAI), expressa em mL de água absorvida/ mL de óleo absorvido. Utilizando duas proteínas de soja os autores mostraram que houve uma relação direta entre o balanço hidrofílico/lipofílico (WOAI) e a capacidade emulsificante (CE), sendo que a melhor capacidade emulsificante obtida foi a da soja desnaturada, em condições na qual houve um aumento excessivo da capacidade de absorção espontânea de água (WAC). Desta forma, pode-se prever a capacidade emulsificante pelo cálculo do balanço hidrofílico/lipofílico(WOAI).

São muitos os fatores que influem nas características das emulsões e nos resultados dos ensaios, a saber: tipo e desenho do equipamento, intensidade do porte energético, velocidade de adição do óleo, volume da fase lipídica, temperatura, pH, força iônica, presença de açúcares, presença de surfactantes de baixo peso molecular, exposição ao oxigênio, características do óleo (ponto de fusão), concentração em proteína solúvel e propriedades emulsificantes da proteína. Estes fatores explicam a dificuldade na comparação de dados obtidos pelos pesquisadores devido a não padronização das condições de determinação (KINSELLA, 1976).

Robbins & Selley, em 1978, citados por MARQUES (1998), observaram a importância do uso da glicana extraída da levedura como agente emulsificante devido ao aumento na preferência do público pelo consumo de produtos naturais, além da oportunidade de se utilizar um subproduto da fermentação da cerveja que normalmente seria descartado.

OTERO et alii (1996), observaram um elevado poder na capacidade emulsificante do isolado protéico de levedura e da parede celular de levedura quando comparados com o isolado protéico de soja em diversas faixas de pH.

### **Capacidade de Absorção Espontânea de Água (CAA) e Capacidade de Retenção de Água (CRA)**

Os termos mais frequentemente encontrados para se referir à capacidade de retenção e de absorção de água são: capacidade de reter água (water holding capacity - WHC) e capacidade de absorver água (water absorption capacity - WAC). A capacidade de retenção de água é muito importante em produtos cárneos porque influi em atributos como textura, suculência e maciez (SGARBIERI, 1996).

A capacidade de ligar água varia com o tipo de proteína, concentração, pH, presença de sais, carboidratos, lipídios e pode ser influenciada por condições prévias de processamento, como, por exemplo, aquecimento e tratamento com álcali. Muitas vezes a desnaturação parcial melhora a capacidade de retenção de água, principalmente em proteínas com estrutura muito compacta, onde o desdobramento parcial da estrutura leva à superfície ligações peptídicas e grupos polares que apresentavam-se ocultos (CHEFTEL et alii, 1989).

De acordo com HUMPHRIES (1982) a propriedade de absorver água pode variar conforme o método de obtenção do material protéico e concluiu que os tratamentos com solventes orgânicos para extrair ou fracionar uma proteína resultam num acréscimo da capacidade de absorver água.

Para que exista a propriedade de absorção ou retenção de água deve haver a atração hidrofílica que pode ser medida como o grau de hidratação (mL água / g de

proteína) e como a habilidade do produto em captar água espontaneamente (esponjamento). Relaciona-se também com a quantidade de água que permanece na proteína ou alimento protéico, após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força centrífuga ou pressão (capacidade de retenção de água) (SGARBIERI, 1996).

A alteração de uma estrutura molecular em forma globular compacta para uma conformação “random coil”, causada por desnaturação proveniente de aquecimento bem como por tratamentos com reagentes pode capacitar a molécula protéica a ligar mais água do que a conformação nativa (GIESE, 1994; CHOU e MORR, 1979). De acordo com HUMPHRIES (1982), a propriedade de absorver água pode variar de acordo com o método de obtenção do material protéico e conclui que os tratamentos com solventes orgânicos para extrair ou fracionar as proteínas resultam num acréscimo da capacidade de absorver água.

HALL (1996), utilizou como método para determinação da capacidade de retenção de água, a incubação de 5g de amostra com 8mL de água por 30 minutos, com posterior centrifugação. O teor de água retida na amostra (CRA) consistiu em: (volume de água adicionada – volume de água retirada após a centrifugação) x 100/peso da amostra.

A absorção de água de concentrados e isolados protéicos de levedura varia entre 3,0 e 4,0 mL/g de amostra. Estes valores são comparáveis ou inferiores à capacidade de absorção de água da proteína de soja não aquecida (KINSELLA, 1976; HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

SCHACHTEL (1981), estudando diferentes preparações para a *Candida utilis*, observou que diferentes processos refletem na capacidade de retenção da água de seus preparados. As técnicas usadas para reduzir o teor de RNA não afetaram na capacidade de retenção de água. Observaram-se vários fatores envolvidos com retenção de água como o pH, grau de desnaturação das proteínas, o tamanho e a forma das partículas nas diferentes preparações.

A capacidade de retenção de água da levedura fosforilada foi amplamente estudada por HUANG & KINSELLA (1986), onde se observou que para todos os valores de pH estudados (5,0 a 8,0) a capacidade de retenção de água ia aumentando à medida que se intensificava o processo de fosforilação.

OTERO et alii (1996), observaram que a capacidade de retenção de água do concentrado protéico de levedura e da proteína da parede celular foram superiores à capacidade de retenção de água do isolado protéico de soja.

PACHECO & SGARBIERI (1998), ao produzirem um concentrado protéico de levedura de cerveja através de precipitação isoelétrica, outro por extração com perclorato de sódio e outro por extração com trimetafosfato de sódio, mostraram que o último produto apresentou maior capacidade de retenção de água do que os dois primeiros, o que pode ter ocorrido devido a introdução de grupos fosfato na cadeia polipeptídica, causando mudança estrutural e conformacional, facilitando as ligações com a molécula de água.

## **Capacidade de Absorção Espontânea de Óleo (CAO)**

A capacidade da proteína em interagir com materiais lipídicos é importante na formulação e processamento dos alimentos. Esta capacidade influi em muitas outras propriedades, como por exemplo, emulsão e absorção do “flavor” (De KANTEREWICZ et alii, 1989).

A propriedade físico-química que melhor descreve a afinidade da proteína por óleo devido a interações lipofílicas é determinada pela absorção espontânea de óleo. Esta propriedade tem grande importância na avaliação de uma amostra quanto às características emulsificantes, uma vez que para avaliar a capacidade de formação de uma emulsão pode-se utilizar o balanço de propriedades hidrofílicas e lipofílicas da proteína (HLB), (De KANTEREWICZ et alii, 1987).

A capacidade de absorver óleo é uma importante propriedade funcional no que se refere ao uso do concentrado protéico em alimentos que poderão sofrer fritura, sendo que o excesso de absorção irá reduzir a aceitabilidade e a vida de prateleira do produto.

Em seu estudo para fracionamento completo da levedura de cerveja, OTERO et alii (1996), observaram que a capacidade de absorção de óleo do concentrado protéico de levedura e da parede celular da levedura é bastante superior a do isolado protéico de soja.

MOHAMED et alii (1995), realizaram um estudo com diferentes fontes de proteína como o soro de leite, leite em pó desnatado, isolado protéico de soja, clara de ovo e ovo integral, em diversas formulações de sonhos e chegaram à conclusão

de que o uso de clara de ovo com o isolado protéico de soja e o leite em pó desnatado ou soro de leite, resultaram em sonhos fritos com reduzido teor de gordura. Observaram um decréscimo na absorção de óleo com a substituição do ovo integral pela clara de ovo, provavelmente em função do caráter hidrofílico/lipofílico da ovalbumina.

### **1.2.5. Propriedades funcionais fisiológicas de alguns componentes da levedura**

Alimentos que possuem propriedades funcionais fisiológicas, também chamados alimentos funcionais ou nutracêuticos, são aqueles que promovem benefícios à saúde além de suas características nutritivas, podendo ser utilizados na prevenção ou tratamento de doenças. Em 1980 observou-se o início de uma revolução nutracêutica com a descoberta dos benefícios clínicos do cálcio (De FELICE, 1995)

Também conhecidos como alimentos nutracêuticos, temos os alimentos probióticos, que são definidos como microorganismos capazes de persistir viáveis do começo ao fim de seu trânsito através do trato gastro-intestinal. Alimentos conhecidos como leites fermentados que contém atividade probiótica têm sido propostos para aumentar o bem-estar do organismo, além de serem indicados na prevenção de infecções intestinais e no tratamento ou prevenção de diarreias em crianças (BRASSART & SCHIFFRIN, 1997).

De FELICE (1995), afirmou que, em uma pesquisa do New York Times, descobriu-se que 40% dos alimentos dos americanos são produzidos também com o intuito de introduzir características nutracêuticas.

Kelloggs, Nestlé e Monsanto são alguns exemplos de grandes companhias de alimentos que têm criado unidades exclusivas para o desenvolvimento de alimentos nutracêuticos (HASLER, 1998).

Como exemplos de alimentos nutracêuticos temos uma pasta desenvolvida no Japão pela Otsuka que possui alto valor protéico e deve ser consumida antes, durante e após os exercícios. O uso de probióticos e/ou prebióticos na prevenção de infecções pode diminuir a necessidade do uso de antibióticos em populações com alto risco de infecções como pacientes hospitalizados. O produto probiótico mais conhecido no Japão é o yakult, que contém a bactéria *Lactobacillus casei*, de importante função na prevenção de infecções intestinais. A mais conhecida bebida funcional dos Estados Unidos é um suco de laranja fortificado com cálcio lançado em 1995. A grande vantagem do uso deste suco produzido pela Procter & Gamble é o fato de possuir cálcio de fácil absorção pelo organismo (35% a mais do que o cálcio do leite), auxiliando na prevenção da osteoporose (HASLER, 1998; BRASSART & SCHIFFRIN, 1997).

A companhia americana de sopa Campbell produziu um alimento e lançou um programa terapêutico com a Associação Americana do Coração e a Associação Americana do Diabetes. Após cinco anos de experimentos em oito clínicas universitárias envolvendo mais de quinhentos pacientes observou-se uma redução de açúcar no sangue de 62%, um decréscimo de 73% de colesterol no sangue e uma redução de pressão sangüínea em 75% (HASLLER, 1998).

PICKERING et alii (1998), observaram que a ingestão de leite fortificado com nucleotídios diminui substancialmente a ocorrência de diarréia em recém-

nascidos, resultado bastante consistente, uma vez que estudos prévios demonstraram que o consumo de leite humano (rico em nucleotídeos) previne a diarreia.

NUÑEZ et alli, (1990), observaram os efeitos dos nucleotídeos (AMP, GMP, CMP, UMP e IMP) na dieta, no que diz respeito ao reparo do intestino de ratos submetidos a uma diarreia crônica e concluíram que estes nucleotídeos têm um papel importante na recuperação do trato gastro-intestinal. GRIMBLE (1996), verificou que a ocorrência de diarreia crônica em crianças de baixa renda do Chile foi reduzido de 68% para 52% através do uso de leite com suplementação em nucleotídeos.

Os nucleotídeos e nucleosídeos extraídos por hidrólise de RNA de levedura podem ser utilizados também com propósitos terapêuticos, sendo que a purina e análogos têm efeito antibiótico eficaz no tratamento de câncer por quimioterapia (CRUEGER & CRUEGER, 1984). Outro efeito importante dos nucleotídeos que podem ser extraídos da levedura é demonstrado no uso dos mesmos como fator de crescimento do neonato (GYORGY, 1971). McMILLAN et alli (1977), sugeriram que a existência de nucleotídeos no leite humano pode contribuir para uma maior absorção do ferro do leite.

De acordo com HÁLASZ & LÁSZTITY (1991), a glicana da levedura pode ser utilizada como fibra dietética. Existe grande interesse atualmente no uso da fibra alimentar devido ao efeito benéfico da fibra solúvel como agente hipocolesterolêmico.

MARQUES et alli (1998), ao citar Robbins & Selley (1978), afirma que é interessante utilizar a glicana da levedura como agente emulsificante por ser de

origem biológica e por permitir uma redução no teor de gorduras de certos tipos de alimentos dietéticos como sorvetes.

PEPPLER (1970), afirma que a levedura pode ser oferecida em forma de pó, cápsulas e tabletes como complemento nutricional, sendo uma forma de se fornecer vitaminas do complexo B e proteínas, podendo ser utilizada, até mesmo em hospitais, como complemento alimentar.

De acordo com Burmeister & Rainsford, em 1991, citados por BELEM et alii (1997), a suplementação alimentar utilizando purinas e pirimidinas extraídas de RNA proveniente de extrato de levedura de cerveja promove proteção contra infecção bacteriana e melhora as funções imunológicas

BERRIO et alii (1992), observaram que o extrato de levedura de cerveja pode ser indicado como potencializador da atividade da insulina, uma vez que ocorre um aumento na oxidação da glicose a cada nível de insulina testado com o auxílio do extrato.

Em estudo realizado por PACHECO et alii (1999), foram realizados testes de capacidade de ligação de íons cálcio com isolado protéico de levedura de cerveja após tratamento com trimetafosfato de sódio, de forma que se observou grande número de sítios de ligações para interagirem com os íons obtendo um produto final que, além de possuir boas características nutritivas, poderia contribuir na absorção de íons cálcio da dieta.

### 1.2.6.Referências bibliográficas

- ALBRECHT, J.J.; DEINDOERFER, F.H. Autolysed yeast extracts make flavorful. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.104-121, 1966.
- ALVAREZ, R.; ENRIQUEZ, A. Nucleic acid reduction in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, n.29, v.8/3, p.208-210, 1988.
- BABAYAN, T.; BEZRUKOV, M.G.; LOTOV, V.K.; BELIKOV, V.M.; BELAVTSEVA, E.M.; TITOVA, E.F. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morfological effects, rheological effects and dynamics of acumulation of extracellular hydrolysis products. **Current Microbiology**, New York, v.5, p.163-168, 1981.
- BATT, C.A.; SINSKEY, A.J. Use of biotechnology in the production of single-cell protein. **Food Technology**, Chicago, v.38, n.2, p.108-111, 1984.
- BEHELOVÁ, B.; BLAHOVÁ, M.; SILLINGER, V.; MACHEK, F. Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. **Acta Biotechnol.**, Ogy, v.11, n.6, p.547-552, 1991.
- BELEM, M.A.F.; GIBBS, B.F.; LEE, B.H. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.851-857, 1997.

- BENASSI, V.T.; CAMARGO, C.R.O.; GIACCO, C.F. Caracterização química e redução do conteúdo de ácidos nucléicos das células de levedura (*Saccharomyces spp.*) provenientes da produção de álcool de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.10, n.2, p.231-248, 1990.
- BERRIO, L.F.; POLANSKY, M.M.; ANDERSON, R.A. Insulin activity: stimulatory effects of cinnamon and brewer's yeast as influenced by albumin. **Hormone Research**, Basel, v.37, n.6, p.225-229, 1992.
- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Production of food and fooder yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v.12, n.1/2, p.65-86, 1992.
- BRASSART D.; SCHIFFRIN, E.J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, Lausanne, p.321-326, v.8, 1997.
- CARÍAS, D.; MILLÁN, N. Brewery waste as a substitute for soy protein in soy-brewer's yeast mixtures to feed broiler chickens. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.46, n.1, p.67-70, 1996.
- CARVER, J.D.; COX, W.L.; BARNES, L. A. Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n.1, p.18-22, 1990.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica – propiedades funcionales – valor nutricional – modificaciones químicas**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1989. 346p.

- CHOU , D.H.; MORR, C.V. Protein-water interactions and functional properties. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.56, n.1, p.53a – 62a, 1979.
- COZZOLINO, S.M.F.; ZUCAS, S.M. Valor nutricional da biomassa protéica obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* em melação de cana da açúcar. Ensaio preliminar. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.20, n.2, p.191-200, 1984.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology. A textbook of industrial microbiology**. 2. ed., Sunderland: Sinavier, 1989. 357p.
- De FELICE, S.L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R & D. **Trends in Food Science & Technology**, Cranford, v.6, p.59-63, 1995.
- 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 protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.
- De KANTEREWICZ, R.J.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. A simple method for determining oil absorption capacity of proteins and the kinetics of oil uptake. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.66, n.6, p. 809-812, 1989.
- DZIEZAK, J. A. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.104-121, 1987b.

- FARFÁN, J.A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994. 134p.
- GERALD, R.P.D.; HENRY, J.P.P.D. **Yeast technology**. Westport: AVI, 1973. 378p.
- GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v.58, n.10, p.50-60, 1994.
- GRIMBLE, G.K. Guest editorial – Why are dietary nucleotides essential nutrients?. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.76, n.4, p.475-478, 1996.
- GYORGY, P. Biochemical aspects of human milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.24, n.8, p.970-975, 1971.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; MÁTRAI, B. Yeast as a human protein source. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.17, n.4, p.374-375, 1988.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312p.
- HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 265p.
- 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.

- HASLER, C.M. A new look at an ancient concept. **Chemistry & Industry**, New York, v.2, p.84-89, 1998
- HASSAN, I.M.; ALLAM, M.H.; ABD EL RAHMAN, N.R. **Functional properties of yeast protein isolates from different yeasts**. Cairo: Faculty of Agriculture/ Ain-Shams-University, 1981. 21p. (Research. Bulletin, n.1647).
- HETTIARACHCHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. **Protein Functionality in Food Systems**. Chicago: Institute of Food Technologists, 1994. 519p.
- HUANG, Y.T.; KINSELLA, J.E. Functional properties of phosphorylate yeast protein: solubility, water holding capacity and viscosity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.34, n.4, p.670, 1986.
- HUMPHRIES, C. Towards leaf protein as a human food. In: HUDSON, B.J.F. (Ed). **Developments in food protein I**. Barking: Applied Science, 1982. p.263-268.
- KNNOR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. An enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p. 1362-1365, 1979.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of protein in foods: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.4, n.3, p.219-81, 1976.
- KOLLAR, R.; STURD, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, p. 225-237, 1992.

- LEE, B.H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: V.C.H. Publishers, 1996. 431p.
- LINDBLOM, M.; MOGREN, H. Enzymatic RNA reduction in disintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.16, p.1123-1133, 1974.
- MARIATH, J.G.R.; ZUCAS, S.M. Valor nutricional da proteína isolada do resíduo de cerveja. **Revista da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação – ABIA**, São Paulo, n.65, p.24-36, 1983.
- MARQUES, A.; OETTERER, M.; HORII, J. Caracterização da levedura e seu uso na alimentação. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32, n.1, p.89-98, 1998.
- McMILLAN, J.A., OSKI, F.A., LOURIE, G., TOMARELLI, R.M., LANDOW, S.A. Iron absorption from human milk, simulated human milk and proprietary formulas. **Pediatrics**, Springfield, v.60, n.6, p.896-900, 1977.
- MOHAMED, S.; LAJIS, S.M.M.; HAMID, N.A. Effects of protein from different sources on the characteristics of sponge cakes, rice cakes (apam), doughnuts and frying batters. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.68, n.3, p.271-277, 1995.

- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.
- MOURA, E.C.V. Fontes protéicas não convencionais: perspectivas do seu emprego na alimentação. In: NOBREGA, F.J. **Desnutrição intrauterina e pós-natal**. 2.ed. São Paulo: Panamed Editorial, 1986, p.43-63.
- NAUMENKO, N.I.; GORDIENKO, S.V. Study of autolysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.21, n.6, p.577-580, 1985.
- NEKLYUDOV, A.D.; IVANKIN, A.N.; MOSINA, G.I.; PETRAKOVA, A.N.; GOROSHKO, G.P. Optimum conditions for hydrolysis of protein substrate by yeast proteases from *Saccharomyces Carlsbergensis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.34, n.4, p.358-361, 1998.
- NUÑES, M.C.; AYUDARTE, M.V.; MORALES, D.; SUAREZ, M.D.; GIL, A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with chronic diarrhea. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n.2, p.598-604, 1990.
- OTERO, M.A.; VASALLO, M.C.; VERDECIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, New York, v.67, n.1, p.67-71, 1996.

PACHECO, M.T.B. & SGARBIERI, V.C. Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.2, p.238-243, 1998.

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

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

PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA - UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, 1996, Campinas. **Anais**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996, p.90-98.

PENY, C. Rising prospects for yeast products. **Food Ingredient & Processing International**, Herts, n.10, p.18-21, 1991.

PEPPLER, H.J. Food yeasty. In: ROSE, A.H. and HARRISON, J.S. (Ed). **The yeasts**. London: Academic press. 1970, p.421-462.

- PICKERING, L.K.; GRANOFF, D.M.; ERICKSON, J.R.; MASOR, M.L.;  
CORDLE, C.I.; SCHALLER, J.P. WINSHIP, T.R.; PAULE, C.L.; HILTY, M.D.  
Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing  
nucleotides, **Pediatrics**, Springfield, v. 101, n.2, p.242-249, 1998.
- REED, G. & NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast technology**. 2.ed. New York: Van  
Nostrand Reinhold, 1991. 378p.
- 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.
- SCHACHTEL, A.P. Effects of preparative process 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.
- SCHWENKE, K.D.; SEMIONOV, A., RAAB, B.; SERGEJEV, V.A.;  
BESRUKOV, A. Comparative studies on protein isolates from different yeast  
prepared by isoelectric precipitation and ultrafiltration. **Dienahrung**, Berlin, v.24,  
n.9, p.883-891, 1980.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da  
Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32,  
n.1, p.105-126, 1998.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades,  
degradações, modificações**. Campinas: Livraria Varela, 1996. 517p.

- SOBOLEVA, G.A.; POPOVA, E.A. Fractional composition of proteins of hidrolised nutrient yeast. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.22, n.3, p.305-308, 1986.
- UMA, V.; POLASA, H. Nutritional value of newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* of Palm Wine. **Current Science**, Bangalore, v.59, n.3, p.166-167, 1990.
- VAN IERSEL, M.F.M.; VAN DIEREN, B.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Flavor formation cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzime and Microbial Technology**, New York, v.24, n.7, p.407-411, 1999.
- WILLIS, B.J. Flavors and fragrances as functional ingredients. **Perfumer & Flavorist International**, Wheaton III, v.18, n.4, p.3-10, 1993.
- YOUNG, V.R.; PELLET P.L. Protein evaluation, amino acid scoring and food and drug administration's proposed food labeling regulations. **The Journal of the American Institute of Nutrition**, Bethesda, v.121, p.145-150, 1991.

## CAPÍTULO 2

### PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE LEVEDURA (*Saccharomyces sp.*) EM NÍVEL PILOTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA E DOS DERIVADOS OBTIDOS\*

#### RESUMO

Este capítulo teve como objetivos: melhoria dos processos de produção da levedura íntegra seca (LI), do autolisado de levedura (AT) e do extrato de levedura (Ex), para obtenção de produtos com boas qualidades sensoriais e de um alto rendimento de processo. O processo consistiu basicamente de quatro etapas: limpeza, desamargamento, autólise e fracionamento da levedura de cervejaria. Quantitativamente, os componentes mais importantes foram as proteínas (46-61%), sendo o teor mais baixo do autolisado e o mais alto do extrato; fibra total (2,7-25%), que teve o teor mais baixo no extrato e o mais elevado no autolisado; minerais (6,8-12,5%) com o teor mais baixo no autolisado e mais elevado no extrato. Os perfis de aminoácidos forneceram escores químicos superiores à referência da FAO/WHO, exceto para o autolisado, cujo escore foi de 85% do padrão de referência, com base nos aminoácidos sulfurados totais.

\*Parte deste capítulo foi publicado na revista **Brazilian Journal of Food Technology**. Vide anexo 1.

## 2.1.Introdução

A biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) tem sido produzida no Brasil em três setores industriais importantes: o setor sucro-alcooleiro, com uma produção de aproximadamente 240 mil ton/ano, como subproduto da produção de etanol (FURCO, 1996); o setor cervejeiro, contribuindo com cerca de 3500 ton/ano e o setor de panificação, com uma produção brasileira de 120 mil ton/ano (PEIXOTO, 1996).

As leveduras são muito utilizadas na formulação de produtos alimentícios, sendo que o propósito de uso varia de acordo com o seu processamento. Tem-se, portanto, o uso da levedura em diferentes formas, a saber: levedura ativa, utilizada como catalisador biológico nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool; levedura de panificação, utilizada na fermentação de pães na indústria de panificação; levedura inativa, como fonte de nutrientes em alimentos naturais ou ingredientes nutritivos em alimentação humana e animal; derivados de levedura, usados como ingredientes nutritivos e funcionais (DZIEZAK, 1987a, b; OTERO et alii, 1996; LEE, 1996).

A biomassa de levedura possui um conteúdo de proteínas em torno de 50% com um perfil de aminoácidos compatível com as necessidades humanas, devendo haver somente uma suplementação em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e triptofano (MARIATH & ZUCAS,1983; OTERO, 1996; SARWAR et alii, 1985).

O teor de lipídios varia de 2 a 7%, os glicídeos de 26 a 36% e cinzas de 5 a 10%. São as maiores fontes de vitaminas do complexo B, exceto B12 (MARIATH & ZUCAS,1983).

Além da deficiência em aminoácidos sulfurados a levedura apresenta problemas no que se refere ao teor de ácido ribonucléico (RNA), sendo que, de acordo com SARWAR et alii (1985), 12-16% do nitrogênio total da levedura é procedente do ácido nucleico. Sabendo que a ingestão máxima recomendada de ácido nucleico, para o organismo humano, é da ordem de 2g/dia, é importante avaliar uma forma de se reduzir a sua ingestão (SARWAR et alii, 1985). Além de possuir um elevado teor de ácidos nucleicos as células íntegras da levedura possuem uma digestibilidade baixa devido a sua espessa parede celular, sendo este mais um fator limitante de seu uso (WALSIEN et alii, 1970, SHETTY & KINSELLA, 1982).

A autólise de levedura é considerada um processo irreversível, resultando na morte da célula. Durante o decorrer da autólise a atividade das enzimas respiratórias diminui enquanto que a atividade das hidrolases aumenta. Tem-se, então, uma hidrólise gradual do material citoplasmático e os produtos decompostos são liberados no espaço extracelular (BABAYAN et alii, 1981).

A autólise da levedura pode ser induzida por fatores como temperatura, adição de plasmolizantes, intervenção mecânica e outros que facilitem o rompimento da membrana citoplasmática e ativem as enzimas intracelulares (BABAYAN et alii, 1981). A temperatura auxilia no processo de autólise, desde que se trabalhe com a faixa de melhor atividade das enzimas hidrolíticas intracelulares que irão auxiliar o rompimento da parede celular. Esta temperatura está em torno de 40-55°C (LEE, 1996). Os agentes plasmolizantes (etanol e cloreto de sódio) auxiliam no processo de autólise desde que não alterem a atividade das enzimas intracelulares. O uso de álcool etílico como plasmolizante permite um rendimento de autólise consideravelmente alto, sendo que o maior rendimento obtido foi quando se utilizou a concentração de 5% p/p, em relação ao total de biomassa mais água e 1%

de cloreto de sódio p/p. Além de usar álcool etílico e cloreto de sódio, KOLLAR et alii (1992), utilizaram como ativador de autólise uma suspensão de material pré-autolisado na concentração de 10% p/p, o que também aumentou o rendimento de autólise, visto que as enzimas intracelulares do pré-autolisado já estavam liberadas e auxiliaram no rompimento de novas células.

O objetivo das pesquisas descritas neste capítulo foi desenvolver uma metodologia em nível piloto para os pré-tratamentos (limpeza e desamargamento), a autólise, o fracionamento e a caracterização química da biomassa (células íntegras de levedura), do autolisado total e do extrato de levedura.

## 2.2. Material e métodos

**Matéria-prima.** A levedura (*Saccharomyces* sp.) utilizada na pesquisa foi proveniente de cervejarias e gentilmente cedida pela empresa Prodesa, Produtos Especiais para Alimentos Ltda., com sede em Campinas, S.P. O material foi recebido em suspensão (~30% de células). A levedura residual do processo de produção de cerveja apresenta gosto acentuadamente amargo devido a adsorção superficial de componentes amargos (taninos, resinas, etc), provenientes do lúpulo, usado na fabricação de cerveja.

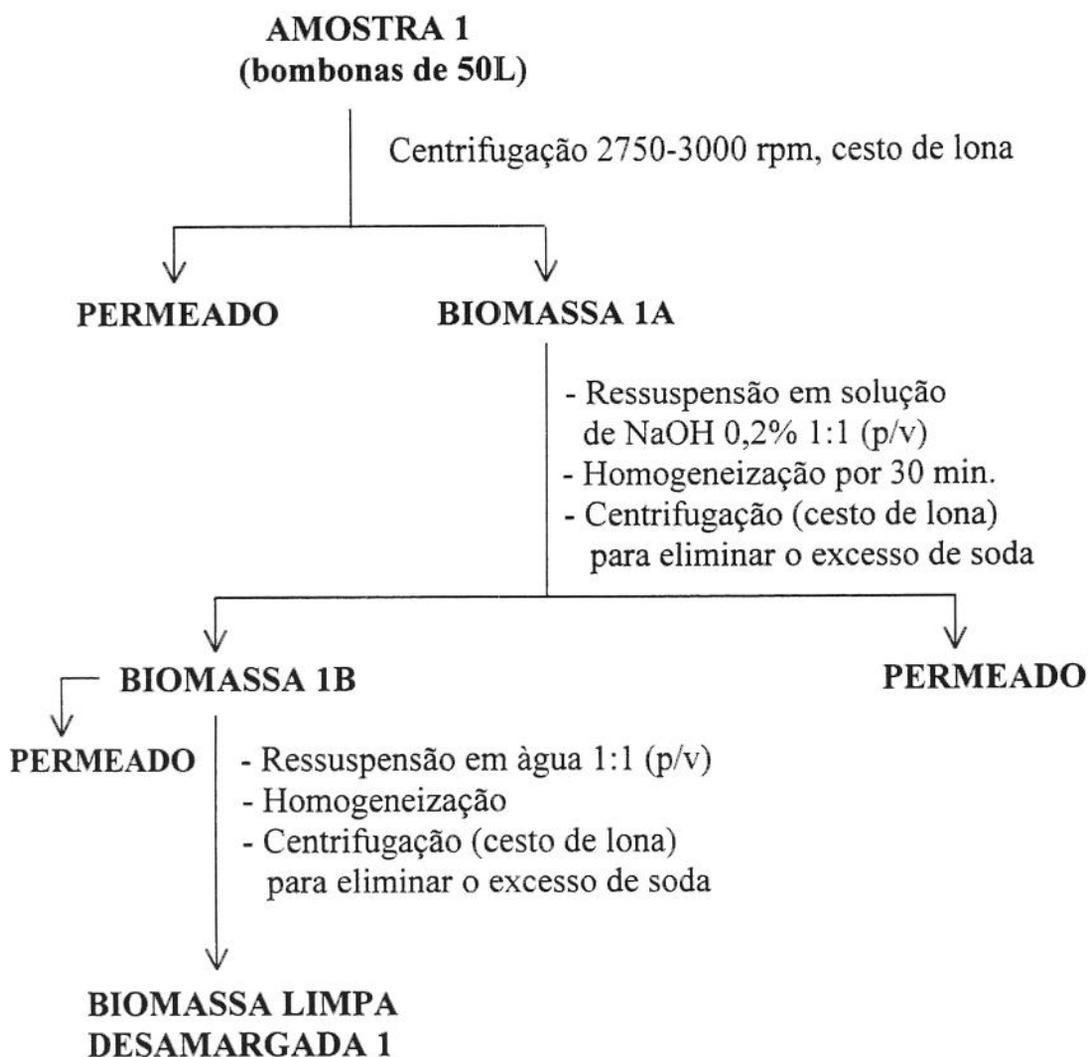
**Recuperação e desamargamento da biomassa.** A suspensão de células foi submetida inicialmente a uma centrifugação (centrífuga Gedr Heind mod. 2250), para recuperação de células. A massa de células (biomassa) foi, em seguida, submetida a uma série de lavagens e centrifugação para, finalmente, se obter a biomassa limpa e desamargada (Figura 1 e Tabela 1). Devido a elevada perda do material neste processo, procurou-se aprimorá-lo (Figura 2 e Tabela 2)

**Tabela 1.** Rendimento do primeiro processo de lavagem de levedura proveniente de cervejaria.

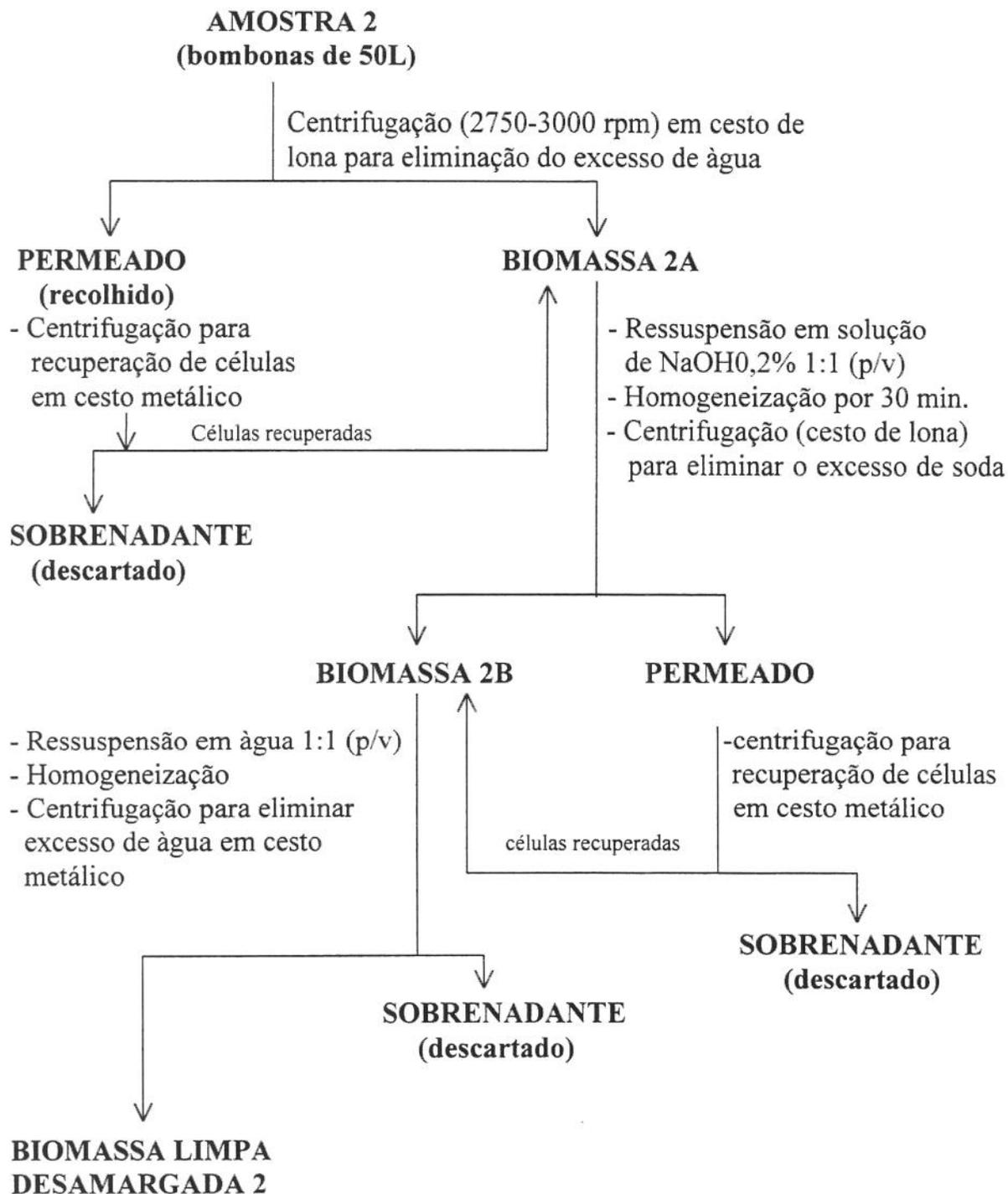
<b>Material</b>	<b>Quantidade (Kg)</b>	<b>Sólidos (%)</b>	<b>Massa Sólida (Kg)</b>	<b>Proteína (N x 5,8) (%)</b>	<b>Proteína (Kg)</b>
Amostra 1	159,25	10,67	16,99	48,54	8,25
Biomassa 1A	71,75	21,99	15,78	49,63	7,83
Biomassa Limpa/desamargada 1	30,70	21,86	6,71	49,61	3,33

Rendimento (em sólidos)  $\Rightarrow$  39,50%

Rendimento (em proteínas)  $\Rightarrow$  40,37%



**Figura 1.** Primeiro processo de limpeza (lavagens) e desamargamento da biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente de cervejarias



**Figura 2.** Segundo processo de limpeza (lavagens) e desamargamento da biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente de cervejarias

**Tabela 2.** Rendimento do segundo processo de lavagem de levedura proveniente de cervejaria.

<b>Material</b>	<b>Quantidade (Kg)</b>	<b>Sólidos (%)</b>	<b>Massa Sólida (Kg)</b>	<b>Proteína (N x 5,8) (%)</b>	<b>Proteína (Kg)</b>
Amostra 2	202,50	10,46	21,18	44,03	9,33
Biomassa 2A	76,50	23,36	17,87	45,99	8,22
Biomassa Limpa/desamargada 2	51,50	23,28	11,99	46,77	5,61

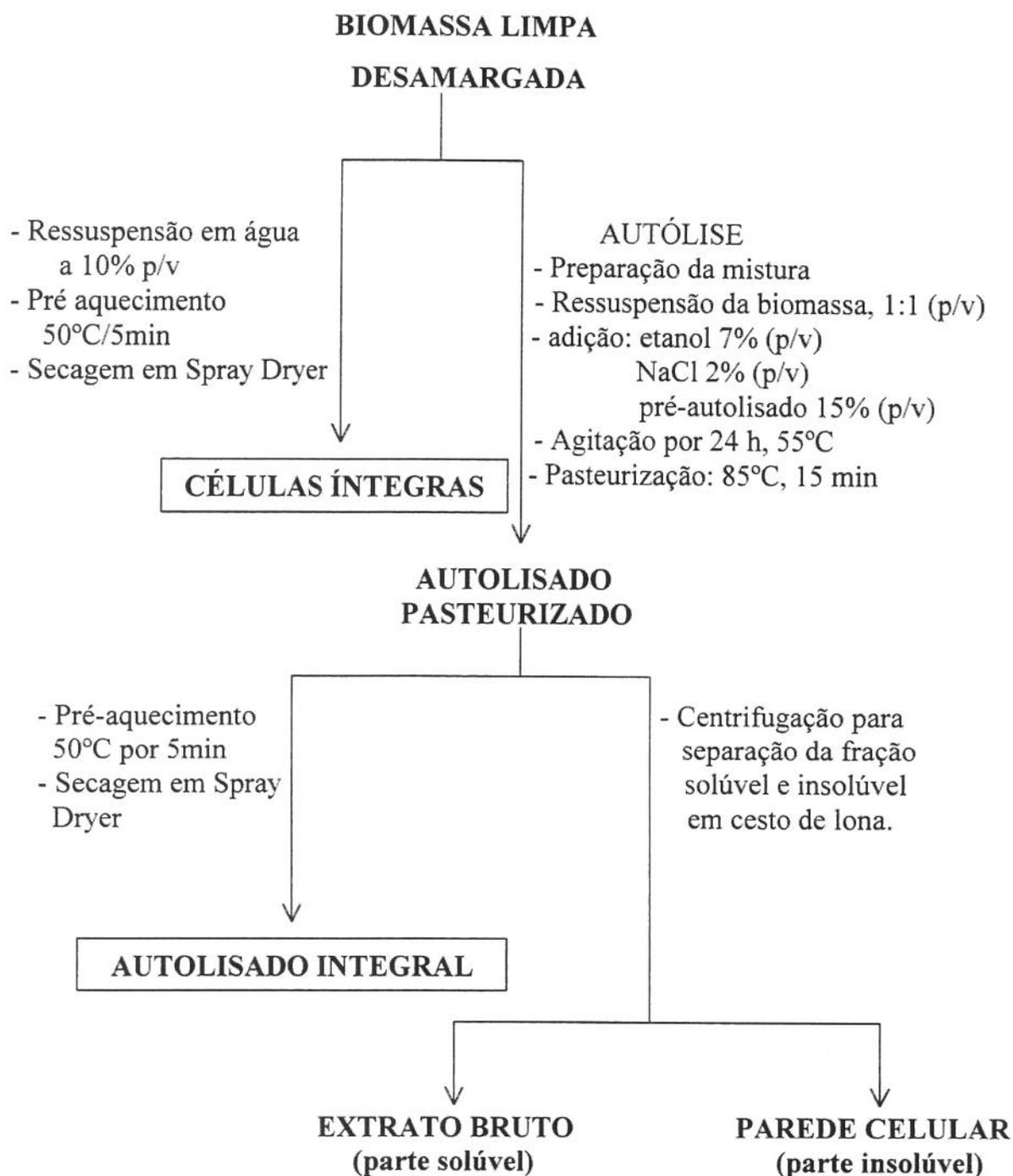
Rendimento (em sólidos)  $\Rightarrow$  56,60%

Rendimento (em proteínas)  $\Rightarrow$  60,12%

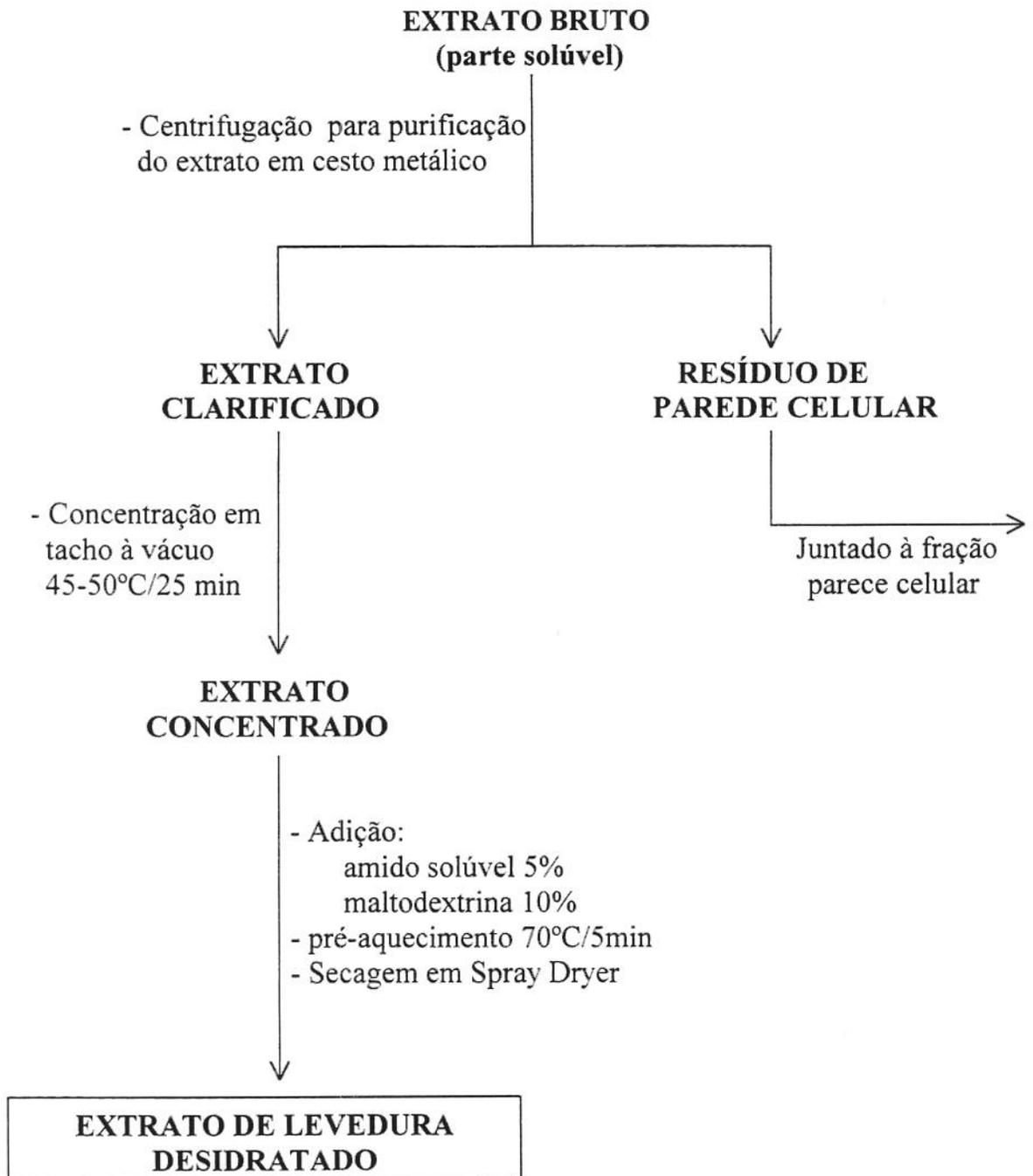
**Autólise e fracionamento da biomassa limpa e desamargada.** A autólise da biomassa desamargada foi realizada em fermentador (Newbrunswick – IF 250) com capacidade de 250 L, nas condições especificadas no fluxograma da Figura 3. Na Figura 3 são descritos também os processos para obtenção de células de levedura íntegras desidratadas e, a partir do autolisado pasteurizado, a obtenção de um autolisado integral desidratado em “spray dryer” (Niro Atomizer – CB3 104 D), de um extrato bruto e de uma fração insolúvel, contendo a parede celular

**Clarificação e desidratação do extrato de levedura.** O extrato bruto, como obtido no fluxograma da Figura 3, ainda contém certa quantidade de material insolúvel, em suspensão, que lhe confere turbidez e gosto amargo. A Figura 4 mostra as operações de clarificação, concentração e desidratação do extrato clarificado em “spray dryer”. Antes da secagem, fez-se a adição, ao extrato, de amido solúvel (5%) e de maltodextrina (10%), com base nos sólidos totais. Essa formulação é feita para

melhorar as características de secagem e também as propriedades sensoriais do extrato desidratado.



**Figura 3.** Fluxograma para obtenção de células de levedura íntegras desidratadas, autolisado integral e extrato bruto desidratados.



**Figura 4.** Fluxograma seguido na purificação parcial (clarificação) e desidratação (Spray Dryer) do extrato de levedura.

**Caracterização química das células de levedura íntegras, do autolisado e do extrato de levedura.** As amostras de levedura íntegra (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex) foram submetidas à caracterização química, como segue:

**Composição centesimal.** Os teores de proteína (N x 5,8), de umidade e de cinzas foram determinados de acordo com os procedimentos descritos pela AOAC (1990); lipídios totais, pelo método de BLIGH & DYER (1959); fibra alimentar solúvel e insolúvel, segundo ASP et alii (1983); ácido nucleico (RNA), de acordo com HERBERT et alii (1971).

**Determinação de aminoácidos.** Feita no hidrolisado ácido (HCl 6N, 110°C, 22h) por cromatografia líquida de alta eficiência (Dionex Dx 300), com separação em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina. A quantificação dos aminoácidos foi realizada por padronização externa. Foram utilizados padrões sigma.

**Composição mineral.** Foi determinada por espectrometria de emissão de plasma (espectrômetro ICP - 2000 - Baird, versão simultânea). Após mineralização da amostra, por incineração (450° C). Os minerais foram solubilizados em solução de ácido nítrico a 5% e diluídos com água desionizada. Os procedimentos para o preparo das amostras e quantificação dos minerais foram segundo ANGELUCCI & MANTOVANI (1986) e IMO INDUSTRIES, INC. (1990).

**Determinação de ácidos graxos.** A determinação de ácidos graxos, nos lipídios totais extraídos das amostras foi feita por cromatografia líquido-gasosa, após interesterificação ácida com metanol, de acordo com os procedimentos da AOCS (1990).

## 2.3. Resultados e discussão

Ao se avaliar os dois processos utilizados para o desamargamento (Figuras 1 e 2) e os dados de rendimento (Tabelas 1 e 2), observou-se um aumento de 20% no rendimento para obtenção de proteína em base seca no fluxograma da Figura 2. Com isto percebeu-se a importância de adicionar as etapas de centrifugação em cesto metálico para melhorar aproveitamento das células, uma vez que havia uma perda considerável quando se utilizava apenas o cesto de lona.

A composição centesimal da biomassa de levedura íntegra (LI), do autolisado total (AT) e do extrato de levedura (Ex) é mostrada na Tabela 3.

As células íntegras e o autolisado total apresentaram composição bastante próxima, com um teor de proteínas na faixa de 48-46%, ácidos nucleicos (RNA) de 6-8%, lipídios totais ao redor de 3,5%, cinzas entre 7-8%, fibra alimentar total de 24-25%, com uma predominância muito grande de componentes solúveis. O extrato foi o que apresentou teor mais elevado de proteína (~62%), concentração um pouco mais baixa de RNA (6,9%) e de lipídios (0,62%). A concentração de minerais foi mais elevada (12,3%) no extrato do que nas células íntegras e/ou autolisado total. O teor de fibra no extrato foi bastante baixo (2,7%) não havendo presença de fibra insolúvel. Não há uma explicação definitiva para o fato do RNA ter sido mais elevado no autolisado total do que nas células íntegras. O que pode ter influenciado é o aumento da solubilidade do RNA com a autólise, uma vez que a extração de RNA para análise foi feita por extratos, existindo uma variabilidade natural de uma reação colorimétrica, já que o RNA extraído se apresenta bastante impuro.

De um modo geral, a composição apresentada na Tabela 3 para células íntegras de levedura, autolisado total e extrato de levedura, é semelhante ao

encontrado na literatura (HALÁSZ & LÁSTITY, 1991; CABALLERO-CÓRDOBA et alii.,1997; PACHECO et alii., 1997).

**Tabela 3.** Composição centesimal aproximada da biomassa de células íntegras de levedura, do autolisado total, e do extrato de levedura, todos em base seca.

Componente (% b.s.)	Células Íntegras (LI)	Autolisado total (AT)	Extrato (Ex)
Proteína (N x 5,8)*	48,41 ± 0,56 <sup>b</sup>	46,44 ± 0,14 <sup>c</sup>	61,88 ± 0,59 <sup>a</sup>
Lipídios totais*	3,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,02 <sup>c</sup>
Cinzas*	7,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,06 ± 0,02 <sup>c</sup>	12,31 ± 0,07 <sup>a</sup>
RNA**	5,65	7,93	6,87
Fibra total	24,40	25,03	2,70
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00
Não determinado***	10,29	10,23	15,62

\* Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão, sendo a avaliação estatística feita através do teste de Tukey; \*\* Resultados são média de 2 determinações analíticas; Não determinado = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + RNA + fibra total).

Na Tabela 4 observa-se a composição em aminoácidos de levedura íntegra (LI), do autolisado total (AT) e do extrato de levedura (Ex). Os aminoácidos glutâmico, aspártico, leucina, alanina e lisina foram os que se apresentaram em concentrações mais elevadas. A elevada concentração de ácido glutâmico é importante, no autolisado e no extrato, porque o glutamato, juntamente com os

nucleotídeos, devem ser os principais responsáveis pelo sabor à carne desses derivados, principalmente do extrato. O teor elevado de lisina e a concentração adequada de triptofano são importantes porque tornam os produtos de levedura ideais para misturas com cereais pois complementam os aminoácidos essenciais, que são, normalmente, deficientes em grãos de cereais.

A proteína de levedura é, comumente, citada na literatura como deficiente em aminoácidos sulfurados, metionina mais cistina (MARIATH, 1981; POÓ & MILLÁN, 1990). O perfil aminoacídico da Tabela 4 não evidencia deficiência de aminoácidos sulfurados totais em todos os materiais estudados. Embora a levedura íntegra e o autolisado total tenham apresentado um teor baixo de cisteína, a soma, metionina mais cisteína, supera o valor de referência da FAO/WHO (1989), que é de 2,5, exceto para o autolisado, que foi de 2,11. Com base no perfil de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1989) resultaram os seguintes escores químicos, em %: 133,6; 84,4 e 102,4 para LI, AT e Ex, respectivamente, relativos aos aminoácidos sulfurados totais. Pelo escore químico, apenas o autolisado total (AT) apresentou-se ligeiramente limitante em aminoácidos sulfurados.

Os resultados da análise de macroelementos e microelementos minerais são mostrados na Tabela 5. Pode-se observar que o extrato apresentou teores adequados de zinco e um excesso de fósforo. A levedura íntegra e o autolisado apresentaram valores desejáveis de ferro, embora o fósforo se apresente em excesso na levedura íntegra. Observa-se que 100g da amostra ultrapassam as recomendações diárias apenas para o fósforo na levedura íntegra e no extrato. Na Tabela 5, faz-se ainda uma comparação dos valores encontrados na análise dos derivados com a ingestão diária (em miligramas) para os vários elementos segundo NAS (National Academy of Science, 1989). A comparação dos valores encontrados com os índices recomendados mostra que, com exceção de alguns elementos, os derivados de

levedura não devem ser considerados fontes muito ricas de minerais, mesmo porque a ingestão desses produtos deve ser limitada a 30g/dia, em virtude do elevado teor de ácidos nucleicos. A NAS não traz recomendação de cobalto, cuja necessidade é muito baixa, uma vez que a única função nutricional conhecida para este elemento é como parte estrutural da vitamina B<sub>12</sub>, cujo requerimento bioquímico-nutricional é muito pequeno.

A levedura é citada na literatura como rica fonte de selênio. Segundo LEVANDER (1989), o consumo de levedura de cerveja ajuda a prevenir estados carenciais de selênio, caracterizado por perda de cabelos, retardo no crescimento, deficiências reprodutivas, cardiomiopatias, necrose e degeneração do fígado e do pâncreas.

SARWAR et alii (1985), ao produzirem autolisado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de cana de açúcar, observaram que ocorreu uma redução considerável nos níveis de magnésio e manganês, o que consideraram ser em decorrência do processo de autólise.

Na Tabela 6 reporta-se a concentração de ácidos graxos nas células de levedura íntegra (LI), no autolisado total (AT) e no extrato de levedura (Ex). Os ácidos graxos predominantes nas três amostras foram: palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2), sendo o palmítico e o palmitoléico os mais abundantes nas células íntegras (LI) e no autolisado total (AT). No extrato (Ex) predominaram os ácidos palmítico e oléico. Somados, os ácidos graxos saturados variaram entre 40 e 51,8%, sendo o valor mais baixo encontrado para a LI e o Ex e o mais elevado para o AT. Predominaram os

ácidos graxos insaturados ( $\cong 59\%$ ) nas amostras de LI e Ex, sendo o valor mais baixo (48%) para o autolisado total.

**Tabela 4.** Composição em aminoácidos das células de levedura íntegra, do autolisado e do Extrato.

Aminoácidos (mg/100mg proteína)	LI	AT	Ex
Ácido aspártico	11,98	11,11	11,81
Treonina	6,16	5,84	5,19
Serina	6,13	6,44	5,57
Ácido glutâmico	13,15	12,53	13,40
Prolina	4,45	4,72	4,62
Glicina	4,93	4,99	5,14
Alanina	7,07	7,59	8,97
½ Cistina	0,84	0,90	1,30
Valina	6,20	5,87	6,76
Metionina	2,50	1,21	1,26
Isoleucina	5,64	4,87	5,69
Leucina	8,84	7,80	8,07
Tirosina	4,68	3,57	2,17
Fenilalanina	5,30	4,96	4,74
Lisina	7,13	9,54	8,58
Histidina	2,06	3,15	3,01
Arginina	4,11	2,40	1,01
Triptofano	1,45	1,55	1,31

**Tabela 5.** Composição mineral da levedura de cervejaria (*Saccharomyces* sp.): LI, levedura íntegra; AT, autolisado total; Ex, extrato de levedura.

Elementos	Resultados (mg/100 g)*			Recomendação diária (Humanos)**
	LI	AT	Ex	
Sódio	338,8 ± 2,4	590 ± 11	1921 ± 56	2000
Cálcio	510,8 ± 6,2	427,3 ± 22,6	152,1 ± 6,1	1200
Magnésio	203,2 ± 1,8	159,7 ± 3,1	310,3 ± 13,7	350
Fósforo	1620 ± 20	1158 ± 17	2175 ± 49	1200
Potássio	1742 ± 14	1459 ± 41	1655 ± 73	2500
Ferro	13,4 ± 0,4	10,2 ± 0,1	3,7 ± 0,3	10-15
Manganês	0,75 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,89 ± 0,07	2-5
Zinco	4,4 ± 0,06	4,24 ± 0,33	10,23 ± 0,68	10-15
Cobre	0,70 ± 0,01	0,66 ± 0,05	0,98 ± 0,09	2-3
Cobalto	0,023 ± 0,05	NQ***	NQ***	
Cromo	NQ***	NQ***	NQ***	0,2

\* Resultados são média de 3 determinações ± desvios-padrão; \*\* Requerimento diário, conforme NAS (1989), para adultos jovens; \*\*\*Não quantificado – resultados abaixo do limite de quantificação do método (Cr < 0,010mg/100g; Co < 0,010 mg/100g)

**Tabela 6.** Composição de ácidos graxos dos lipídios totais nas células íntegras de levedura (LI), no autolisado total (AT) e no extrato de levedura (Ex).

Ácido Graxo	Concentração (% do total de ácidos graxos)		
	LI	AT	Ex
Caprílico (C8:0)	0,4	0,3	N.D.*
Capróico (C10:0)	3,8	2,3	0,6
Hundecanóico (C11:0)	0,4	0,1	N.D.*
Láurico (C12:0)	1,0	0,8	0,5
Mirístico (C14:0)	0,6	0,5	1,4
Pentadecanóico (C15:0)	0,5	0,5	0,5
Palmitico (C16:0)	26,2	33,5	27,6
Palmitoléico (C16:1, w7)	40,5	24,5	8,2
Estearico (C18:0)	7,4	13,3	10,0
Oléico (C18:1, w9)	12,2	9,5	35,1
Linoléico (C18:2, w6)	5,9	12,6	13,2
Linolênico (C18:3, w3)	0,6	1,4	1,3
Araquídico (C20:0)	N.D.*	0,3	0,4
Saturados	40,3	51,8	41,0
Insaturados	59,2	48,0	58,8
N.D.*	0,5	0,4	1,2

\*Não detectado

Ao avaliarmos o perfil de ácidos graxos percebemos um equilíbrio no conteúdo de ácidos graxos saturados e insaturados para os três produtos de levedura, indicando que o processamento da levedura íntegra não afetou o produto quanto à composição em ácidos graxos. É interessante observar a presença de vários ácidos

graxos insaturados de cadeias ímpares (C11:0, C15:0 e C19:0), característica encontrada apenas em microorganismos, particularmente na parede celular.

KOLLAR et alii (1992), seguindo uma metodologia de fracionamento semelhante à adotada neste trabalho, obtiveram, a partir de 1000 Kg de *Saccharomyces cerevisiae* com 28% de sólidos totais, 156 Kg de extrato seco, 10,3 Kg de  $\beta$ -glicana, 0,8 Kg de fosfolipídios (70% de pureza) e 0,7 Kg de ergosterol (97% de pureza)

Ao compararmos o teor dos ácidos graxos palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico e linoléico de nosso trabalho com o teor dos retirados da biomassa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* por KOLLAR et alii (1992), percebemos valores muito próximos para os três produtos obtidos. Segundo estes pesquisadores os lipídios obtidos de levedura apresentam propriedades industriais interessantes, particularmente como emulsificantes biodegradáveis.

## 2.4. Conclusões

Foi possível desenvolver metodologias para limpeza, desamargamento e produção de derivados de levedura (autolisado total e extrato ) em nível piloto. O rendimento do processo foi, em média, de 55-60 Kg de extrato bruto a partir de 100Kg de autolisado, em base de sólidos totais.

A análise centesimal evidenciou que, tanto as células íntegras de levedura como os derivados, autolisado total e extrato, são excelentes fontes de proteína, minerais e fibra dietética (exceto o extrato).

A composição em aminoácidos mostrou-se muito adequada, quando comparada ao padrão teórico da FAO/WHO, exceto pelo autolisado total, que se mostrou ligeiramente deficiente (limitante) em aminoácidos sulfurados totais.

A determinação de elementos minerais revelou que o fósforo se apresenta em excesso, ultrapassando as recomendações diárias para ingestão de 100g de amostra, no extrato e na levedura íntegra. A levedura íntegra apresenta valores desejáveis apenas para o ferro e o extrato apresenta somente para o Zinco.

O perfil de ácidos graxos revelou equilíbrio considerado adequado ao organismo humano, bem como uma estabilidade dos ácidos graxos insaturados no decorrer do processo de produção do autolisado e extrato. Dentre os ácidos graxos insaturados houve uma predominância de monoinsaturados.

## 2.5.Referências Bibliográficas

- AOAC –Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**, 15<sup>th</sup> edition, Arlington, 1990
- AOCS –American Oil Chemists Society, **Official Methods and Recommended Practices**, 4<sup>th</sup> edition, Champaign, 1990
- ANGELUCCI, E.; MANTOVANI, D.M.B. **Minerais em Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1986, 131p.
- ASP, G.N.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H.; SILJESTRÖM, M. A rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.31,n. 3, p.476-482, 1983.
- BABAYAN, T.L.; BEZRUKOV M.G.; LATOV V.K.; BELIKOV V.M.; BELAVTSEVA E.M.;TITOVA E.F. Induced Autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. **Current Microbiology**; New York, v.5; p.163-168, 1981.
- 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.

- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.102-106, 1997.
- DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.103-121, 1987a.
- DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivatives: applications. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.122-125, 1987b.
- FAO/WHO. Protein quality evaluation report of the joint FAO/WHO expert consultation. Food and Nutrition Paper n° 51. **Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization**, Rome, Italy, 1989.
- FURCO A.M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. **Anais do "Workshop" sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**, pp. 52-58, 1986. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, S.P.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. **CRC Press**, Boca Raton, 1991, 312p.
- HERBERT, D.; PHIPPS, P. J.; STRANGER, R.E. Chemical analysis of microbial cell. In: Noris, J.R. & Ribbors, P.W. (eds), **Methods of Microbiology**, London, Academic, Press, 1971, V5B, 695p.

- IMO INDUSTRIES INC. Baird Analytical Instruments Division. ICP spectrometer user's guide, Bedford, Massachusetts, 1990.
- KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, p.225-237, 1992.
- LEE, H.O. **Fundamentals of Food Biotechnology**. Ed V.C.H. Publishers Inc. New York, 1996, 431p.
- LEVANDER, A.O. Selenium, Chromium and manganese. In: Shils, M.D. & Vernon, R.Y. (eds), **Modern Nutrition in Health and Disease**, 7<sup>th</sup> ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1989, pp.263-267.
- MARIATH, J.G.R.; ZUCAS, S.M. Valor nutricional da proteína isolada do resíduo de cerveja. **Revista da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos – ABIA**, São Paulo, v.65, p.24-36, Mar/Abr, 1983.
- MARIATH, J.G.R. **Comportamento biológico de proteína isolada do resíduo de cerveja**. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1981, Universidade de São Paulo, S.P., 166p.
- NAS (National Academy of Science) – **Recommended Dietary Allowances**, 10<sup>th</sup> edition, National Academy Press, Washington, D.C., 1989.

- OTERO M.A.; VASOLLO, M.C.; VERDECIA O. Víctor Fernández & Dionísio Bitencourt. A Process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemical, Technology and Biotechnology**, New York, v.67, p.67-71, 1996.
- PACHECO, M.T.B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.43, n.6, p.601-612, 1997.
- PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. **Anais do "workshop" sobre produção de biomassa de levedura – utilização em alimentação humana e animal**, pp. 90-98, 1996, Campinas, S.P.
- POÓ, M.E.; MILLÁN, N. Efecto de la concentración dietaria de la levadura (*Saccharomyces carlsbergensis*) recuperada de la cerveza, em pollos machos Warren. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.40, p.95-106, 1990.
- SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU, R.; HOPPNER, K. Nucleic acid, and fiber and nutrient. Composition of inactive dried food yeast. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n2, p.353-357, 1985.
- SHETTY, J.K. & KINSELLA, J.E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of isolated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.30, n.6, p.1166-1177, 1982.

WALSIEEN, 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.293-298, 1970.

## CAPÍTULO 3

### DETERMINAÇÃO DO VALOR PROTÉICO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS, AUTOLISADO TOTAL E EXTRATO DE LEVEDURA (*Saccharomyces* sp.) ORIGINÁRIA DE CERVEJARIA \*

#### RESUMO

Biomassa de células de levedura, limpas e desamargadas, bem como seus derivados, autolisado total e extrato de levedura, após desidratação em "spray dryer", foram submetidos a ensaio biológico com ratos da linhagem Wistar, em crescimento, para determinação do valor nutritivo da proteína. Células íntegras, autolisado total e extrato de levedura não diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) quanto aos índices PER e NPR, mas foram significativamente inferiores aos da caseína. A capacidade de produzir crescimento foi maior para a caseína, seguida das células íntegras, do extrato e do autolisado total, em ordem decrescente. A utilização líquida da proteína das dietas confirma os resultados de PER e NPR, em que os produtos de levedura não diferiram entre si, mas foram inferiores à caseína. No geral, o valor nutritivo da proteína de levedura variou na faixa de 80-85% da caseína. Os níveis séricos de ácido úrico se elevaram nos ratos em dietas de levedura, permanecendo porém na faixa considerada de normalidade. A dieta com autolisado total produziu uma redução na concentração sanguínea de triacilgliceróis, o que não ocorreu nas demais dietas. Para o colesterol total e LDL-colesterol, todas as dietas de levedura se comportaram semelhantemente, não diferindo entre si e do controle de caseína.

\*Parte deste capítulo foi publicado: **Revista de Nutrição**. Vide anexo 2.

### 3.1.Introdução

A levedura (*Saccharomyces* sp.) pode ser usada na alimentação humana e animal, sob várias formas e para diversas finalidades (PEIXOTO, 1996). O uso mais extenso é na panificação, com 120 ton/ano, no Brasil. É também largamente usada como agente de fermentação, nas indústrias de fabricação de cerveja, vinhos e álcool. A levedura inativada, pela ação do calor, é usada como fonte de nutrientes em alimentação animal e humana, tanto na forma de levedura íntegra como de derivados de levedura (DZIEZAK, 1987b; HALÁSZ & LASTITY, 1991).

A levedura é reconhecida mundialmente como excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética (REED & NAGODAWITHANA, 1991). Segundo ICIDCA (1988), de todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a de maior valor industrial e comercial, devido ao seu alto teor de lisina. Entretanto, alguns fatores limitam seu uso, para o consumo humano, a saber: presença de parede celular espessa e rígida resistente à ação de enzimas digestivas (SNYDER, 1970; GALVEZ et alii., 1990) e alto conteúdo de ácidos nucleicos. Ingestão de altas quantidades de ácidos nucleicos leva à acumulação de ácido úrico, que pode cristalizar-se nos tecidos e órgãos, causando a formação de cálculos no tecido urinário e deposição de cálcio nos tecidos moles (LYUTSKANOV et alii, 1990). Por estas razões, é importante o desenvolvimento de métodos de processamento da biomassa, que permitam minimizar os problemas mencionados. Tem sido demonstrado que isolados protéicos obtidos a partir de células de levedura podem ter melhor qualidade nutricional do que as células íntegras, porque o seu conteúdo de ácidos nucleicos, a presença de componentes ativos indesejáveis e o efeito deletério da parede celular sobre a biodisponibilidade de nutrientes são atenuados (ROSALES, 1984).

O uso e a importância do uso de derivados de levedura, como ingrediente flavorizante e complemento nutritivo dos alimentos, têm sido bastante enfatizados na literatura (DZIEZAK, 1987a,b; ANÔNIMO, 1986; HALÁSZ & LÁSTITY, 1991, CAMERÓN et alii, 1988; BELEM & LEE, 1997; BELEM & LEE, 1998).

O valor nutritivo, particularmente da proteína, de preparados de células íntegras e rompidas mecanicamente e de concentrados protéicos de *Saccharomyces* sp., tem sido estudado e reportado (RUMSEY et alii, 1991; CABALLERO-CÓRDOBA et alii, 1997; PACHECO et alii, 1997).

Neste trabalho, reporta-se sobre o valor protéico do autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.), comparativamente à biomassa formada de células íntegras.

### 3.2. Material e métodos

**Material de estudo.** As amostras de levedura foram gentilmente cedidas pela empresa, PRODESA - Produtos Especiais para Alimentos, com sede em Campinas, SP, e foram provenientes de cervejarias. A biomassa, recebida na forma de suspensão de células foi recuperada por centrifugação e submetida a tratamento para o desamargamento. Após desamargamento, parte do lote foi secada em "spray dryer", para obtenção de biomassa desidratada, formada de células íntegras (LI). Outra parte foi submetida à autólise em fermentador de 250 L (Newbrunswick - IF 250), para se obter o autolisado total (AT), que após secagem em "spray" se transformou no autolisado desidratado. Parte do autolisado foi submetido a fracionamento (centrifugação), originando o extrato de levedura (Ex) e uma fração insolúvel, identificada como parede celular (Pc). Ambas as frações foram obtidas na forma de pó, pela secagem em "spray dryer".

Detalhes das operações de limpeza, desamargamento, autólise, fracionamento, secagem e caracterização química da levedura íntegra e dos derivados foram descritos e publicados (SGARBIERI et alii, 1999), e apresentado no capítulo 2 desta tese.

**Determinação de aminoácidos.** A determinação de aminoácidos, com exceção do triptofano, foi feita após hidrólise ácida da proteína (HCl 6N, 110°C, 22h) por cromatografia líquida de alta eficiência (Dionex Dx 300), com separação em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina. A quantificação dos aminoácidos foi realizada por padronização externa. Foram utilizados padrões sigma. O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase (24h, 40°C) seguida de reação colorimétrica com solução de 4-dimetilamino benzaldeído

(DAB), em ácido sulfúrico 21,2N e leitura a 590 nm contra curva padrão de triptofano (Spies, 1967).

**Valor nutritivo da proteína.** O valor nutritivo da proteína, dos vários produtos de levedura, foi determinado, comparativamente à caseína, utilizando ratos machos da linhagem Wistar, livres de patógenos (SPF), fornecidos pelo Centro de Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp. Foram utilizados 40 ratos, com idade entre 21-25 dias, no início do ensaio. Após pesagem, os animais foram distribuídos em cinco grupos de 8 ratos cada, sendo cada rato mantido em gaiola individual, durante toda a duração do experimento (28 dias), em que receberam água e dieta *ad libitum*. Durante o experimento, a temperatura do laboratório de ensaio foi mantida em  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com alternância automática de claro-escuro de 12 horas.

A composição básica da dieta controle (padrão de caseína) é mostrada na Tabela 1, formulada segundo AIN-93 G (REEVES et alii, 1993), exceto pela concentração de caseína, que foi mantida ao redor de 10% (p/p). Para a execução dos ensaios, as seguintes dietas foram preparadas: I. dieta padrão de caseína (CAS); II. dieta isenta de proteína, aprotéica (AP); III. dieta contendo células íntegras de levedura (LI), como única fonte de proteína; IV. dieta contendo autolisado total de levedura (AT), como única fonte de proteína; V. dieta contendo extrato de levedura (Ex), como única fonte de proteína.

**Tabela 1.** Composição básica da dieta (AIN-93G) para ratos em crescimento.

Ingredientes	gramas/Kg dieta
Amido de milho	479,839
Caseína (85% proteína)	117,647
Amido de milho dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos)	132,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	70,000
Fibra (pó de celulose)	50,000
Mistura mineral (AIN-93G-MX)	10,000
L-cistina	3,000
Bitartarato de Colina (41,1% Colina)	2,500
Terc-butil-hidroquinona	0,014

O valor nutritivo da proteína foi estimado através de curvas de crescimento, (PER e NPR) e de balanço de nitrogênio, que permitiu o cálculo da digestibilidade, valor biológico e índice de utilização líquida da proteína. O NPR (ganho de peso (g) do grupo em dieta experimental + perda de peso (g) do grupo em dieta aprotéica/proteína ingerida (g) pelo grupo em dieta experimental) foi determinado após 21 dias na dieta. O PER (ganho de peso (g)/proteína ingerida (g)) foi calculado após 28 dias na dieta. O balanço de nitrogênio (nitrogênio ingerido - nitrogênio excretado nas fezes mais urina) exigiu que os animais fossem mantidos em gaiolas metabólicas durante 8 dias, durante os quais fezes e urina foram coletados para análise de nitrogênio e a ingestão de nitrogênio avaliada, para o cálculo da retenção de nitrogênio no organismo. Essas determinações foram feitas na segunda semana do ensaio. Com os dados do balanço de nitrogênio pode-se calcular: a)

digestibilidade da proteína (nitrogênio ingerido/nitrogênio absorvido); b) valor biológico da proteína (nitrogênio retido no organismo/nitrogênio absorvido); c) utilização líquida da proteína (nitrogênio retido no organismo/nitrogênio ingerido). Para o cálculo dos índices verdadeiros de digestibilidade, valor biológico e utilização líquida da proteína, deve-se subtrair do nitrogênio excretado, tanto nas fezes como na urina dos grupos experimentais, o nitrogênio excretado, respectivamente, nas fezes e urina, do grupo de animais em dietas aprotéica (nitrogênio endógeno).

**Determinações no soro sangüíneo.** Como um complemento da avaliação nutricional da proteína, foram realizadas várias determinações no soro sangüíneo dos ratos, a saber: triacilgliceróis, colesterol total, LDL-colesterol e ácido úrico.

**Triacilgliceróis.** Foi utilizado o método de BUCOLO & DAVID (1973). Os triacilgliceróis são extraídos com uma mistura de varsol (39%), isopropanol (60%) e ácido sulfúrico (70 milimol/l), havendo separação em fases, com recuperação quantitativa dos triacilgliceróis na fase não-polar (superior), juntamente com as proteínas. Os triacilgliceróis extraídos são saponificados a glicerol e ácidos graxos. O glicerol é oxidado a formaldeído, que forma um complexo, (dihidrolutidina, amarelo) através da reação de Hantzsch, e leitura da absorbância a 410nm. Utilizou-se um Kit da Labtest (Labcenter, Campinas-S.P.).

**Colesterol total.** O método baseia-se na desesterificação enzimática, pela colesterol esterase, a oxidação do colesterol livre pela colesterol oxidase, com formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  reage com o reagente fenol-4-aminoantipirina produzindo, pela ação da peroxidase, o cromóforo antipirilquinonimina, cuja cor vermelha absorve a 500 nm. A determinação se baseia

na reação de Lieberman-Buchard e o método foi descrito por HUANG et alii (1961). Utilizou-se kit Labtest (Labcenter, Campinas, SP).

**HDL-colesterol.** Utilizou-se o método de FRIEDWALD et alii (1972). As lipoproteínas de baixa densidade são separadas do soro sanguíneo por precipitação, mediante complexação com polímeros de alto peso molecular. Após centrifugação, separam-se no sobrenadante as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O colesterol ligado à HDL foi determinado por reação colorimétrica do sobrenadante através do sistema enzimático, colesterol oxidase-peroxidase, utilizando-se kit Labtest (Labcenter, Campinas, SP).

**Ácido úrico.** O método de dosagem baseia-se na coloração azul, obtida pela ação redutora do ácido úrico sobre o reativo fosfotúngstico, em pH básico e presença de alantoína e CO<sub>2</sub>. O azul de tungstênio formado absorve radiação no comprimento de onda de 700 nm, segundo BERNDT & DAVIS (1989). Utilizou-se para a dosagem kit labtest, fornecido pela Labcenter (Labcenter, Campinas, SP).

### 3.3.Resultados e discussão

A Tabela 2 mostra os dados de consumo de dieta e de proteína, ganho de peso e os índices calculados, PER e NPR, para grupos de 8 ratos, alimentados com dietas contendo caseína, células de levedura íntegras (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex), como fonte única de proteína.

Pode-se observar que não houve diferença estatística, no consumo de dieta e de proteína, para ratos mantidos em biomassa de células íntegras, extrato de levedura e caseína, que apresentaram valores estatisticamente superiores aos encontrados para o autolisado total. Quanto ao ganho de peso médio dos ratos, verifica-se que a dieta de caseína promoveu o maior ganho de peso e a de autolisado o menor ( $p \leq 0,05$ ), enquanto que a levedura íntegra e o extrato produziram ganhos intermediários, iguais entre si, mas que diferiram estatisticamente, tanto da caseína como do autolisado. Quanto aos valores de PER e de NPR, levedura íntegra, autolisado total e extrato, não diferem entre si, estatisticamente, sendo porém inferiores ( $p \leq 0,05$ ) aos índices fornecidos pela caseína.

O menor ganho de peso do grupo mantido em dieta com autolisado total parece estar diretamente relacionado com a menor ingestão de dieta e de proteína por esse grupo e não à eficiência da proteína em promover crescimento, como sugere os índices PER e NPR (Tabela 2).

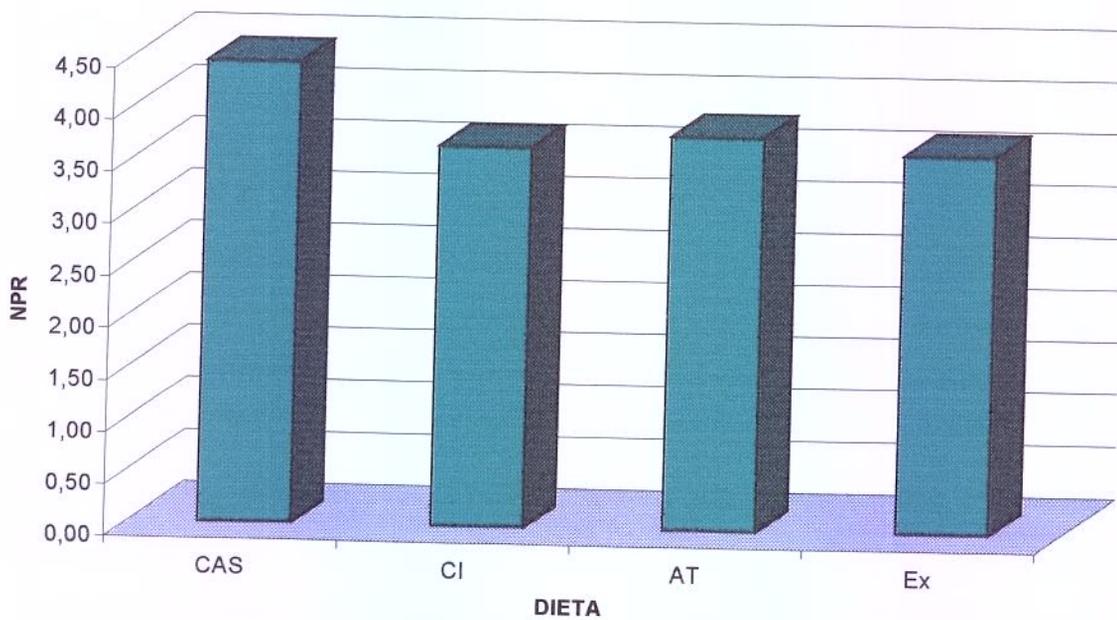
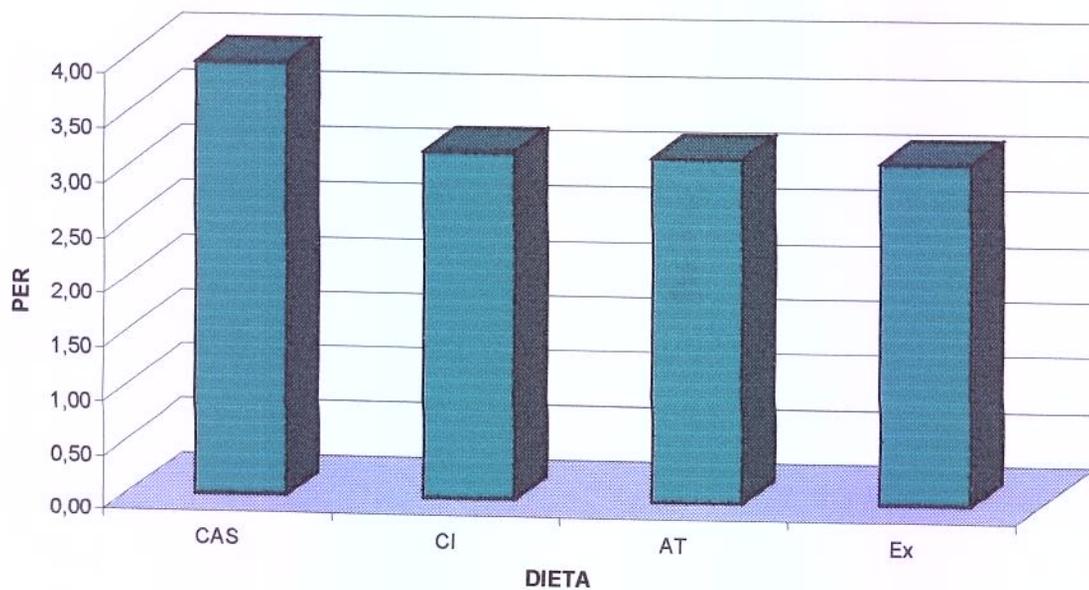
Melhor visualização dos valores de PER e de NPR pode-se ter no gráfico da Figura 1, em que as três dietas com proteína de levedura foram estatisticamente iguais, diferindo porém da caseína ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Consumo de dietas, ingestão de proteínas e variação de peso de ratos submetidos aos tratamentos: **CAS**, caseína (padrão); **LI**, levedura íntegra e **Ex**, extrato de levedura: 8 ratos por tratamento, duração 28 dias.

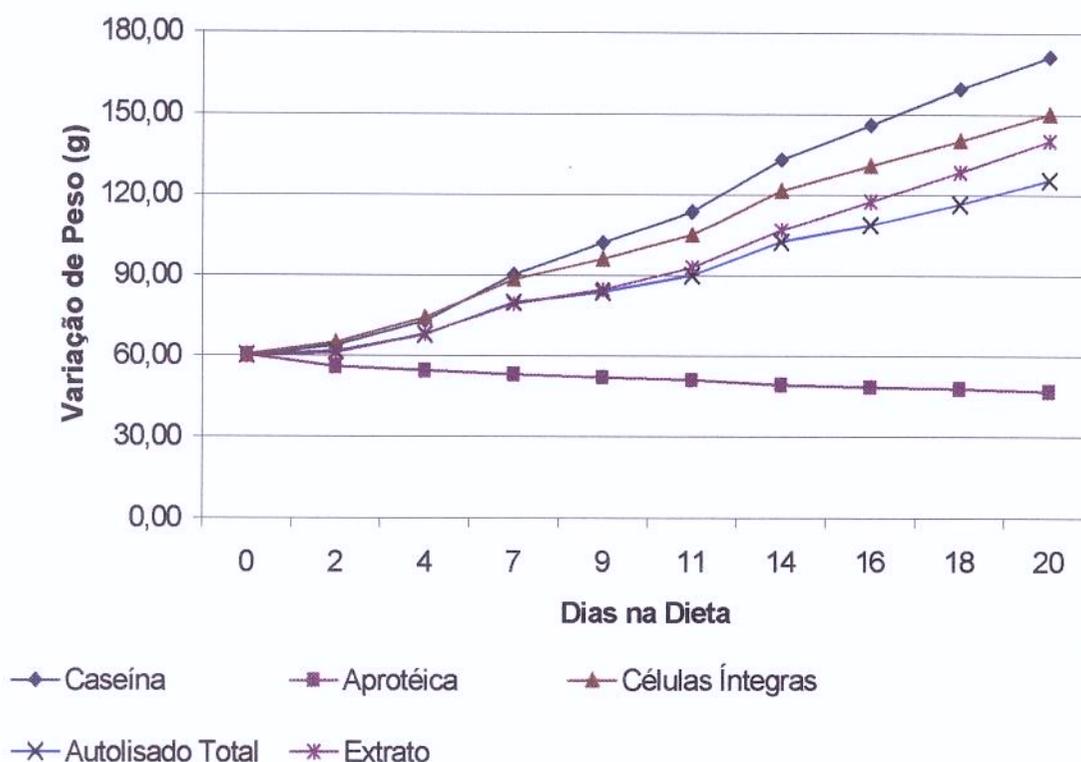
Tratamento/ Proteína (%)	Dieta Consumida (g)	Proteína Consumida (g)	Variação de Peso (g)	PER	NPR
Caseína (10,54)	267,0 <sup>a</sup> (10,3)	28,2 <sup>a</sup> (1,1)	111,4 <sup>a</sup> (9,4)	4,0 <sup>a</sup> (0,2)	4,4 <sup>a</sup> (0,2)
Levedura íntegra (10,70)	264,3 <sup>a</sup> (16,9)	28,3 <sup>a</sup> (1,8)	89,8 <sup>b</sup> (8,6)	3,2 <sup>b</sup> (0,2)	3,7 <sup>b</sup> (0,1)
Autolisado total (9,46)	219,9 <sup>b</sup> (17,4)	20,8 <sup>b</sup> (1,7)	65,3 <sup>c</sup> (13,2)	3,1 <sup>b</sup> (0,6)	3,8 <sup>b</sup> (0,6)
Extrato (10,53)	244,7 <sup>a</sup> (28,3)	25,8 <sup>a</sup> (3,0)	80,1 <sup>b</sup> (11,5)	3,1 <sup>b</sup> (0,2)	3,6 <sup>b</sup> (0,2)

( ) Valores entre parênteses representam desvios-padrão das médias. <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes (colunas) indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos.

Na Figura 2 são apresentadas as curvas de variação de peso, para os grupos de ratos mantidos nas várias dietas. Embora não tenha havido diferença estatística nos valores de PER (Tabela 2 e Figura 1), entre as dietas com proteína de levedura, houve um crescimento diferenciado, produzido pela biomassa de células íntegras (LI), o extrato de levedura (Ex) e o autolisado total (AT). Dentre as dietas de levedura, a LI provocou o maior crescimento e o AT o menor, obtendo-se valores intermediários para o extrato. Essas diferenças podem ser atribuídas a diferenças na ingestão de dieta e de proteína (Tabela 2), uma vez que o quociente de eficiência protéica (PER) não variou entre as dietas contendo proteína de levedura. As dietas com proteínas de levedura produziram crescimento inferior ao da caseína.



**Figura 1** – Representação gráfica do PER (Quociente de Eficiência Protéica) e NPR (Quociente de Eficiência Protéica Líquida) para ratos em dieta de caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT) e extrato de levedura (Ex).



**Figura 2** – Evolução do peso corporal de ratos submetidos durante 20 dias a dieta contendo como única fonte de proteína: caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT); extrato de levedura (Ex) e dieta aprotéica (AP).

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do balanço de nitrogênio (BN), para os grupos de ratos submetidos às várias dietas contendo levedura, comparativamente à dieta de caseína. Verifica-se não ter havido diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) na ingestão de nitrogênio para as dietas contendo LI e Ex de levedura, comparadas com a caseína, tendo os ratos em dietas com autolisado ingerido quantidade inferior de N ( $p \leq 0,05$ ). A excreção urinária de nitrogênio foi maior no grupo em dieta com extrato de levedura e estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) das demais dietas, que não diferiram entre si. A excreção fecal de nitrogênio foi

estatisticamente mais elevada na dieta com levedura íntegra ( $p \leq 0,05$ ), foi inferior para a dieta de caseína e a dieta contendo extrato de levedura, que não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) e teve um valor intermediário, diferente da primeira e das últimas para os ratos em dieta com autolisado total. Quanto à quantidade de nitrogênio retida no organismo (BN), verifica-se que a menor retenção de nitrogênio foi para a dieta contendo autolisado total de levedura, como fonte de proteína. As demais dietas, caseína, levedura íntegra e extrato de levedura, proporcionaram, estatisticamente, a mesma retenção de nitrogênio, superior à do autolisado.

**Tabela 3.** Nitrogênio ingerido com as dietas (NI), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio retido (BN) nas dietas de caseína (CAS), células íntegras de levedura (LI), autolisado total de levedura (AT) e extrato de levedura (Ex). Balanço de 8 dias.

Tratamentos (8 ratos)	NI (mg)	NU (mg)	NF (mg)	BN (mg)
Caseína (10,54 prot.)	1620 ± 61 <sup>a</sup>	143 ± 17 <sup>b</sup>	93 ± 20 <sup>c</sup>	1388 ± 70 <sup>a</sup>
LI (10,7% prot)	1798 ± 139 <sup>a</sup>	190 ± 30 <sup>b</sup>	314 ± 40 <sup>a</sup>	1390 ± 160 <sup>a</sup>
AT (9,46% prot)	1296 ± 161 <sup>b</sup>	136 ± 56 <sup>b</sup>	217 ± 70 <sup>b</sup>	935 ± 100 <sup>b</sup>
Ex (10,53% prot)	1633 ± 250 <sup>a</sup>	320 ± 107 <sup>a</sup>	101 ± 10 <sup>c</sup>	1234 ± 200 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes (colunas) indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamentos.

NI = Nitrogênio Ingerido; NU = Nitrogênio Urinário; NF = Nitrogênio Fecal; BN = Balanço de Nitrogênio

Os índices, digestibilidade, valor biológico e utilização líquida, verdadeiros, calculados para a proteína, a partir dos dados de balanço de nitrogênio, são apresentados na Tabela 4. A digestibilidade verdadeira (Dv%) da proteína foi significativamente maior e idêntica para a caseína e para o extrato de levedura. Os valores para leveduras íntegras (LI) e autolisado total (AT) não diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) e foram inferiores à caseína e ao extrato de levedura. O valor biológico verdadeiro (VBv%) não diferiu estatisticamente para caseína, células íntegras e autolisado de levedura, e foi estatisticamente superior ao valor encontrado para o extrato. Quanto ao índice de utilização líquida da proteína (NPUv%), as três fontes protéicas de levedura não diferiram entre si, tendo sido inferiores ao da caseína.

**Tabela 4.** Índices de valor protéico para a caseína (CAS), células íntegras de levedura (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex).

Tratamento (8 ratos)	Dv (%)	VBv (%)	NPUv (%)
CAS	95,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	90,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	86,7 ± 2,2 <sup>a</sup>
LI	83,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	86,3 ± 3,1 <sup>a</sup>	71,7 ± 3,9 <sup>b</sup>
AT	86,5 ± 4,2 <sup>b</sup>	87,7 ± 4,5 <sup>a</sup>	75,9 ± 6,9 <sup>b</sup>
Ex	95,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	79,3 ± 5,3 <sup>b</sup>	75,6 ± 4,7 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes (colunas) indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamentos. Dv = Digestibilidade Verdadeira; VBv = Valor Biológico Verdadeiro; NPUv = Utilização Líquida da Proteína Verdadeira

A interpretação dos resultados da avaliação nutricional de proteínas pode ser facilitada, à luz do perfil de aminoácidos essenciais, como ilustra a Tabela 5. Como pode-se inferir da Tabela 5, o autolisado total foi a única preparação cuja proteína apresentou ligeira deficiência em relação ao padrão de referência oferecido pela FAO/WHO (1989). É importante notar que essa deficiência relativa, apresentada pela proteína do autolisado total, pode explicar, em grande parte, a inferioridade observada para o autolisado em relação à retenção de nitrogênio (BN) e ao crescimento dos ratos (Figura 2).

**Tabela 5.** Adequação de aminoácidos essenciais das células íntegras de levedura (LI), autolisado total (AT) e extrato de levedura (Ex), tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO.

Aminoácidos Essenciais (mg/100 mg prot)	Padrão FAO/WHO (1989)	Células Íntegras (LI)	Autolisado Total (AT)	Extrato de Levedura (Ex)
Treonina	3,4	6,16	5,84	5,19
Metionina + cisteína	2,5	2,84	2,11*	3,56
Valina	3,5	6,20	5,87	6,76
Leucina	6,6	8,84	7,80	8,07
Isoleucina	2,8	5,64	4,87	5,69
Fenilalanina + Tirosina	6,3	9,98	8,53	6,91
Lisina	5,8	7,13	9,54	8,58
Histidina	1,9	2,06	3,15	3,01
Triptofano	1,1	1,45	1,55	1,31

\* Aminoácido limitante (84% do recomendado) – Food... (1989).

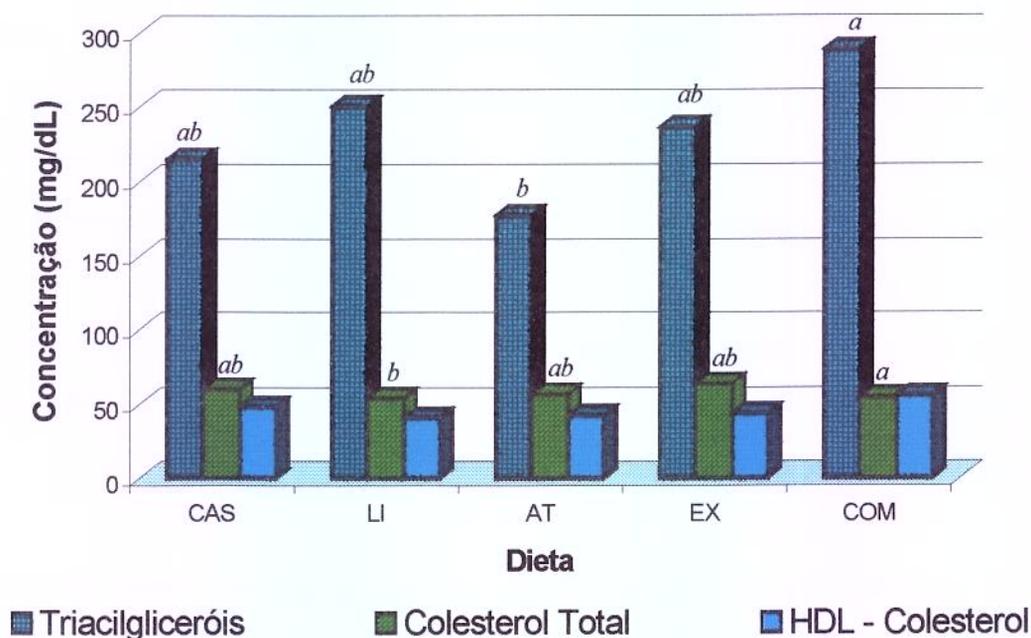
Dados da literatura (CALLOWAY, 1974) e SMITH & PALMER (1976) indicam deficiência em aminoácidos sulfurados para *Saccharomyces cerevisiae* e *Torula*. Resultados de valor biológico, reportados, estão na faixa de 60 - 90%. SMITH & PALMER (1976) reportaram valor de 47, 79 e 50% para NPU, digestibilidade e valor biológico, respectivamente, valores que foram elevados para 58, 93 e 67%, respectivamente, pela adição de 0,18% de L-metionina mais 0,05% de histidina.

Valores encontrados em nosso laboratório (CABALLERO-CÓRDOBA et alii, 1997; PACHECO et alii, 1997; CABALLERO-CÓRDOBA & SGARBIERI, 2000), para os índices indicativos de valor nutritivo da proteína de levedura, em suas várias formas, como células íntegras, autolisado, extrato e concentrados protéicos, têm sido superiores aos reportados na literatura. Essa relativa melhoria no valor nutritivo da proteína poderia ser explicado pelo preparo mais cuidadoso da biomassa e ajustes do processamento para obtenção dos vários derivados da levedura.

De um modo geral, as várias preparações de levedura obtidas em nosso laboratório têm apresentado valor protéico na faixa 75 - 90% da caseína, dependendo do índice de avaliação considerado.

A concentração de ácido úrico, no soro sangüíneo dos ratos, elevou-se de 1,74 mg/dL nos ratos em dieta de caseína, para valores na faixa de 2,1 (Ex) a 2,4 (AT). Esses resultados estão dentro da faixa de valores mencionados na literatura (1,2 - 7,5 mg/dL) para ratos normais (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981). Considerando o valor 1,74 mg/dL encontrado para caseína, os valores de 2,1 a 2,4 não representam elevação muito grande e, portanto, não se deve esperar que possam representar problema de toxicidade para os ratos.

Na Figura 3, estão representadas as concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol dos ratos submetidos durante 28 dias aos cinco diferentes tratamentos. Observa-se uma pequena redução dos níveis de triacilgliceróis no soro dos ratos em dieta de caseína, de células íntegras e de extrato de levedura, em relação à dieta comercial, porém sem diferença estatística entre elas. Por outro lado, houve considerável diminuição dos triacilgliceróis no soro dos ratos em dieta contendo autolisado total de levedura, significativamente inferior à dieta comercial, porém não diferindo estatisticamente da dieta de caseína e das demais dietas de levedura. Os níveis de colesterol total e de HDL-colesterol permaneceram praticamente iguais na caseína e nas dietas contendo proteína de levedura.



**Figura 3.** Representação gráfica dos índices séricos de triacilgliceróis, colesterol total e HDL – colesterol em ratos alimentados com dietas contendo: caseína (CAS); células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT); extrato de levedura (EX) na base de 10% de proteína e uma dieta comercial para ratos (COM).

### 3.4. Conclusões

Com base nos dados apresentados neste trabalho, pode-se concluir: a) a composição em aminoácidos essenciais da proteína, nos produtos de levedura estudados, não apresentou nenhuma deficiência em relação ao padrão de referência da Food and Agriculture Organization/World Health Organization,, exceto pelo autolisado total que apresentou escore químico de 84% do padrão, com base nos aminoácidos sulfurados totais, metionina mais cisteína; b) quanto à capacidade de produzir crescimento, em ratos recém-desmamados, as células íntegras foram ligeiramente superiores ao extrato e este superior ao autolisado, e as três fontes protéicas foram inferiores à caseína, embora, do ponto de vista da eficiência protéica (PER e NPR), os produtos de levedura não diferiram entre si; c) a presença de parede celular (células íntegras, autolisado) diminuiu significativamente a digestibilidade, embora não tenha afetado a utilização líquida da proteína; d) dependendo do índice de avaliação adotado, o valor nutritivo da proteína de levedura, nos vários produtos, representou 80 - 85% do valor da caseína; e) os níveis de ácido úrico se elevaram no soro sanguíneo dos ratos em dieta de levedura, permanecendo, porém, dentro da faixa considerada normal; f) a dieta com autolisado total de levedura provocou uma diminuição de triacilgliceróis no soro sanguíneo dos ratos; g) conclui-se que os produtos de levedura contêm proteína de boa qualidade nutricional, podendo ser recomendados como parte da dieta humana, em suas várias formas.

### 3.5. Referências bibliográficas

- ANÔNIMO. Yeast protein enhances flavour and nutrition. **Food Processing**, Chicago, 1986, pp. 13-14.
- BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.38, n.7, p.565-598, 1998.
- BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Food Science and Technology International**, London, v.3, n.6, p.437-444, 1997.
- BERNDT, W.O.; DAVIS, M.E. **Renal methods for toxicology**. In: Principles and Methods for Toxicology, Hayes, A.W. (Ed.), Raven Pross, Ltd., 2<sup>nd</sup> Edition, New York, 1989, 929p.
- BUCOLO, G.; DAVID, E. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.19, p.476-482, 1973.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.80, p.341-351, 2000.

- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.102-106, 1997.
- CALLOWAY, D.H. The place of single cell protein (SCP) in man's diet. In: **Single Cell Protein**, Davis, P. (Ed.), Academic Press, New York, 1974, p.129.
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.
- DZIEZAK, J. Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.104-121, 1987a.
- DZIEZAK, J. Yeasts and yeast derivatives: Applications. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.122-125, 1987b.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGNIZATION. **Protein quality evaluation**. Rome, 1989. 27p. (Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Food and Nutrition Paper, n.51)
- FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifugation. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.18, p.499-502, 1972.

- GALVEZ, A.; RAMÍREZ, M.J.; GARCIA-GARIBAY, M. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.40, n.2, p.252-262, 1990.
- HALÁSZ, A.; LÁSTITY, R. (Eds.) **Use of Yeast Biomass in Food Production**. CRC Press, Boca Raton, 1991, 312p.
- HUANG, T.C.; CHEN, C.P.; WEFLR, V.; RATTERY, A.A. A stable reagent for the Lieberman-Buchard reaction. **Analytical Chemistry**, Washington, v.33, p.1405-1407, 1961.
- ICIDCA. **Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar**, Habana, GEPLACEA-PNUD, 1988, 252p.
- LYUTSKANOV, N.; KOLEVA, L.; VENKOV, P. & HADJILOV, A. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: reduction of nucleic acid content and applicability of the protein extracts. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.30, n.7, p.523-528, 1990.
- MITRUKA, M.B.; RAWNSLEY, H.M. **Clinical, Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans**, 2<sup>nd</sup> ed., Masson Publishing, Inc., New York, 1981, 314p.

- PACHECO, M.T.B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, Tokyo, v.43, n.6, p.601-612, 1997.
- PEIXOTO, N. Processamentos de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. **Anais do "Workshop" sobre Produção de Biomassa de Levedura - Utilização em Alimentação Humana e Animal**, 1996, pp. 90-98, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast technology**, 2<sup>nd</sup> edition, Van Nostrand Reinhold, New York, 1991, 378p.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. (A Committee Report). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Committee on the reformulation of the AIN-76a RODENT DIET. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.2, p.467-472, 1993.
- ROSALES, F.H. Yeast as protein source for human nutrition. A review. **Acta Microbiology of the Academy of Science of Hungary**, Budapest, v.31, n.3, p.159-172, 1984.
- RUMSEY, G.L.; HUGHES, S.G.; SMITH, R.R.; KINSELLA, J.E.; SHETTY, K.J. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.33, n.3/4, p.185-193, 1991.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1,2, p.119-125, 1999.

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

SNYDER, H.E. Microbial sources of protein. **Advances in Food Research**, New York, v.18, p.85-91, 1970.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington DC, v.39, n.10, p.1412-1415, 1967.

## CAPÍTULO 4

### VALOR NUTRITIVO GLOBAL DA BIOMASSA DE CÉLULAS ÍNTEGRAS, DO AUTOLISADO TOTAL E DO EXTRATO DE LEVEDURA (*SACCHAROMYCES SP.*) \*

#### RESUMO

Esta pesquisa teve como principal objetivo verificar a capacidade da levedura e seus derivados, autolisado total e extrato, em manter o crescimento de ratos recém-desmamados, quando usados em substituição parcial a uma dieta padrão ideal. Usou-se substituição de 10, 20 ou 30% da dieta padrão (AIN-93G), por uma mistura (amido de milho + produto de levedura + óleo de soja), mantendo as dietas modificadas com característica isoprotéica (20% proteína) e isocalórica. Nessa mistura os produtos de levedura entraram na proporção de 4, 8 ou 12%, respectivamente. As dietas substituídas, contendo diferentes proporções de produtos de levedura, provocaram crescimento dos ratos ligeiramente superior ao da dieta de caseína. O ritmo de crescimento aumentou, proporcionalmente ao aumento da participação dos produtos de levedura. Os índices séricos de ácido úrico, uréia e atividade de transaminases (TGO e TGP) não evidenciaram sintomas de intoxicação pelo uso dos produtos de levedura.

**Palavras-chave:** Levedura, células íntegras, autolisado total, extrato, valor nutritivo.

\*Parte deste capítulo foi publicado: **Revista de Nutrição**. Vide anexo 3.

## 4.1.Introdução

Biomassa formada de células íntegras de levedura, autolisado e extrato de levedura, têm sido largamente utilizados como suplemento nutritivo e flavorizante, em suas diversas formas.

A biomassa de células íntegras, inativadas, tem sido usada: a) como complemento nutritivo na formulação de alimentos saudáveis (DZIEZAK, 1987; HALÁSZ, 1988); b) como complemento flavorizante e funcional, em produtos como macarrão (McCORMICK, 1975), no enriquecimento de pães (CHING-MING et alii, 1986), em produtos tipo "snacks" (STEWART & GILLIAND, 1979; BOSTIAN et alii, 1978), massa para pizza (KAMEL et alii, 1979), adição em salsichas e almôndegas (JUNILLA et alii, 1981).

Segundo ALIAN et alii (1983a, b), a adição, no pão, de 5% de levedura de cerveja desamargada, à farinha de trigo com 70 e 90% de extração, elevou o valor biológico (BV) da proteína da massa de 31% para 76%.

Tem sido ainda reportado (SHACKELFORD & MURRAY, 1980), que a biomassa de levedura exerce uma ação antioxidante prolongando a vida-de-prateleira, de alguns sistemas alimentares, quando estocados à temperatura de refrigeração ou congelado, particularmente, em sistemas ricos em gorduras insaturadas.

Autolisados e extratos de levedura encontram vasta aplicação na indústria de alimentos, como em salsichas, até 1,5% de concentração; em produtos cárneos, antes do congelamento, para prevenir oxidação de lipídios e perda da solubilidade das

proteínas cárnicas, durante o armazenamento no estado congelado (LÁSZTITY, 1987; ANON, 1981); produtos como salsichas, presuntos, molhos, sopas, "snacks" têm sido formulados com a adição de extratos e autolisados de levedura, com uma sensível melhoria de suas propriedades sensoriais, em que o gosto à carne é o que se destaca (SCHMIDT, 1987; SOMMER, 1983).

Mais recentemente, tem havido uma forte tendência de explorar comercialmente a levedura, através do isolamento de alguns de seus principais constituintes como enzimas (invertase, lactase) nucleotídeos, proteínas (manoproteínas), polissacarídeos (glicana, manana), além de lipídios, como fosfolipídios e ergosterol (CAMERON et alii, 1988; KOLLAR et alii, 1992; BELEM & LEE, 1997; BELEM & LEE, 1998). Esses componentes, quando isolados, apresentam propriedades específicas de grande interesse em Ciência de Alimentos e em Nutrição.

No presente trabalho, estudou-se o valor nutritivo global de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura, quando utilizados, em diferentes proporções, em substituição a uma dieta completa para ratos em crescimento, avaliando-se os efeitos da substituição no ritmo de crescimento e no estado geral de saúde dos animais.

## 4.2. Material e métodos

**Levedura.** Levedura (*Saccharomyces* sp.) proveniente de cervejarias foi gentilmente cedida pela empresa PRODESA - Produtos Especiais para Alimentos, na forma de suspensão com aproximadamente 20% de sólidos, em base seca.

**Preparo das células para o processamento.** A suspensão de células foi, inicialmente, submetida a tratamentos, em planta piloto, para limpeza e desamargamento (SGARBIERI et alii, 1999). Após centrifugação para coleta das células, a biomassa foi tratada com solução alcalina (0,2% NaOH, 1:1 p/v), seguida de centrifugação e lavagens com água para eliminação do hidróxido de sódio. A biomassa assim tratada foi chamada de biomassa limpa e desamargada.

**Processamento da biomassa limpa e desamargada.** A biomassa foi submetida à autólise (24h, 55°C, suspensão a 20% de células) em fermentador Newbrunswick de 250L, seguindo-se a pasteurização (85°C, 15 min) e centrifugação. As frações (solúvel e insolúvel) foram denominadas extrato bruto e parede celular, respectivamente. O extrato bruto foi submetido à clarificação (centrifugação), concentração (vácuo) e desidratação em "spray dryer". Parte do autolisado total e da biomassa de células íntegras, limpas e desamargadas, também foi desidratada em "spray", obtendo-se os seguintes materiais, na forma desidratada: células íntegras de levedura (LI); autolisado total de levedura (AT) e extrato de levedura (Ex). Detalhes e fluxogramas do processamento foram descritos em SGARBIERI et alii (1999), e apresentados no capítulo 2.

**Composição centesimal.** Os teores de proteína (N x 5,8), de umidade e de cinzas foram determinados seguindo os procedimentos descritos no AOAC (1990); lipídios

totais, pelo método de BLIGH & DYER (1959); fibra alimentar (solúvel e insolúvel), pelo método de ASP et alii (1983); ácido nucleico (RNA) foi determinado pelo método de HEBERT et alii (1971).

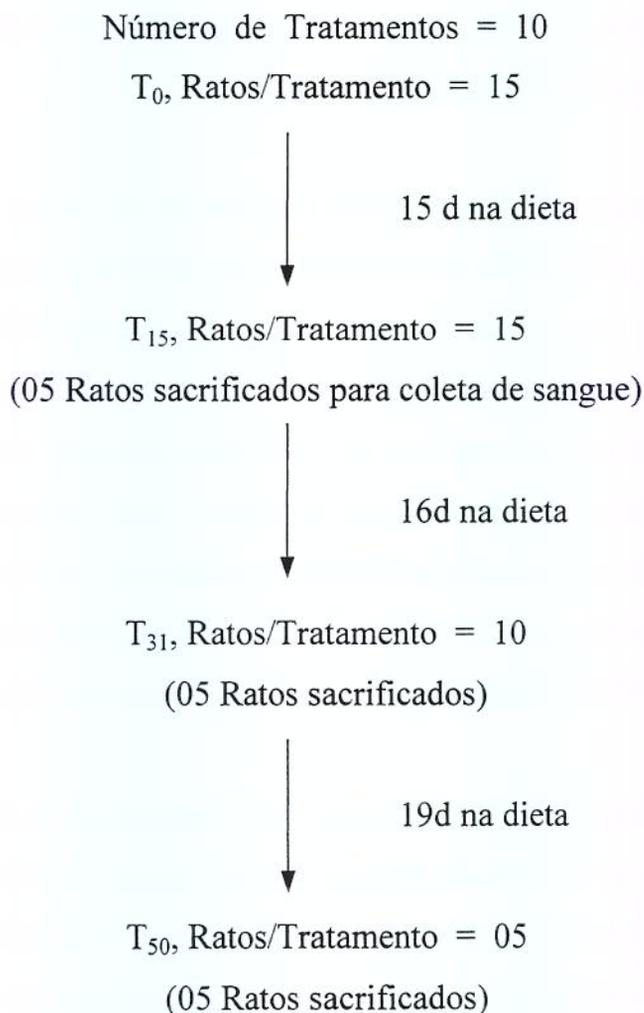
**Ensaio com ratos.** O valor nutritivo global da biomassa formada de células íntegras, do autolisado total e do extrato de levedura foi estudado através da substituição de quantidades crescentes da dieta recomendada pelo AIN (AIN-93G) para ratos em crescimento, segundo REEVES et alii (1993).

Para a realização do ensaio, foram preparadas 10 dietas: uma dieta padrão, elaborada conforme AIN-93G, recomendada para ratos em crescimento, contendo 20% de proteína, proveniente de uma caseína comercial (85% proteína); nove grupos, em que se fez substituições de 10, 20 ou 30% da dieta padrão, por misturas contendo (amido de milho + produto de levedura + óleo de soja). Essas misturas foram preparadas antes das substituições, para que se pudesse manter, a dieta padrão e as dietas substituídas, isoprotéicas (20% de proteína) e isocalóricas. Os níveis reais de produtos de levedura, nas dietas substituídas foram de aproximadamente 4, 8 e 12% para 10, 20 e 30% de substituição da dieta padrão, respectivamente.

Foram utilizados 150 ratos machos da linhagem Wistar, livres de patógenos (SPF), provenientes do Centro de Animais de Laboratório da Unicamp. Os animais, com 28 dias de idade no início do experimento, foram distribuídos em 10 grupos de 15 ratos, que foram alojados em gaiolas individuais e mantidos no laboratório de experimentação a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , com alternância claro-escuro de 12 horas. Cada grupo de 15 ratos recebeu um dos seguintes tipos de dieta e água *ad libitum*: dieta padrão, com 20% de caseína (CAS); dietas contendo biomassa de levedura íntegra (LI), com 10, 20 ou 30% de substituição (LI 10, LI 20 ou LI 30%); dietas contendo autolisado

total de levedura (AT), com 10, 20 ou 30% de substituição (AT 10, AT 20 ou AT 30%); dietas contendo extrato de levedura (Ex), com 10, 20 ou 30% de substituição (Ex 10, Ex 20 ou Ex 30%).

Um organograma geral da execução dos experimentos é mostrado na Figura 1.



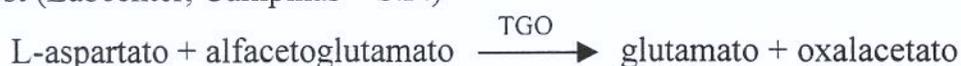
**Figura 1.** Organograma geral de execução dos experimentos; T<sub>0</sub> = tempo zero (início); T<sub>15</sub>, T<sub>31</sub> e T<sub>50</sub>, respectivamente 15, 31, ou 50 dias após o início do experimento.

**Determinações no soro sangüíneo.** Como um complemento da avaliação nutricional da proteína, foram realizadas várias determinações no soro sangüíneo dos ratos, a saber: ácido úrico, uréia, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)

**Ácido úrico.** O método de dosagem tem por base a obtenção de uma coloração azul através da ação redutora do ácido úrico sobre o reativo fosfotúngstico à pH básico e presença de alantoína e CO<sub>2</sub>. Ocorrerá a formação de azul de tungstênio que absorve radiação a 700 nm, segundo BERNDT & DAVIS (1989). Utilizou-se para a dosagem Kit Labtest, fornecido pela Labcenter (Labcenter, Campinas, SP).

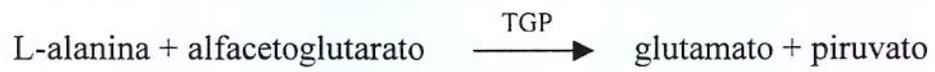
**Uréia.** O método baseia-se na hidrólise da uréia pela urease a íons amônia e CO<sub>2</sub>. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio utilizando como catalisador o nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol, que absorve luz à 600nm. Utilizou-se Kit Labtest (Labcenter, Campinas, S.P.).

**Transaminase glutâmico-oxalacética.** A enzima transaminase glutâmico-oxalacética promove a transferência de grupos amina de alfaaminoácidos para alfacetoácidos. O oxalacetato é medido por formação de hidrazona que tem intensa cor em meio alcalino, absorvendo luz a 505 nm. Efetuou-se a análise através de Kit Labtest (Labcenter, Campinas – S.P.)



**Transaminase glutâmico-pirúvica.** A enzima transaminase-pirúvica promove a transferência de grupamentos amina de alfaaminoácidos para alfacetoácidos. O piruvato é medido através de formação de hidrazona que tem intensa cor em meio

alcalino, absorvendo luz a 505 nm. Utilizou-se Kit Labtest (Labcenter, Campinas – S.P.).



### 4.3. Resultados e discussão

A composição centesimal dos três produtos de levedura, utilizados neste estudo é mostrada na Tabela 1. Os componentes que aparecem em maior concentração nas células íntegras (LI) e no autolisado (AT) são as proteínas, seguidas da fibra solúvel, de substâncias minerais e do RNA. No extrato (Ex), pela quase ausência de fibra, predominaram as proteínas, as substâncias minerais e os componentes não determinados, provavelmente com predominância de açúcares solúveis, incluindo oligossacarídeos que não precipitaram em etanol, utilizado para precipitar a fibra solúvel.

**Tabela 1.** Composição centesimal aproximada da biomassa de células íntegras de levedura (LI), do autolisado total (AT), e do extrato de levedura (Ex), todos em base seca.

Componente (%b.s.)	Células Íntegras (LI)	Autolisado total (AT)	Extrato (Ex)
Proteína (N x 5,8)*	48,41 ± 0,56 <sup>b</sup>	46,44 ± 0,14 <sup>c</sup>	61,88 ± 0,59 <sup>a</sup>
Lipídios totais*	3,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,02 <sup>c</sup>
Cinzas*	7,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,06 ± 0,02 <sup>c</sup>	12,31 ± 0,07 <sup>a</sup>
RNA**	5,65	7,93	6,87
Fibra total	24,40	25,03	2,70
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00
Não determinado***	10,29	10,23	15,62

\*Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão, sendo a avaliação estatística feita através do teste de Tukey; \*\* Resultados são média de 2 determinações analíticas; \*\*\*Não determinado = 100 - (proteína + lipídios totais + cinzas + RNA + fibra total).

Esse resultado de composição centesimal se aproxima muito de dados já reportados na literatura (HALÁSZ & LASTITY, 1991; GUZMÁN-JUAREZ, 1983).

Os resultados relativos ao consumo de dietas, ingestão de proteínas, ganho de peso e PER operacional ( $PER_{op}$ ) dos ratos nas várias dietas, com 20% de proteína, são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença estatística para os vários tratamentos, em todos os índices determinados. Deve-se notar que o  $Per_{op}$  encontrado ( $\sim 1,5$ ) é bem inferior ao PER encontrado na literatura para a caseína, quando determinado com ratos de 21 dias de idade, utilizando dieta com 10% de caseína. Tanto a idade como a concentração de proteínas na dieta influenciam no valor de PER. Este índice diminui com a idade do rato e com o aumento da concentração de proteína, acima do nível de manutenção do rato, que é de aproximadamente 6% na dieta (SGARBIERI, 1996).

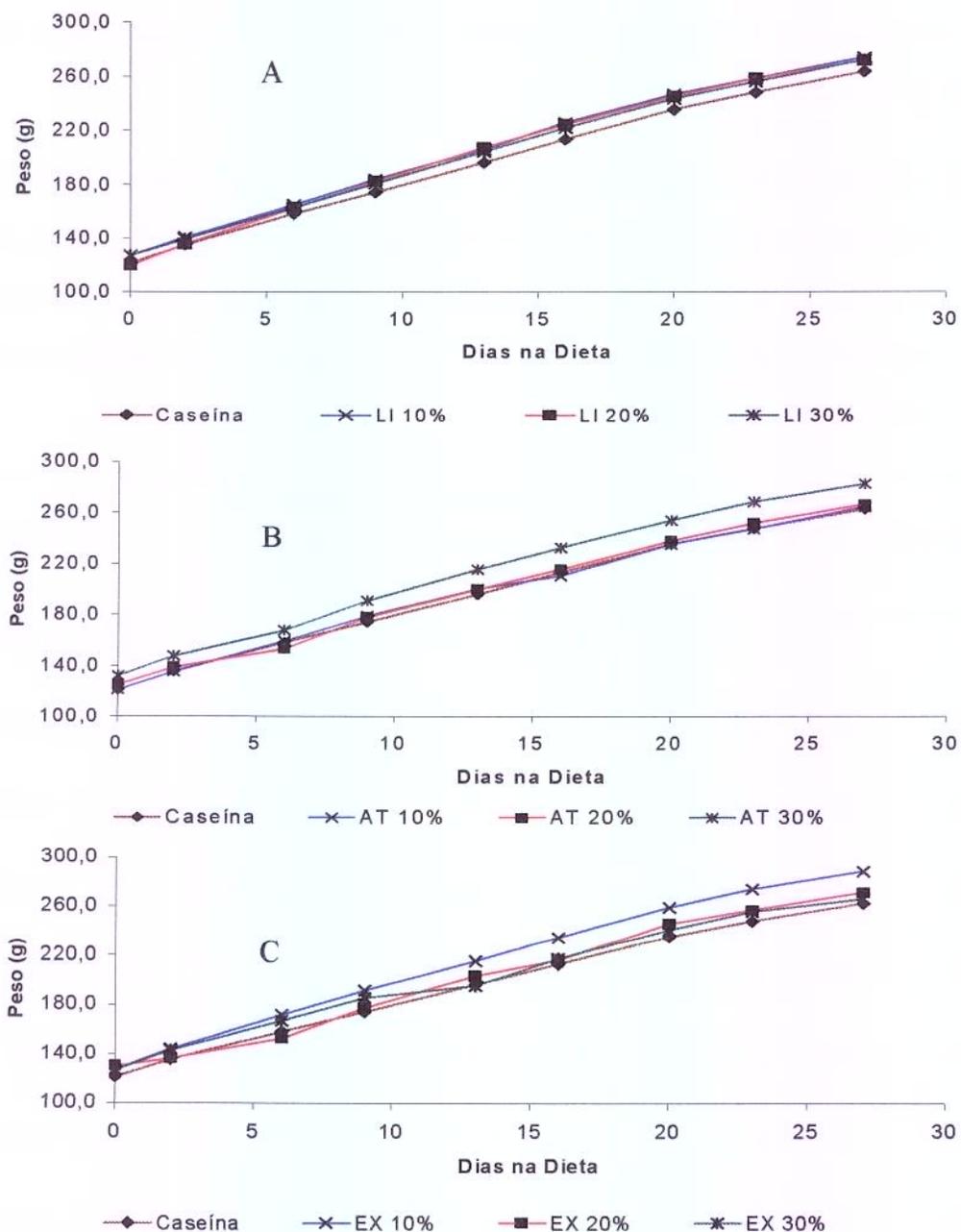
A Figura 2 (A, B, C) mostra a evolução ponderal, no período de 4 semanas, para dietas com 10, 20 ou 30% de substituição da dieta padrão de caseína, por misturas contendo aproximadamente 4, 8 ou 12% de produtos de levedura. É interessante notar que, apesar da não-significância estatística, as dietas contendo levedura, ou seus derivados, produziram crescimento ligeiramente maior que a dieta padrão de caseína. Essa diferença foi notada particularmente nas dietas contendo o autolisado ou o extrato de levedura, e essa diferença mostrou tendência de aumentar, com o aumento da introdução dos derivados de levedura na dieta. Como a dieta padrão utilizada neste experimento é uma dieta nutricionalmente completa, indicada para ratos em crescimento, era de se esperar que houvesse uma perda de eficiência da dieta padrão, com o aumento de introdução de produtos de levedura, em substituição à dieta padrão. O comportamento inverso observado, ou seja, o relativo aumento de eficiência da dieta com a substituição, sugere a existência de ação de um

ou mais componentes funcionais específicos, particularmente no autolisado total e no extrato de levedura.

**Tabela 2.** Consumo de dieta, ingestão de proteína e variação de peso em ratos submetidos às dietas de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10, 20 e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.

<b>Tratamento*</b>	<b>Dieta ingerida (g)</b>	<b>Proteína Ingerida (g)</b>	<b>Ganho de Peso (g)</b>	<b>Per<sub>op</sub> (28 dias)</b>
CAS	474,1 ± 39,4	94,8 ± 7,9	141,7 ± 8,1	1,5 ± 0,08
LI 10%	498,5 ± 37,6	99,7 ± 7,5	151,2 ± 12,2	1,5 ± 0,05
LI 20%	484,4 ± 47,6	96,9 ± 9,5	146,2 ± 10,6	1,5 ± 0,06
LI 30%	485,7 ± 41,3	97,2 ± 8,3	144,4 ± 16,8	1,5 ± 0,11
AT 10%	488,6 ± 34,7	97,7 ± 6,9	143,6 ± 15,6	1,5 ± 0,10
AT 20%	486,8 ± 18,2	97,4 ± 3,6	141,5 ± 4,9	1,5 ± 0,08
AT 30%	507,5 ± 51,4	101,5 ± 10,3	151,0 ± 13,5	1,5 ± 0,06
EX 10%	525,4 ± 46,4	105,1 ± 9,3	161,5 ± 20,1	1,5 ± 0,06
EX 20%	482,2 ± 60,1	96,4 ± 12,0	141,6 ± 18,1	1,5 ± 0,07
EX 30%	484,8 ± 52,9	97,0 ± 10,6	139,7 ± 18,1	1,4 ± 0,12

CAS = Dieta de caseína; LI = Levedura integral; AT = Autolisado total; Ex = Extrato; Per<sub>op</sub> = Quociente de Eficiência Protéica operacional. \*Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 2 A, B, C.** Curvas de crescimento para ratos recém desmamados, mantidos em dieta-padrão (CAS 20%) e dietas em que 10, 20 ou 30% da dieta de caseína foi substituída por misturas (amido de milho + produto de levedura + óleo de soja) contendo, respectivamente, 4, 8, ou 12% de produto de levedura. **A)** dieta-padrão e dietas substituídas contendo células íntegras de levedura; **B)** dieta padrão e dietas contendo autolisado total de levedura; **C)** padrão de caseína e dietas contendo extrato de levedura. As substituições foram feitas mantendo as dietas isoprotéicas e isocalóricas.

Uma série de investigações têm demonstrado que componentes da levedura como nucleotídeos e derivados (VAN BUREN et alii, 1983; VAN BUREN et alii, 1985; BURMEITER & RAINSFORD, 1991; NAIR & USSERY, 1992), polissacarídeos e oligossacarídeos (CHERNYSHEVA et alii, 1991; CRITTENDEN & PLAYNE, 1996; GOLDMAN & JAFFE, 1991) e peptídios bioativos (MILLS et alii, 1992), exercem ações fisiológicas muito importantes no organismo. Substâncias como nucleotídios e oligossacarídeos atuam como moduladores do sistema imunológico, estimulando o funcionamento tanto de células B como de células T, e neste sentido, aumenta a resistência dos organismos às infecções causadas por bactérias e vírus. Os oligossacarídeos podem funcionar como prebióticos inibindo, no intestino, o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Escherichia coli* e, ao mesmo tempo, estimulando o desenvolvimento de bactérias lácticas e bactérias bífidas que são benéficas ao organismo. Os nucleotídeos da dieta podem ainda acelerar a síntese de DNA nas células, auxiliando na recuperação de tecidos e no crescimento, principalmente em condições de estresse fisiológico (CARVER & WALKER, 1995; NUNES et alii, 1990). Um grande número de peptídios, originados na hidrólise das proteínas dos alimentos, apresentam atividades funcionais como imunoestimuladora, hipotensora, opióide, inibidora de bactérias patogênicas e facilitadora da absorção de certos nutrientes (MILLS et alii, 1992). Os autolisados e extratos de levedura contêm esses princípios ativos, em elevada concentração, portanto, é legítimo pensar que a ação combinada dos nucleotídeos, oligossacarídeos e peptídios ativos do autolisado e do extrato de levedura produziram um efeito sinérgico positivo e benéfico, ao se substituir parte da dieta padrão por esses produtos. Como o maior nível de substituição (30%) da dieta padrão, com cerca de 12% de sólidos de levedura, produziu o melhor efeito de crescimento, é de se supor que concentrações maiores poderiam produzir efeitos ainda mais positivos. Portanto, o efeito positivo observado na substituição de uma

dieta balanceada, para o rato em crescimento, por derivados de levedura, mantendo-se a dieta modificada isoprotéica e isocalórica, deverá ser melhor estudada, para se determinar o nível de introdução de derivados de levedura capaz de produzir os melhores efeitos.

Os resultados das determinações dos níveis séricos de ácido úrico, após 15, 31 e 50 dias na dieta, são mostrados na Tabela 3. Verifica-se que após 15 dias não houve diferença estatística para ácido úrico, entre os tratamentos, exceto para o Ex a 20% de substituição, que foi cerca de 3 vezes maior que para os demais tratamentos, sugerindo a possibilidade de erro experimental. Após 31 e 50 dias na dieta, apesar de ter havido diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre alguns tratamentos, os valores ficaram muito próximos dos encontrados para as dietas de caseína. Se for tomada como referência a faixa de variação, 1,2 - 7,5 mg/dL, reportada para rato normal (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), conclui-se que os resultados encontrados neste trabalho estão todos dentro da faixa de normalidade.

Os níveis séricos de uréia são apresentados na Tabela 4. Da mesma forma que para o ácido úrico, apenas em alguns casos foi constatada variação estatística, entre os tratamentos, para os níveis de uréia sangüínea. De um modo geral, as dietas contendo levedura não diferiram da dieta padrão de caseína, com exceção da dieta com 30% de substituição (~ 12% de Ex) após 15 dias, com uma elevação de 40% em relação à caseína. Após 50 dias de tratamento, somente duas dietas (AT 30% e Ex 20%) apresentaram valores estatísticos diferentes, porém inferiores aos da caseína. Ao se observar os valores nos três intervalos de tempo (15, 31 e 50 dias), nota-se que após 15 dias nas dietas os valores absolutos de todos os tratamentos foram, em média, superiores aos da caseína, ao passo que depois de 31 e 50 dias os

valores foram, em geral, mais baixos que os da caseína, sugerindo ter havido uma adaptação metabólica dos animais que receberam dietas contendo levedura.

**Tabela 3.** Resultados dos níveis séricos de ácido úrico em ratos Wistar após serem alimentados, durante 15, 31 e 50 dias, com dieta padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.

Tratamentos	Concentrações (mg/dL)		
	15 dias	31 dias	50 dias
CAS	1,68 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,30 <sup>bcd</sup>	1,83 ± 0,42 <sup>cd</sup>
LI 10%	2,03 ± 0,47 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,26 <sup>ab</sup>	1,84 ± 0,47 <sup>cd</sup>
LI 20%	1,68 ± 0,31 <sup>b</sup>	1,65 ± 0,16 <sup>bcd</sup>	5,59 ± 0,71 <sup>a</sup>
LI 30%	1,85 ± 0,33 <sup>b</sup>	2,31 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,61 ± 0,19 <sup>cd</sup>
AT 10%	1,59 ± 0,23 <sup>b</sup>	2,07 ± 0,48 <sup>ab</sup>	1,35 ± 0,19 <sup>d</sup>
AT 20%	1,58 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,73 ± 0,16 <sup>bcd</sup>	1,89 ± 0,47 <sup>cd</sup>
AT 30%	1,61 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,39 ± 0,81 <sup>d</sup>	2,35 ± 0,69 <sup>bc</sup>
EX 10%	1,62 ± 0,23 <sup>b</sup>	2,02 ± 0,32 <sup>abc</sup>	2,93 ± 0,26 <sup>b</sup>
EX 20%	5,90 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,27 <sup>cd</sup>	1,98 ± 0,14 <sup>cd</sup>
EX 30%	1,59 ± 0,31 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,13 <sup>d</sup>	2,00 ± 0,02 <sup>cd</sup>

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

CAS = Dieta de caseína; LI = Levedura integral; AT = Autolisado total; Ex = Extrato.

**Tabela 4.** Resultados dos níveis séricos de uréia em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias, à dieta padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isotrópicas e isocalóricas.

Tratamentos	Concentrações (mg/dL)		
	15 dias	31 dias	50 dias
CAS	33,32 ± 5,31 <sup>bc</sup>	52,47 ± 2,78 <sup>a</sup>	46,09 ± 7,57 <sup>a</sup>
LI 10%	39,24 ± 9,27 <sup>abc</sup>	50,68 ± 7,24 <sup>a</sup>	43,95 ± 2,67 <sup>ab</sup>
LI 20%	35,51 ± 6,20 <sup>abc</sup>	50,45 ± 6,36 <sup>a</sup>	45,57 ± 2,55 <sup>a</sup>
LI 30%	43,17 ± 4,60 <sup>ab</sup>	47,85 ± 3,96 <sup>a</sup>	40,67 ± 2,25 <sup>abc</sup>
AT 10%	34,52 ± 7,09 <sup>bc</sup>	49,81 ± 7,28 <sup>a</sup>	40,28 ± 2,01 <sup>abc</sup>
AT 20%	40,22 ± 7,33 <sup>abc</sup>	45,66 ± 7,91 <sup>a</sup>	40,75 ± 2,44 <sup>abc</sup>
AT 30%	29,64 ± 1,58 <sup>c</sup>	51,76 ± 3,84 <sup>a</sup>	35,58 ± 2,56 <sup>c</sup>
EX 10%	43,63 ± 6,20 <sup>ab</sup>	49,76 ± 5,43 <sup>a</sup>	41,19 ± 2,55 <sup>abc</sup>
EX 20%	44,21 ± 3,06 <sup>ab</sup>	50,41 ± 3,36 <sup>a</sup>	37,16 ± 6,83 <sup>bc</sup>
EX 30%	48,20 ± 11,79 <sup>a</sup>	42,23 ± 10,10 <sup>a</sup>	40,92 ± 2,74 <sup>abc</sup>

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes (colunas) indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamentos. CAS = Dieta de caseína; LI = Levedura integral; AT = Autolisado total; Ex = Extrato.

Os níveis séricos de atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) são apresentados na Tabela 5 e na Tabela 6, respectivamente.

**Tabela 5.** Resultados dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias, a uma dieta padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.

Tratamentos	Concentrações (mg/dL)		
	15 dias	31 dias	50 dias
CAS	112,85 ± 11,96 <sup>ab</sup>	106,36 ± 17,99 <sup>a</sup>	127,93 ± 9,07 <sup>ab</sup>
LI 10%	83,38 ± 16,08 <sup>bc</sup>	114,93 ± 2,44 <sup>a</sup>	139,01 ± 9,68 <sup>a</sup>
LI 20%	74,22 ± 10,06 <sup>c</sup>	103,12 ± 11,08 <sup>a</sup>	138,76 ± 11,03 <sup>ab</sup>
LI 30%	97,00 ± 19,36 <sup>abc</sup>	116,47 ± 22,83 <sup>a</sup>	132,23 ± 15,53 <sup>ab</sup>
AT 10%	89,65 ± 19,26 <sup>abc</sup>	102,64 ± 19,78 <sup>a</sup>	120,82 ± 9,16 <sup>b</sup>
AT 20%	119,24 ± 22,98 <sup>a</sup>	93,80 ± 15,25 <sup>a</sup>	141,40 ± 9,60 <sup>a</sup>
AT 30%	82,74 ± 14,49 <sup>bc</sup>	106,95 ± 6,96 <sup>a</sup>	142,56 ± 9,21 <sup>a</sup>
EX 10%	86,78 ± 11,36 <sup>abc</sup>	102,32 ± 14,96 <sup>a</sup>	142,56 ± 2,00 <sup>a</sup>
EX 20%	93,38 ± 21,05 <sup>abc</sup>	103,70 ± 12,25 <sup>a</sup>	131,07 ± 8,45 <sup>ab</sup>
EX 30%	89,87 ± 7,23 <sup>abc</sup>	95,93 ± 18,96 <sup>a</sup>	131,89 ± 4,58 <sup>ab</sup>

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

CAS = Dieta de caseína; LI = Levedura integral; AT = Autolisado total; Ex = Extrato.

**Tabela 6.** Resultados dos níveis séricos de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) em ratos Wistar submetidos, durante 15, 31 e 50 dias, à dieta padrão de caseína (20% de proteína) e dietas em que 10%, 20% e 30% da dieta padrão foi substituída por misturas (amido de milho + derivado de levedura + óleo) de forma tal que permanecessem isoprotéicas e isocalóricas.

Tratamentos	Concentrações (mg/dL)		
	15 dias	31 dias	50 dias
CAS	36,31 ± 4,76 <sup>bc</sup>	58,91 ± 14,64 <sup>a</sup>	38,89 ± 7,73 <sup>c</sup>
LI 10%	40,75 ± 10,07 <sup>bc</sup>	49,50 ± 5,34 <sup>a</sup>	42,30 ± 2,86 <sup>abc</sup>
LI 20%	26,51 ± 6,48 <sup>cd</sup>	47,87 ± 8,02 <sup>a</sup>	46,79 ± 3,83 <sup>abc</sup>
LI 30%	35,49 ± 1,55 <sup>bc</sup>	55,19 ± 8,73 <sup>a</sup>	45,21 ± 7,83 <sup>abc</sup>
AT 10%	18,93 ± 4,31 <sup>d</sup>	51,79 ± 8,57 <sup>a</sup>	39,59 ± 1,53 <sup>bc</sup>
AT 20%	75,24 ± 18,72 <sup>a</sup>	45,32 ± 3,48 <sup>a</sup>	51,59 ± 2,87 <sup>a</sup>
AT 30%	44,54 ± 7,67 <sup>b</sup>	46,24 ± 10,78 <sup>a</sup>	49,19 ± 3,92 <sup>a</sup>
EX 10%	35,88 ± 1,77 <sup>bc</sup>	45,65 ± 4,35 <sup>a</sup>	48,24 ± 7,33 <sup>ab</sup>
EX 20%	38,14 ± 4,05 <sup>bc</sup>	45,65 ± 3,30 <sup>a</sup>	42,30 ± 3,50 <sup>abc</sup>
EX 30%	45,32 ± 6,31 <sup>b</sup>	46,92 ± 7,92 <sup>a</sup>	47,93 ± 1,39 <sup>abc</sup>

a, b, c, d Letras diferentes (colunas) indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamentos.

CAS = Dieta de caseína; LI = Levedura integral; AT = Autolisado total; Ex = Extrato.

Após 15 dias nas dietas, os níveis de atividade de TGO não revelaram nenhum valor estatisticamente superior ao da caseína. A única dieta que apresentou diferença estatística em relação à caseína foi LI 20%, aproximadamente 34% inferior. Diferenças estatísticas ocorreram entre alguns tratamentos com produtos de levedura nas dietas. De um modo geral, houve um aumento na atividade de TGO em função tempo. Níveis maiores de atividades foram registrados após 50 dias nas dietas, não tendo, entretanto, sido registradas diferenças entre tratamentos.

Com relação à TGP, os resultados (Tabela 6), seguiram tendência muito semelhante à TGO. Após 15 dias na dieta, dois resultados diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) da caseína, AT 20% que foi praticamente o dobro da caseína e AT 10% que foi inferior à caseína. Todos os demais resultados não diferiram estatisticamente da caseína. Após 31 dias não se registrou diferença estatística entre os tratamentos. Após 50 dias, apenas os resultados das dietas AT 20%, AT 30% e Ex 10% foram estatisticamente superiores ao da caseína. Os demais resultados não diferiram da caseína.

De acordo com LIMA et alii (1985), a TGP ocorre nos hepatócitos em concentrações mais elevadas que a TGO. Portanto, a atividade de TGP no soro sanguíneo poderá ter maior significado clínico que a TGO, como diagnóstico de lesão hepática.

Como os valores de atividade sérica para TGO e TGP em todos os tratamentos que receberam produtos de levedura na dieta, quando avaliados estatisticamente, não ultrapassaram o valor encontrado para a dieta padrão de caseína, conclui-se não ter havido injúria do tecido hepático, nos animais que

receberam dietas com produtos de levedura. Da mesma forma, como os níveis séricos de uréia nas dietas experimentais não ultrapassaram os níveis registrados para a dieta padrão de caseína, conclui-se que a presença de produtos de levedura nas dietas experimentais não deve ter afetado a função renal.

#### 4.4. Conclusões

Substituição da dieta padrão AIN-93G, nos níveis de 10, 20 e 30%, por uma mistura isoprotéica e isocalórica, contendo respectivamente 4, 8 e 12% de produtos de levedura, não afetou a ingestão de dieta, o ganho de peso e o ganho de peso por unidade de proteína ingerida ( $PER_{op}$ ). Embora não tenha havido diferença estatística, os animais em dietas com autolisado total ou extrato de levedura, evidenciaram uma tendência de maior ganho de peso. Quando se faz a avaliação estatística dos resultados das análises de sangue, observa-se que embora tenha-se registrado algumas variações nos índices séricos de ácido úrico, uréia e atividade das transaminases (TGO e TGP) entre alguns tratamentos contendo produtos de levedura, esses índices foram iguais ou inferiores aos encontrados para a dieta padrão de caseína, permitindo concluir não ter havido lesões hepáticas e/ou renais em virtude da ingestão de dietas contendo produtos de levedura.

## 4.5.Referências bibliográficas

- ALIAN, A.; EL-AKHER, M.A.; ABDOU, I.; AID, N. Enrichment of local bread with dried brewery yeast. I. Chemical and biological evaluation of dried brewery yeast and flour. **Egyptian Journal of Food Science**, Cayro, v.11, n.1/2, p.23-29, 1983a.
- ALIAN, A.; EL-AKHER, M.A.; ABDOU, I.; AID, N. Enrichment of local bread with dried brewery yeast. II. Physical properties of dough and biological and sensory evaluation of bread. **Egyptian Journal of Food Science**, Cayro, v.11, n.1/2, p.31-38, 1983b.
- ANON. Autolyzed yeast enhance flavours in low sodium foods. **Food Development**, Chicago, v.15, n.9, p.52, 1981.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**, 15<sup>th</sup> edition, Arlington, 1990.
- ASP, N.; JOHANSSON, C.G.; HALMER, H.; SILJESTRÖM, M. A rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.31, n.3, p.476-482, 1983.
- BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

- BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Food Science and Technology International**, London, v.3, n.6, p.437-444, 1997.
- 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.
- BOSTIAN, M.; SMITH, N.; GILLIARD, S.E.; STEWART, C.F. Snack foods provide natural target for supplementation with yeast-whey protein. **Food Product Development**, Chicago, v.12, n.9, p.68-70, 1978
- BURMEITER, G.; RAINSFORD, K.D. Discriminating effects of a nucleotide-rich extract probioticum, as an immunomodulator contrasted with actions in chronic immuno-inflammatory disease (adjuvant-induced arthritis) in rodents. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v.1, p.161-183, 1991.
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.
- CARVER, J.D.; WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.6, n.2, p.58-72, 1995.

- CHERNYSHEVA, N.M.; KAPLAN, V.P.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; BABAYAN, T.L.; LEPEKHINA, L.A. The stimulatory granulocyte-macrophage graftment and the radioprotective effect of yeast mannan. **Radiobiologiya**, Moscow, v.31, n.3, p.381-386, 1991.
- CHING-MING, L.J.; CHASTAIN, M.F.; STRENGTH, D.R. Sensory and nutritional evaluation of wheat bread supplement with single cell protein from *Torula yeast (Candida utilis)*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, p.647, 1986.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production properties and applications of food grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.7, n.77, p.353-361, 1996.
- DZIEZAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.104-121, 1987.
- GOLDMAN, R.; JAFFE, C.L. Administration of  $\beta$ -glucan following *Leishmania* major infection suppresses disease progression in mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v.13, n.2, p.137-146, 1991.
- GUZMÁN-JUAREZ, M. **Development in food proteins**. In: Hudson, B.J.F. (Ed.). Applied Science Publishers, London, 1983, 339p.
- HALÁSZ, A. **Biochemical principles of the use of yeast biomass in food production (in Hungarian)**, D. Sc. thesis, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, 1988.

- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. CRC Press, Boca Raton, 1991, 312p.
- HEBERT, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGER, R.E. Chemical analysis of microbial cells. In: Noris, J.R. & Ribbors, P.W. (Eds.), **Methods of Enzymology**, Academic Press, London, 1971, V5B, 695p.
- JUNILLA, M.; KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIVISTOINEN, P. Functional properties of brewer's grain, brewer's yeast and distillers stillage in food systems. II. Application to sausages and meat balls. **Fleischwirtschaft**, v.6, n.7, p.1024-1049, 1981.
- KAMEL, B.; KRAMER, A.; SHEPHARD, A.J.; NEUKIRK, D.R. Amino acid, fatty acid, cholesterol and other sterols analysis of different pizza formulations. **Journal of Food Quality**, Wastport, v.2, n.2, p.123-133, 1979.
- KOLLAR, R.; STURD, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, p. 225-237, 1992.
- LÁSZTITY, R. **Cryobiological aspects of long term storage of meats and changes of their quality**. In: Cryobiology Freeze-Drying. Proceedings of the Third National School in Cryobiology of Freeze-Drying. Tsvetkov, T. (Ed.), Central Problem Laboratory of Cryobiology and Freeze-Drying, Sofia, 1987, 199p.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZAI, J.; CANCADO, J.R.  
**Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretações**, 6<sup>a</sup>  
Edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1985, 699p.

McCORMICK, R.D. Improved flour and nutritional enhancement for pasta products. **Food Product Development**, Chicago, v.9, n.6, p.11-12, 1975.

MILLS, E.N.C.; ALCOGER, M.J.C.; MORGAN, M.R.A. Biochemical interaction of food derived peptides. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.3, n.21, p.64-68, 1992.

MITRUKA, M.B.; RAWNSLEY, H.M. **Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**, 2<sup>nd</sup> ed., New York, Masson Publishing Inc., 314p.

NAIR, V.; USSERY, M.A. New hypoxanthine nucleosides with RNA antiviral activity. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.19, n.2, p.173-178, 1992.

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

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. (A Committee Report). AIND-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on the reformulation of the AIN-76 a rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.2, p.467-472, 1993.

SCHMIDT, G. Bubbling over with yeast. **Food, Flavouring, Ingredients, Packaging and Processing**, London, v.9, n.5, p.25,27,29-30, 1987.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1,2, p.119-125, 1999.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradações, modificações**, Livraria Varela Editora, São Paulo, 1996, 517p, Cap. IV, p.374.

SHACKELFORD, J.R.; MURRAY, D.G. Studies show no shelf life losses from using food yeasts in products. **Food Product Development**, Chicago, v.14, n.9, p.40-42, 1980.

SOMMER, R.A. Yeast autolysates as flavor enhancers in prepared meals and meat products. **Lebensmitteltechnik**, v.15, n.5, p.229-230, 1983.

STEWART, C.F.; GILLIAND, S.E. Utilizing yeast-whey protein to improve the nutritional value of snack foods. **American Dairy Review**, Manufactured Milk Products Supplement, 30A, 1979.

VAN BUREN, C.T.; KULKARNI, A.D.; FANSLOW, W.C.; RUDOLPH, F.R. Dietary nucleotides, a requirement for helper/inducer T lymphocytes. **Transplant**, v.40, n.6, p.694-697, 1985.

VAN BUREN, C.T.; KULKARNI, A.D.; SCHANDLE, V.B.; RUDOLPH, F.R.

The influence of dietary nucleotides on cell-mediated immunity. **Transplant**, v.36, n.3, p.350-352,1983.

## CAPÍTULO 5

### PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA LEVEDURA INTEGRAL, DO AUTOLISADO TOTAL E DO EXTRATO DE LEVEDURA (*Saccharomyces* sp.)

#### RESUMO

Uma vez que os derivados de levedura são utilizados como aditivos em alimentos, julgou-se necessário prosseguir com uma avaliação de suas qualificações quanto às propriedades funcionais. O processamento da levedura alterou a solubilidade da proteína de forma diferenciada, tendo ocorrido uma queda de aproximadamente 17% na solubilidade do autolisado e um acréscimo de aproximadamente 33% na solubilidade da proteína do extrato, quando comparados com a levedura integral. Para absorção espontânea de óleo, o único produto que apresentou valores inferiores à farinha de soja desengordurada foi o autolisado. Houve uma diminuição considerável na absorção espontânea de óleo com o processo de produção do autolisado e extrato, que apresentaram redução de 59% e de 43%, respectivamente, em relação às células íntegras. A absorção espontânea de água se apresentou inferior para os três produtos de levedura quando comparados com a farinha de soja desengordurada, sendo que se percebe uma queda na capacidade de absorver água à medida em que se intensifica o processamento, a saber :  $Ex < AT < LI$ . O processamento provocou um aumento considerável na capacidade de retenção de água (aproximadamente 43% para o autolisado) em relação à levedura íntegra (LI) e valores nulos para a retenção de água do extrato. Os derivados de levedura não apresentaram poder emulsificante quando utilizados

como único agente emulsificante, porém, quando usados em sistemas contendo emulsificante, como por exemplo uma solução à 0,2% de ovalbumina, foi possível observar um aumento de 2,4 vezes na capacidade emulsificante desta solução em presença do autolisado e 1,7 vezes pela adição de extrato de levedura.

## 5.1. Introdução

A funcionalidade de uma proteína está relacionada com as características físico-químicas mais relevantes da mesma, e que exercem grande influência nos processos de elaboração, estocagem, qualidade e aceitação de um alimento como produto final (CHOU & MORR, 1979).

No uso da levedura e seus derivados em indústrias de alimentos para produção de sopas desidratadas e produtos cárneos, KOLLAR et alii (1992), ressalta a importância de propriedades funcionais específicas para estes produtos, a saber: solubilidade, absorção de água e óleo, retenção de água e capacidade emulsificante.

A solubilidade dos ingredientes de um alimento como sopa é muito importante, uma vez que poderá influenciar no sabor e textura do alimento. As proteínas de células isoladas de levedura possuem baixa solubilidade quando comparadas a outras proteínas vegetais como a soja, principalmente a valores de pH mais comuns nos alimentos (SCHACHTEL, 1981b).

De acordo com De KANTEREWICZ et alii (1989), a capacidade de absorção de óleo tem grande importância na formulação de alimentos, podendo influenciar na ordem de adição dos ingredientes secos na mistura, além de ser usado para determinar os tempos de mistura de forma a se obter uma distribuição uniforme do óleo ou gordura na mistura seca. OTERO et alii (1996), observaram que a capacidade de absorver óleo do concentrado protéico de levedura foi aproximadamente 3 vezes o valor da absorção de óleo do isolado protéico de soja.

A absorção de água de um componente do alimento determina não somente a aceitabilidade do produto final em termos de textura e suculência mas também a sua margem de lucro. Estes índices são essenciais em alimentos como a gelatina, onde se obtém um produto com aproximadamente 95% de água (HALL, 1996). De acordo com KINSELLA (1976), a capacidade de retenção de água é de grande utilidade na fabricação de produtos cárneos, onde impedem a perda de água no processo de cozimento, em produtos de panificação e em alimentos viscosos como sopas. De acordo com NAGODAWITHANA (1992), os nucleotídeos obtidos do RNA de levedura são atualmente empregados como flavorizantes com sabor à carne ou queijo em indústrias de alimentos, o que indica a necessidade de avaliação da absorção de água.

A capacidade de uma proteína em formar e estabilizar uma emulsão é fator crítico para a produção de carnes moídas, massas para bolo, cremes para café, maioneses, molhos para saladas e sobremesas congeladas. MARQUES et alii (1998), ao citar Robbins & Selley (1978), afirma que o uso da glicana de levedura como emulsificante se destaca por ser de origem biológica, além de poder ser obtida de um subproduto de fabricação de cerveja. LEE (1996), ao avaliar a glicana, extraída de uma fração da parede celular de levedura, diz que a mesma poderá ser utilizada como emulsificante, estabilizante ou texturizante, além de ser útil na formulação de alimentos com baixo teor de gordura e baixas calorias.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as possibilidades do uso da levedura e seus derivados como agente funcional com o intuito de proporcionar melhores características ao alimento.

## 5.2. Material e Métodos

**Material.** Utilizou-se a levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente de cervejarias, gentilmente cedida pela Prodesa – Produtos Especiais para Alimentos, continha aproximadamente 20% de sólidos em suspensão.

### **Métodos.**

**Desamargamento:** A suspensão de células foi, a princípio, submetida à centrifugação para eliminar o excesso de água e um posterior tratamento com solução alcalina (0,2% NaOH, 1:1 p/v), sendo em seguida, lavada com água para eliminar o excesso de hidróxido de sódio. Esta biomassa resultante foi chamada de biomassa limpa e desamargada (SGARBIERI et alii, 1999).

**Processamento da Biomassa Limpa e Desamargada:** A biomassa foi autolisada (24h, 55°C, suspensão com 20% de células) em fermentador Newbrunswick de 250L, seguindo-se a pasteurização e centrifugação. Parte do pasteurizado, ainda não centrifugado, foi seco em spray dryer e denominado autolisado (AT). Após a centrifugação foram obtidas as frações solúvel e insolúvel, chamadas extrato bruto e parede celular, respectivamente. O extrato bruto foi submetido à clarificação (centrifugação), concentração (vácuo) e desidratação em spray dryer, sendo denominado extrato (Ex). Parte da biomassa limpa e desamargada (antes da autólise) foi submetida a uma secagem em spray dryer, para obtenção de levedura íntegra desidratada (LI).

**Composição centesimal.** Os teores de proteína (N x 5,8), de umidade e de cinzas foram determinados seguindo os procedimentos descritos no AOAC (1990); lipídios totais, pelo método de BLIGH & DYER (1959); fibra alimentar (solúvel e insolúvel), pelo método de ASP et alii (1983); ácido nucleico (RNA) foi determinado pelo método de HEBERT et alii. (1971).

**Nitrogênio Solúvel (NS):** Foi determinado conforme método de MORR et alii (1985), que é uma modificação do procedimento do índice de solubilidade de nitrogênio. Foi avaliada variando-se o pH de uma solução a 1% de proteína (pH's = 3,0; 6,0 e 9,0), a qual foi determinada utilizando-se água como solvente e uma temperatura de 30°C. A porcentagem de proteína solúvel (P.S.) foi determinada por:

$$PS = \frac{\text{concentração da proteína do filtrado (mg/mL)} \times 50 \times 100}{\text{peso da amostra} \times \frac{\text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}}{100}}$$

**Retenção de Água (CRA):** Thomas et alii (1974), citados por HALL (1996), utilizaram este método para análise de proteínas de soja, o qual consiste em se adicionar um excesso de água em uma determinada massa de amostra, deixar a mistura em descanso e, após centrifugação, medir a quantidade de água que restou da mistura (sobrenadante). A capacidade de retenção de água (CRA) será fornecida em mL de água retida por g de amostra.

$$CRA = \frac{\text{Vol. H}_2\text{O adicionado (mL)} - \text{vol. de solução sobrenadante (mL)} \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

**Capacidade de Absorção Espontânea de Água (CAA):** O método utilizado foi empregado por TORGENSEN & TOLEDO (1977), o qual consiste em um aparelho com um funil conectado a uma pipeta graduada (Figura 2). Uma massa conhecida de amostra é espalhada sobre um papel de filtro Whatman nº1, úmido, colocado no topo do funil de Büchner, com água ao nível da placa perfurada. O ensaio foi conduzido à temperatura do ambiente, sendo que as leituras de água absorvida foram feitas em intervalos de 20 segundos, totalizando um tempo de 1800s. O resultado obtido foi expresso em mL de água absorvida por g de amostra:

$$CAA = \frac{\text{volume de água absorvida (mL)}}{\text{massa de amostra (g)}}$$

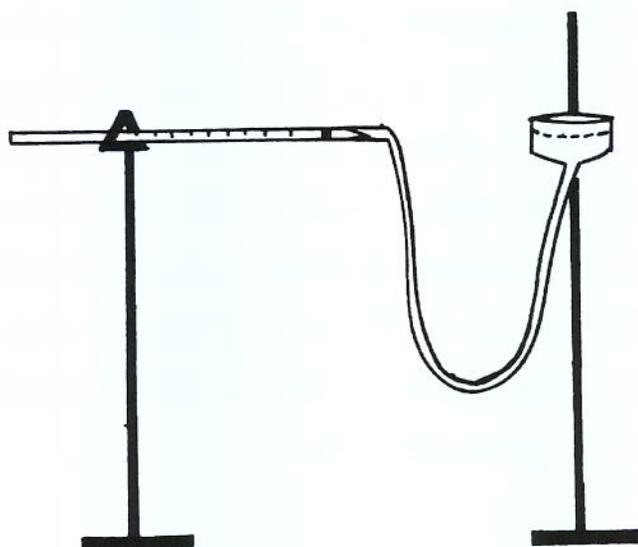
**Capacidade de Absorção Espontânea de Óleo (CAO):** Utilizou-se o método sugerido por De KANTEREWICZ et alii (1989) que consiste na utilização do mesmo equipamento usado para a análise da absorção espontânea de água (Figura 2), no qual substitui-se apenas o tipo de papel de filtro, que passa a ser o Whatman com microfibras de vidro GF/C, agora umedecido com óleo. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente, sendo que as leituras do volume de óleo absorvido foram feitas em intervalos de 20s, totalizando um tempo de 1840s. O resultado foi expresso em mL de óleo absorvido por grama de amostra:

$$CAO = \frac{\text{volume de óleo absorvido (mL)}}{\text{massa de amostra (g)}}$$

**Capacidade Emulsificante (CE):** Feita conforme método dos autores De KANTEREWICZ et alii (1987), com algumas modificações, utilizando-se o homogeneizador ultra turrax T-25 (Junkel & Kunkel), onde preparou-se várias

combinações de óleo + solução de ovalbumina (0,2% de proteína) em que se adicionou autolisado e extrato de levedura em concentrações nas quais a proteína variou de 0,4 a 2,0% na solução de ovalbumina 0,2%. Submete-se esta mistura inicial (20 mL de solução + 40 mL de óleo) à agitação e vai-se adicionando óleo até que ocorra a quebra da emulsão, identificada com o auxílio do corante Sudão III, utilizado para tingimento de gordura. A capacidade emulsificante (CE) é dada por:

$$CE = \frac{\text{volume de óleo (mL)}}{\text{massa de proteína total (ovalbumina + amostra) (g)}}$$



**Figura 1.** Equipamento utilizado para medir a capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e capacidade de absorção espontânea de óleo (CAO).

### 5.3.Resultados e discussão

Na Tabela 1 está demonstrada a composição centesimal dos três produtos preparados. Pode-se observar que o componente de maior concentração foi a proteína para as três amostras, seguidos de fibra total para a levedura íntegra e autolisado, e cinza para o extrato e, em terceiro lugar, observa-se o teor de cinza para a levedura íntegra e autolisado e o de RNA para o extrato.

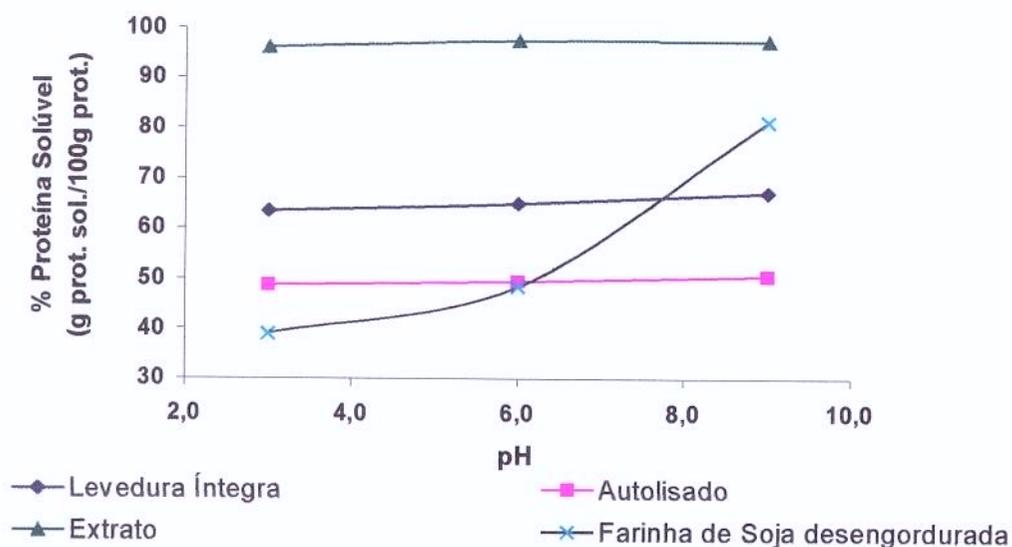
**Tabela 1.** Composição centesimal aproximada da biomassa de células íntegras de levedura, do autolisado total, e do extrato de levedura, todos em base seca.

Componente (% b.s.)	Células Íntegras (LI)	Autolisado total (AT)	Extrato (Ex)
Proteína (N x 5,8)*	48,41 ± 0,56 <sup>b</sup>	46,44 ± 0,14 <sup>c</sup>	61,88 ± 0,59 <sup>a</sup>
Lipídios totais*	3,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,02 <sup>c</sup>
Cinzas*	7,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,06 ± 0,02 <sup>c</sup>	12,31 ± 0,07 <sup>a</sup>
RNA**	5,65	7,93	6,87
Fibra total	24,40	25,03	2,70
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00
Não determinado***	10,29	10,23	15,62

\*Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão, sendo a avaliação estatística feita através do teste de Tukey; \*\* Resultados são média de 2 determinações analíticas; \*\*\*Não determinado = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + RNA + fibra total).

O teor de proteínas, de lipídios e de RNA dos três produtos estão muito próximos dos valores apresentados por BENASSI et alii (1990), após terem feito um tratamento para redução de RNA. Os valores da composição centesimal, de uma forma mais global, estão próximos dos valores citados por HALÁSZ & LASTITY (1991). Os índices de RNA apresentam-se dentro de uma faixa aceitável para uso da levedura como ingrediente funcional em alimentos, de forma que a ingestão seria bastante reduzida devido às proporções utilizadas com o objetivo de melhorar as características funcionais.

Os resultados de solubilidade são mostrados na Figura 2. Pode-se observar um aumento expressivo destes índices no extrato quando comparados com os valores da levedura integral, o que é perfeitamente compreensível, uma vez que o extrato é constituído da fração solúvel do material após ter sofrido autólise. Ao se avaliar os valores de solubilidade para o autolisado observa-se uma queda considerável (aproximadamente 17%) nos índices em relação à levedura íntegra. De acordo com CHOU & MORR (1979), os primeiros sítios de interação do sistema proteína/água são os grupos funcionais dos aminoácidos polares, onde os grupos  $-NH_2$  e  $-COOH$  são os que ligam o maior número de moléculas de água, respectivamente. Para se avaliar o resultado da solubilidade do autolisado, pode-se constatar que houve possíveis interações entre a parede celular e estes grupos provenientes das moléculas protéicas hidrolisadas que se ligam com a água, diminuindo a solubilidade até mesmo quando comparada com a levedura íntegra.



**Figura 2.** Perfil de solubilidade proteica das amostras de levedura íntegra (LI), autolisado total de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).

Ao se observar os dados de solubilidade dos produtos de levedura (AT e Ex) percebemos que não apresentam curva característica de uma proteína (com os valores do ponto isoelétrico definido) como mostrado por PACHECO (1996), que preparou isolados protéicos de levedura e observou que a solubilidade apresentava valores inferiores a 10% quando o pH se apresentava entre 2,0 e 4,0. Isto pode ser devido a uma hidrólise proteica durante a autólise.

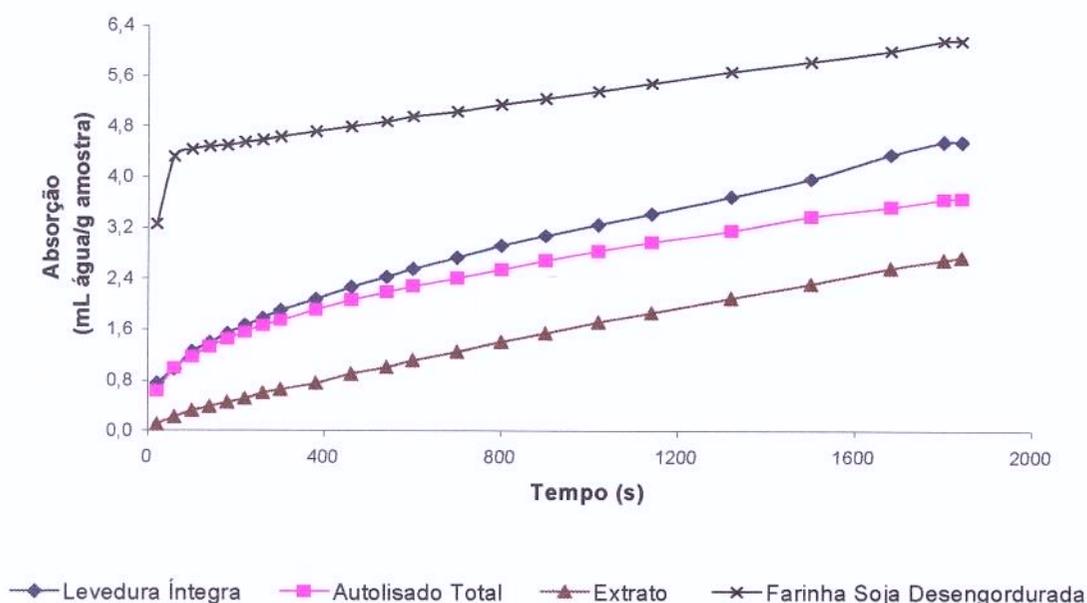
Ao se comparar a solubilidade dos produtos obtidos com o valor de solubilidade da farinha de soja desengordurada a pH 6,0 (pH da maior parte dos alimentos), observa-se que a levedura íntegra e o extrato de levedura apresentaram maior solubilidade proteica que a farinha de soja desengordurada, o que facilita o

uso dos mesmos na formulação de alimentos. A variação de pH não teve nenhuma influência na solubilidade da proteína dos três produtos de levedura.

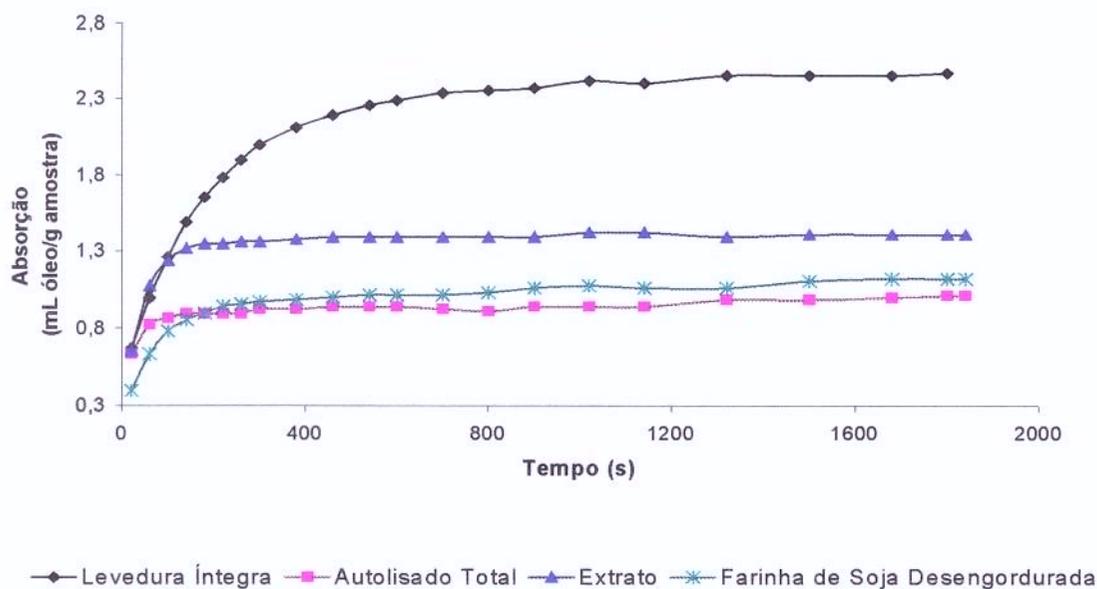
A capacidade de absorção de água é uma importante propriedade dos alimentos uma vez que a água absorvida em pequenas quantidades contribui para dar corpo e aumentar a viscosidade. Neste ensaio não se estudou os efeito do pH na absorção da água já que o objetivo foi avaliar o efeito do processamento sobre esta propriedade funcional. Todos os testes foram conduzidos no pH da amostra ( $\cong 5,8$ ).

À medida que progride o processo de autólise para obtenção do extrato, observa-se uma redução na capacidade de absorção de água (Figura 3), sendo que o extrato foi o que apresentou menor absorção de água, seguido do autolisado e da levedura íntegra. Todos os produtos de levedura apresentaram uma absorção de água menor que o da farinha de soja desengordurada. Podemos observar, como citado por CHEFTEL et alii (1989), que não existe relação entre solubilidade e capacidade de absorção de água.

Nas três curvas de absorção de água das amostras (LI > AT > Ex), observa-se um aumento lento e gradual da absorção, inicialmente mais rápida, indicando uma certa dificuldade de penetração da água no material. É provável que possa ter havido uma agregação de partículas em função da textura muito fina do material seco por “spray dryer”, cujo fenômeno poderia aumentar do extrato (Ex) para a levedura íntegra (LI).



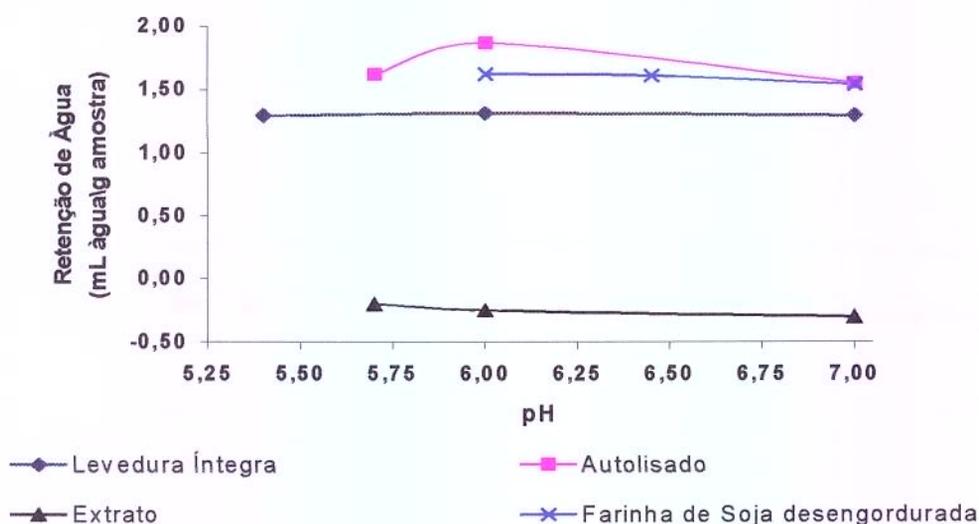
**Figura 3.** Representação gráfica da absorção de água em função do tempo para amostras de levedura íntegra (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).



**Figura 4.** Representação gráfica da absorção de óleo para as amostras: levedura íntegra (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).

Na Figura 4, pode ser observada uma redução considerável na absorção de óleo do extrato e autolisado ao se comparar com a absorção de óleo da levedura íntegra (59% e 43% do valor apresentado na levedura íntegra, respectivamente). Isto pode ter ocorrido devido a uma exposição dos grupos hidrofílicos da molécula de proteína durante o processo de autólise diminuindo a afinidade com o óleo. A redução observada no teor de absorção de óleo após o tratamento das células íntegras pode ser de grande importância para o uso da levedura em alimentos que poderão sofrer frituras, como, por exemplo, em embutidos de carnes.

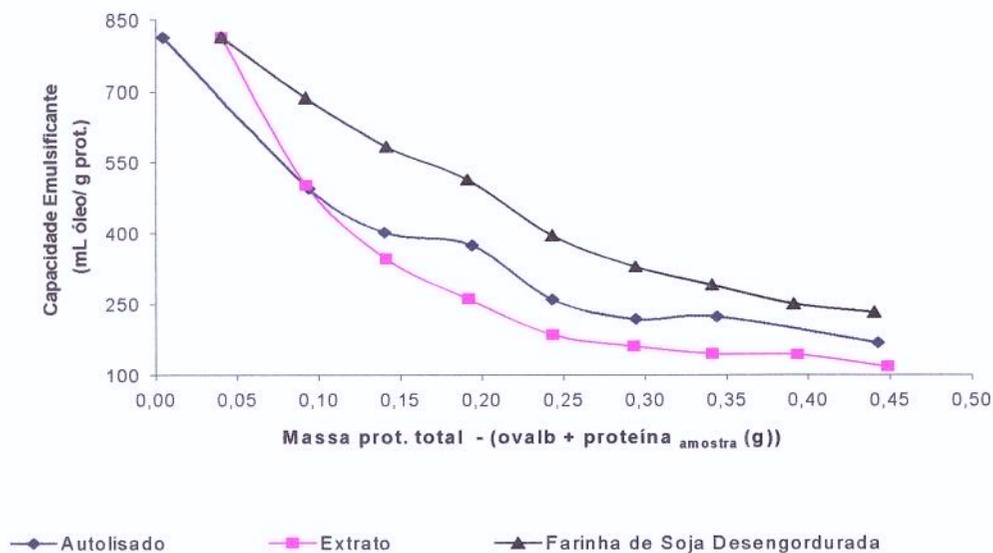
Na avaliação dos índices de retenção de água (Figura 5) observa-se um aumento considerável ( $\cong 43\%$ ) ao se comparar o autolisado com a levedura íntegra, resultado esperado, uma vez que a hidrólise ocorrida no processo de autólise pode ter exposto os grupos hidrofílicos da molécula de proteína, como explicado por CHEFTEL et alii (1989).



**Figura 5.** Perfil da capacidade de retenção de água (CRA) em função do pH para: levedura íntegra (LI), autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).

No caso da retenção de água obteve-se valores negativos para o extrato devido ao seu alto índice de solubilidade, indicando que o produto não apresenta nenhuma capacidade de reter água, ocorrendo um aumento no volume extraído de água após a centrifugação. KINSELLA (1976) observou que a retenção de água é afetada por outras propriedades como a solubilidade e a viscosidade.

A Figura 6 mostra o efeito da capacidade emulsificante da mistura (ovalbumina 0,2% + proteína de levedura). Observa-se que ao se utilizar a proteína (N x 5,8) acrescida pela adição de amostra para cálculo da capacidade emulsificante obtivemos uma curva decrescente, indicando que a proteína do autolisado e extrato, já bastante transformada, apresenta baixa capacidade emulsificante. A proteína da farinha de soja desengordurada também contribui para diminuir a capacidade emulsificante da ovalbumina.

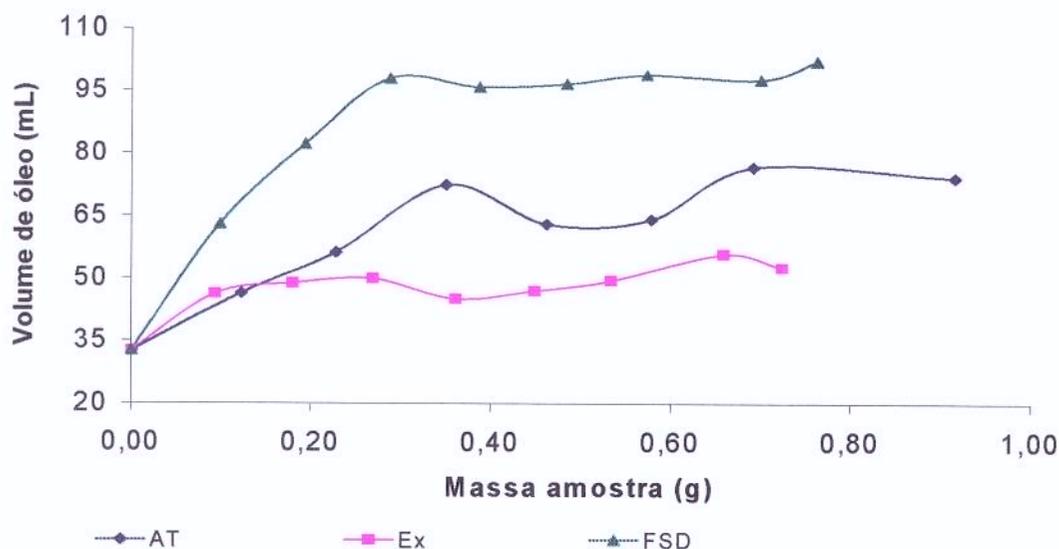


**Figura 6.** Representação gráfica da capacidade emulsificante (C.E.) da mistura de solução de ovalbumina 0,2% em concentrações crescentes de autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD).

Em virtude do grande número de variáveis para a avaliação da capacidade emulsificante, bem como da alteração da metodologia para avaliação do material como um aditivo na melhoria desta propriedade, utilizou-se a farinha de soja desengordurada (FSD) como referência.

A Figura 7 mostra a variação do volume de óleo incorporado à solução de ovalbumina 0,2% em função da adição de amostras de levedura. Observa-se que, a medida que se adiciona quantidades crescentes de amostras (AT, Ex e FSD), tem-se um aumento do volume de óleo necessário para que ocorra a quebra da emulsão, o que torna possível indicar o uso de material de levedura como agente flavorizante em emulsões do tipo maionese. Pode-se observar também que o autolisado apresenta uma curva bastante similar à da farinha de soja desengordurada, sendo que, em valores absolutos, o autolisado apresentou menor efeito quando comparado com a farinha de soja.

O efeito do autolisado e do extrato sobre o volume adicional de óleo para formação de emulsão (Fig. 7) apresentou valores coerentes, já que no processo de autólise tem-se o rompimento da parede celular e ativação das enzimas intracelulares provocando a hidrólise da proteína em peptídeos que contém menor peso molecular, dificultando a ação do extrato sobre o aumento da capacidade emulsificante, sendo que o autolisado, que ainda contém parede celular, apresenta maior efeito sobre esta propriedade.



**Figura 7.** Variação do volume de óleo incorporado à solução de ovalbumina 0,2% em função da adição crescente de autolisado de levedura (AT), extrato de levedura (Ex) e da farinha de soja desengordurada (FSD) para que ocorra a quebra da emulsão.

Apesar da menor influência do autolisado e do extrato na capacidade emulsificante da ovalbumina, quando comparada com a farinha de soja desengordurada (Figura 7), observa-se um aumento considerável na capacidade emulsificante em relação à solução inicial de ovalbumina 0,2% ao se utilizar os produtos de levedura como aditivo funcional. Ao se adicionar 700mg de amostra no sistema contendo ovalbumina 0,2% + óleo, observa-se um aumento de 2,4 vezes na capacidade emulsificante no caso do acréscimo de autolisado e um aumento de 1,7 vezes no caso do acréscimo do extrato e de 3 vezes no caso da farinha de soja desengordurada. Quando se compara estes resultados com os valores apresentados pela relação entre absorção de água e absorção de óleo (WOAI) da Tabela 2, pode-se perceber que estas propriedades estão relacionadas, como citado por De

se perceber que estas propriedades estão relacionadas, como citado por De KANTEREWICZ et alii (1987). Quanto maior for a relação CAA/CAO (WOAI) tanto maior deverá ser a capacidade de emulsificação do sistema.

**Tabela 2.** Razão entre a capacidade de absorção água (CAA) e a capacidade de absorção de óleo (CAO) para as amostras de levedura íntegra (LI), autolisado total (AT), extrato de levedura (Ex) e farinha de soja desengordurada (FSD).

<b>Amostra</b>	<b>WOAI*</b> <b>(mL água absorvida/mL óleo absorvido)</b>
Levedura Íntegra	1,86
Autolisado	3,77
Extrato	1,97
Farinha de Soja Desengordurada	5,53

\*WOAI = CAA/CAO

## 5.4. Conclusões

O processamento da levedura alterou as propriedades funcionais de cada fração de maneira diferente. Pode-se perceber estas alterações quando se compara autolisado e extrato com a levedura íntegra. Observou-se um aumento considerável da solubilidade do nitrogênio no extrato (33% em comparação com a levedura íntegra). Houve uma redução do índice de absorção espontânea de óleo no processo, que diminuiu em 59% para o autolisado e em 43% para o extrato, quando se compara com a levedura íntegra. Somente o autolisado possui este índice menor que o da farinha de soja desengordurada. Quanto à absorção espontânea de água, observou-se uma redução considerável durante o processamento (17% para o autolisado e 40% para o extrato). Ao se comparar os três produtos de levedura com a farinha de soja desengordurada, pode-se perceber que todos possuem uma absorção espontânea de água bastante inferior ao da farinha. O processo de autólise resultou em um aumento da capacidade de retenção de água. A capacidade emulsificante de uma solução de ovalbumina 0,2% (815 mL óleo/g proteína) aumentou de 2,4 vezes após a adição de aproximadamente 700mg de autolisado e de 1,7 vezes após a adição de igual massa de extrato de levedura, indicando que estes produtos poderão ser adicionados em emulsões, como, por exemplo, maionese, com o objetivo de aumentar a capacidade emulsificante, a viscosidade, a consistência e introduzir sabor diferenciado.

## 5.5. Referências Bibliográficas

- AOAC –Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**, 15<sup>th</sup> edition, Arlington, 1990
- ASP, N.; JOHANSSON, C.G.; HALMER, H.; SILJESTROM, M.A. A rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.31, n.3, p.476-482, 1983.
- BENASSI, V.T.; CAMARGO, C.R.O.; GIACCO, C.F. Caracterização química e redução do conteúdo de ácidos nucléicos das células de levedura (*Saccharomyces ssp*) provenientes da produção de álcool de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.10, n.2, p.231-248, 1990.
- BLIGH E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biotechnology and Physiology**, Ottawa, v.37, n.7, p.911-917, 1959.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.
- CHOU D.H.; MORR, C.V. Protein water interactions and functional properties. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.56, n.1, p.53a.-62a., 1979.

- 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 protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.
- De KANTEREWICZ, R.J.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. A simple method for determining oil absorption capacity of proteins and the kinetics of oil uptake. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.66, n.6, p. 809-812, 1989.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**, Flórida: Library of Congress, 1991. 311 p.
- HALL, G. M. **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 265p.
- HEBERT, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGER, R.E. Chemical analysis of microbial cells. In: NORIS, J.R. & RIBBORS, P.W. (Eds), **Methods of enzymology**, London: Academic Press, 1971. v.5B, 695p.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of protein in foods: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.4, n.3, p.219-281, 1976.
- KOLLAR, R.; STURD, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, p. 225-237, 1992.

LEE, B.H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: V.C.H. Publishers,, 1996, 431p.

MARQUES, A.; OETTERER, M.; HORII, J. Caracterização da levedura e seu uso na alimentação. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32, n.1, p.89-98, 1998.

MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA,A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**,Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

NAGODAWITHANA, T.W. Yeast-derived flavor and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.11, p.138-144, 1992.

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

PACHECO, M.T.B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces sp.*) obtidos por diferentes processos de extração**. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas, 158p., 1996.

SCHACHTEL, A.P. Effects of preparative process on the composition and functional properties of protein preparations from *Candida utilis*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.2, p.377-382, 1981b.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1-2, p.119-125, 1999 .

TORGERSEN, H.; TOLEDO, R.T. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.6, p.1615-1620, 1977.

## ANEXOS

### Trabalhos publicados e enviados para publicação relacionados à tese:

- 1.SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces sp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1,2, p.119-125, 1999.
- 2.VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*) originária de cervejaria. Aceito para publicação: **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.3, p.185-192, 2000.
- 3.VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.2, p.127-134, 2000.