

QUALIDADE PROTÉICA DO SORO DE LEITE FERMENTADO PELA LEVEDURA *Kluyveromyces fragilis*

PROTEIN QUALITY OF WHEY FERMENTED BY *Kluyveromyces fragilis* YEAST

Caio Abércio da Silva¹ Raul Castro Hernan-Gomez²

RESUMO

O soro de leite fermentado pela levedura *Kluyveromyces fragilis*, após secagem em *spray drier*, foi submetido à avaliação da qualidade protéica através de uma análise aminoacídica e de um estudo biológico pelos métodos: Relação da Eficiência Protéica (PER), Relação da Eficiência Líquida da Proteína (NPR) e Utilização Líquida da Proteína (NPU). Na análise aminoacídica, foram utilizadas como comparativo a composição de aminoácidos das proteínas padrão do ovo e da FAO. Os resultados indicaram um alto nível de lisina (65,60mg/g de proteína) e baixos níveis de metionina e valina, respectivamente, 14,90mg e 45,80mg/g de proteína. A avaliação biológica foi conduzida durante 4 semanas, sendo utilizados 24 ratos desmamados aos 23 dias de idade. Os resultados para PER, NPR e NPU foram respectivamente, 19,75%, 46,33% e 26,54%, comparados com os valores obtidos com a proteína padrão caseína. A qualidade da proteína do soro seco fermentado apresentou-se inferior à proteína da caseína.

Palavras-chave: qualidade protéica, *Kluyveromyces fragilis*, levedura, soro de leite.

SUMMARY

Kluyveromyces fragilis fermented whey was spray dried and the protein quality of dried product was assayed by aminoacid analysis and three biological methods: Protein Efficiency Ratio (PER), Net Protein Ratio (NPR) and Net Protein Utilization (NPU). Aminoacid analysis using casein and FAO protein as standards had a high level of lysine (65.6mg/g protein) and low levels of methionine (14.9mg/g protein) and valine (45.8mg/g protein). Biological evaluation of dried fermented whey protein, using 24 weaned rats, 23 days of age, during four weeks, using casein as standard protein, resulted in PER, NPR and NPU, 19.75%, 46.33% and 26.54%. Nutritional quality of the dried fermented whey protein was lower than the casein protein.

Key words: protein quality, *Kluyveromyces fragilis*, yeast protein, food yeast, whey.

INTRODUÇÃO

São constantes os esforços para aproveitamento de resíduos agroindustriais em todo mundo. Neste particular, o soro de leite, pela abundância de produção, características nutricionais e elevada capacidade poluente, tem sido, há tempo, motivo de vários estudos

Muitos processos fermentativos, objetivando incrementar os níveis protéicos do soro e diminuir suas características poluentes pela redução dos níveis de lactose, foram conduzidos utilizando este resíduo como substrato e a levedura *Kluyveromyces fragilis* como inóculo. Os resultados obtidos por VANANUVAT & KINSELLA (1975), GILLIAND & STEWART (1980), BEAUSEJOUR *et al.* (1981), SHAY & WEGNER (1986) e SILVA & CASTRO-GOMEZ (1995) determinaram, respectivamente, valores finais de proteína bruta iguais a 58%, 57%, 57,4%, 43,8% e 39,6%, portanto, superiores aos níveis do soro de leite.

Quanto ao perfil de aminoácidos da proteína do soro de leite fermentado, os valores observados por BEAUSEJOUR *et al.* (1981) e por DZIEZAK (1987) apresentaram variações; entretanto, os aminoácidos lisina, isoleucina, treonina, valina, leucina, fenilalanina e tirosina atingiram níveis superiores em relação à proteína padrão do ovo.

A qualidade nutricional da biomassa de leveduras varia em função do tipo de levedura utilizada e do meio empregado para sua propagação (WASLIEN, 1975; KINSELLA & SETTY, 1978;

¹Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, CP 6001, 86051-920, Londrina – Paraná. E-mail: casilva@npd.uel.br. Autor para correspondência.

²Universidade Estadual de Londrina - Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Tecnologia de Alimentos. Recebido para publicação em 15.01.99. Aprovado em 15.09.99

MARIATH, 1981). WASLIEN (1975), através de bioensaios com ratos, observou que, para diferentes gêneros de leveduras comerciais, o valor biológico da proteína da biomassa variou entre 48 e 92% em relação à proteína padrão caseína.

MAHMOUD (1980), trabalhando com cinco culturas diferentes de *K. fragilis* em caldo soro de leite para a produção de proteína celular e álcool, observou baixa qualidade protéica do fermentado comparado com a proteína padrão da caseína. Contrariamente, ABREU *et al.* (1976), trabalhando com ratos, obtiveram valores superiores para a qualidade protéica do soro de leite fermentado, comparado com a caseína (2,9 contra 2,23 para a relação da eficiência protéica e 0,38 contra 0,22 para o índice de eficiência alimentar).

Os métodos físico-químicos que identificam o escore de aminoácidos podem dar, provavelmente, uma boa indicação do valor da proteína do alimento, mas não consideram a digestibilidade e a utilidade dos aminoácidos presentes. A utilização dos métodos biológicos propostos oficialmente pelo USDA, como a relação da Eficiência Protéica, a Relação da Eficiência Líquida da Proteína e a Utilização Líquida da Proteína, auxiliam na predição da qualidade de um alimento e continuam se apresentando como recursos para se determinar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos (MITCHELL *et al.*, 1989; KUNTZ, 1997).

Diante dessas considerações, o objetivo deste trabalho é avaliar nutricionalmente o soro de leite fermentado pela levedura *K. fragilis* mediante um estudo do perfil aminoacídico e através de bioensaios com ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

O produto soro de leite fermentado pelo *K. fragilis* foi obtido através de processo descrito por SILVA & CASTRO-GOMEZ (1995) e submetido a uma secagem por *spray drier*, denominando-se soro de leite seco fermentado. A composição do soro de leite seco fermentado apresentava 39,63% de proteína total, 5,15% de lipídios, 25,14% de cinzas, 23,75% de carboidratos e 6,33% de água.

Para a determinação aminoacídica do produto, a amostra, após hidrólise ácida sob vácuo, foi analisada no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, baseando-se nos métodos de SPACKMAN *et al.* (1958) e MOORE & STEIN (1963). O triptofano foi analisado pelo método de CONCON (1975).

A composição aminoacídica da proteína do soro de leite seco fermentado foi comparada com duas proteínas padrões, proteína do ovo e da FAO, cujos níveis de aminoácidos foram citados por MARIATH (1981) e COZZOLINO (1982). A com-

paração entre a proteína do soro fermentado e as proteínas padrões foi definida pelo cômputo químico, representado pela relação entre os aminoácidos da proteína do soro e os aminoácidos das proteínas padrões. A relação entre o total de aminoácidos essenciais e o total de nitrogênio das proteínas do soro, padrão do ovo e padrão da FAO (relação E/T) foi também realizada, permitindo comparações entre os grupos.

As metodologias utilizadas para avaliação biológica da qualidade protéica do soro de leite seco fermentado pelo *K. fragilis* foram: Relação da Eficiência Protéica - PER (AOAC, 1990), Relação da Eficiência Líquida da Proteína - NPR (McDONALD *et al.*, 1981) e Utilização Líquida da Proteína - NPU (HOPKINS & STEINKE, 1978).

Para o desenvolvimento do bioensaio, conduzido no biotério do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina, foram utilizados 24 ratos machos da linhagem WISTAR (*Ratos norvegicus. var albinus*, Rodentia), recém desmamados, com 23 dias de vida, pesando entre 45 e 55g. Previamente, todos os animais sofreram um período de adaptação no pós-desmame durante quatro dias, recebendo água e uma dieta base com proteína padrão caseína à vontade. Os animais, posteriormente, foram divididos em três grupos, sendo cada grupo tratado com um tipo de ração: Ração Padrão Caseína (RPC), Ração com Soro de Leite Seco Fermentado (RSSF) e Ração Padrão Aprotéica (RPA). O experimento teve duração de 28 dias. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 8 repetições por tratamento.

O fornecimento de água e alimento foi à vontade durante todo o experimento. As dietas foram confeccionadas obedecendo a normas da AOAC (1990) quanto aos níveis protéicos, de fibra, umidade e lipídios. Os níveis de minerais e vitaminas foram atendidos conforme recomendações do CLAD (1979), ou seja, 3,5% para minerais e 1% para vitaminas. Todas as rações foram formuladas para conter 10% de proteína bruta (com exceção do grupo tratado com ração aprotéica) e 3420Kcal de EM/kg (AOAC, 1990).

As análises estatísticas constaram de testes de variância realizados através do programa SAEG, Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, desenvolvido por EUCLYDES (1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise dos aminoácidos da proteína do soro de leite fermentado pelo *K. fragilis*, a relação E/T e o cômputo químico dos aminoácidos do soro em relação às proteínas padrões encontram-se na tabela 1. Nas tabelas 2, 3, 4 e 5, estão

Tabela 1 - Teor de aminoácidos essenciais, relação E/T e cômputo químico dos aminoácidos da proteína do soro de leite fermentado pela levedura *Kluyveromyces fragilis* em relação à proteína padrão do ovo e da FAO.

Aminoácidos	Proteína do soro de leite		Proteína padrão do ovo ¹		Proteína da FAO ¹	
	mg/g proteína	mg/g proteína	cômputo químico ²	mg/g proteína	cômputo químico ²	
Treonina	56,60	51,00	1,130	40,00	1,018	
½ Cistina	29,60	24,00	1,255	-	-	
Valina	45,80	73,00	0,648	50,00	0,662	
Triptofano	10,60	16,00	0,677	10,00	0,750	
Metionina	14,90	31,00	0,483	-	-	
Isoleucina	47,30	66,00	0,742	40,00	0,856	
Leucina	80,30	88,00	0,936	70,00	0,830	
Tirosina	23,70	42,00	0,573	-	-	
Fenilalanina	28,20	58,00	0,495	-	-	
Lisina	65,60	64,00	1,048	55,00	0,856	
Aromáticos totais	51,90	100,00	0,536	60,00	0,623	
Sulforados totais	44,50	55,00	0,832	35,00	0,917	
Total	498,70	513,00		360,00		
Relação E/T ³	3,08	3,20		2,25		

¹ Valores citados por MARIATH (1981) e COZZOLINO (1982)

² Cômputo químico = $\frac{\text{mg de aminoácido essencial da proteína teste}}{\text{mg de aminoácido essencial da proteína padrão}}$

³ Relação E/T = $\frac{\text{total de aminoácidos essenciais}}{\text{total de nitrogênio}}$

apresentados, respectivamente, os resultados do desempenho dos animais e valores do PER, os dados médios da variação do peso dos animais e valores de NPR, os valores médios do peso e composição das carcaças, e, finalmente, os níveis de nitrogênio total na carcaça, consumo de nitrogênio e NPU.

Os níveis dos aminoácidos do soro de leite fermentado foram similares aos resultados obtidos por SHAY e WEGNER (1986), que utilizaram condições de crescimento e de meio de cultivo semelhantes, e aos resultados de DZIEZAK (1987), mas encontraram-se abaixo dos valores obtidos por BEAUSEJOUR *et al.* (1981).

Na tabela 1, verificou-se que, dependendo do padrão utilizado, os aminoácidos limitantes primário, secundário e terciário se modificaram. Dessa

forma, quando foi comparada a composição aminoacídica da proteína do soro de leite seco fermentado com a proteína do ovo, observou-se, pelo cômputo químico, uma limitação primária da metionina, secundária de aromáticos totais e terciária da valina, respectivamente, 51,7%, 46,4% e 35,3%.

Realizando a mesma comparação com a proteína da FAO, foi observado 37,7% de *deficit* para os aromáticos totais, 33,8% para a valina e 25% para o triptofano. Para a lisina, verificou-se um aumento significativo, superior ao observado no perfil da proteína do ovo, sugerindo o potencial deste produto como complemento alimentar. Não obstante, o procedimento de secagem do produto original (soro de leite fermentado) pelo método *spray drier*, segundo PAUL *et al.* (1996), torna esse aminoácido menos disponível nutricionalmente comparado com o método *freeze-drier*.

Quanto à relação E/T dos aminoácidos (Tabela 1), observou-se que o resultado obtido para a proteína do soro seco fermentado (3,08) não superou o valor da relação para a proteína do ovo (3,20), entretanto, esteve dentro dos limites de 2,94 a 3,26 para a relação E/T para vários gêneros de leveduras (COZZOLINO, 1982).

Quanto ao bioensaio com ratos (Tabela 2), verificou-se que o ganho de peso dos animais do grupo RSSF foi inferior ao do grupo RPC ($P \leq 0,01$), assim como o consumo total de proteína no período, 47% em relação à dieta padrão caseína. Os resultados do PER (Tabela 2),

Tabela 2 - Valores médios do peso inicial e final dos animais, do ganho de peso e do consumo de ração e de proteína, e valores da Relação da Eficiência Protéica (PER), PER Corrigido e Relativo dos grupos tratados com Ração Padrão Caseína e Ração Soro Seco Fermentado.

PARÂMETROS	PESO (g)		CONSUMO (g)			PER	
	Inicial	Final	Ganho	Ração	Proteína Obtido	Corrigido ¹	Relativo(%) ²
Ração Padrão Caseína	56,29 ± 2,05	178,72 ± 14,27	122,42 ± 14,72	365,68 ± 22,56	37,00 ± 2,27	3,29 ± 0,37	2,5 100
Ração Soro Seco Fermentado	55,52 ± 2,41	67,37 ± 7,33	11,84** ± 6,91	173,19 ± 30,14	17,40** ± 0,40	0,65 ± 0,34	0,49 19,75 **

** ($P=0,01$).

¹PER Corrigido = valores obtidos para a Ração Padrão Caseína foram considerados como índice 2,5.

²PER Relativo = valores obtidos para a Ração Padrão Caseína foram considerados como índice 100.

Tabela 3 - Valores médios para variação no peso dos animais, consumo de proteínas no período e Relação da Eficiência Líquida da Proteína (NPR) e NPR Relativo dos grupos tratados com Ração Padrão Caseína, Ração Soro Seco Fermentado e Ração Padrão Aprotéico.

GRUPOS	VARIAÇÕES NO PESO (g)	CONSUMO DE PROTEÍNA (g)	NPR	NPR Relativo ¹ (%)
Ração Padrão Caseína	122,42 ± 14,72	37,00 ± 2,27	3,82 ± 0,28	100
Ração Soro Seco Fermentado	11,84 ± 6,91	17,57 ± 0,40	1,77 ± 0,29	46,33 **
Ração Padrão Aprotéico	19,44 ± 3,40			

** (P=0,01).

¹ NPR Relativo = valores obtidos para a Ração Padrão Caseína foram considerados como índice 100.

demonstraram uma diferença significativa ($P \leq 0,01$) a favor da proteína padrão caseína (RPC). Para leveduras do gênero *Saccharomyces* em meios diferentes do caldo soro de leite, os valores do PER relativo, encontrados por MARIATH (1981) e COZZOLINO (1982), foram mais altos que os obtidos neste trabalho, respectivamente, 38,9% e 76,8%.

Sob condições um pouco diferentes, mas utilizando o soro de leite e a levedura *K. fragilis*, ABREU *et al.* (1976) obtiveram resultados que superaram significativamente os valores do PER para a proteína padrão caseína (2,9 contra 2,23). Entretanto, pelas características finais do fermentado é possível que uma importante fração do total protéico do produto fosse representado por altos níveis de proteínas lácteas.

Sob condições de cultivo muito semelhantes às conduzidas neste trabalho, MAHMOUD (1980), utilizando cinco culturas de *Kluyveromyces*, observou também valores de PER baixos para a proteína do fermentado, em relação à proteína padrão caseína. Conforme se estabelece, a quantificação do PER é diretamente dependente do volume de ração consumida ou do conteúdo total de proteína ingerida. Assim, o produto testado foi penalizado pela sua baixa ingestão.

A palatabilidade do produto pode ter sido determinante na ingestão, confirmando a hipótese de EVANS & WITT (1978), os quais indicaram que a aceitação de um produto

pode, efetivamente, influenciar de forma importante os resultados. A ocorrência de diarreia generalizada, atingindo sete animais do grupo RSSF durante a primeira semana do experimento, somada a uma severa perda de peso de todo o grupo, também é uma situação que penaliza o PER, já que o índice depende do ganho de peso. Posteriormente, na segunda e terceira semanas do experimento, verificou-se ainda uma participação importante de água nas fezes do grupo RSSF, respectivamente, 51,16% e 54,49% contra 12,81% e 22,67%, presentes nas mesmas segunda e terceira semanas para o grupo RPC.

COZZOLINO (1982) alerta, neste sentido, que o teor de água corporal é um dos maiores responsáveis pelo peso e que problemas de ordem gastrointestinal, como as diarreias, são ocorrências comuns que podem influenciar os resultados.

A análise química dos aminoácidos do fermentado demonstrou que, comparativamente à proteína da caseína, a biomassa *K. fragilis* em caldo soro de leite apresentou moderadas limitações em alguns aminoácidos essenciais. Entretanto, mesmo diante de uma combinação adequada de aminoácidos essenciais, uma proteína pode apresentar baixo rendimento biológico devido a problemas próprios de digestibilidade (COZZOLINO, 1982). É possível também que pela idade dos ratos não exista um quadro enzimático digestivo efetivo, o que pode explicar os resultados biológicos pouco expressivos observados para o grupo RSSF. Não obstante, sob

Tabela 4 - Valores médios do peso da carcaça e dados percentuais médios da umidade, lipídios e nitrogênio das carcaças dos grupos tratados com Ração Padrão Caseína e Ração Soro Seco Fermentado.

GRUPOS	CARCAÇA (g)			Umidade (%)	Lipídios (%)	Nitrogênio (%)
	integral	seca	seca s/ gordura			
Ração Padrão Caseína	130,79 ± 9,93	47,98 ± 4,28	33,03 ± 2,22	63,34 ± 1,32	11,37 ± 1,26	11,23 ± 0,26
Ração Soro Seco Fermentado	40,86 ± 5,90	13,26 ± 2,34	10,73 ± 1,21	67,69** ± 1,45	5,92** ± 1,94	10,62n.s. ± 0,96

** (P=0,01).

Tabela 5 - Valores médios do nitrogênio total na carcaça, consumo de nitrogênio total e Eficiência Líquida da Proteína (NPU) e NPU Relativo dos grupos tratados com Ração Padrão Caseína e Ração Soro Seco Fermentado.

GRUPOS	NITROGÊNIO TOTAL NA CARCAÇA (g)	CONSUMO DE NITROGÊNIO (g)	NPU	NPU Relativo ¹ (%)
Ração Padrão Caseína	3,70 ± 0,25	5,92 ± 0,43	0,501 ± 0,001	100
Ração Soro Seco Fermentado	1,10 ± 0,34	2,79 ± 0,32	0,13 ± 0,041	26,54**

** (P=0,01).

¹ NPU Relativo = valores obtidos para a Ração Padrão Caseína foram considerados como índice 100.

condições semelhantes adotadas, embora com outras leveduras, MARIATH (1981) e COZZOLINO (1982) não verificaram qualquer ocorrência indesejável.

Quanto aos valores do NPR (Tabela 3), o NPR relativo da proteína do grupo RSSF apresentou-se inferior (P≤0,01) em relação ao grupo RPC, correspondendo a 46,33%. Este resultado, entretanto, apresenta-se superior ao PER. MITCHELL *et al.* (1989) tratam que, para proteínas de baixa qualidade, é previsível que os valores do NPR sejam mais altos que os valores do PER. Semelhante ao PER, o NPR é quantificado pelo ganho de peso e pelo consumo, e neste sentido, embora com menor intensidade, as mesmas adversidades de consumo e distúrbios gastrointestinais registrados, provavelmente, vieram a comprometer os resultados.

Quanto aos valores relativos à carcaça e à sua composição percentual com relação aos níveis de umidade, lipídios e nitrogênio (Tabela 4), não foi observada diferença significativa para a porcentagem de nitrogênio, mas houve diferença (P≤0,01) para os níveis de umidade e lipídios. Estes resultados são reflexo do baixo consumo alimentar e das alterações gastrointestinais. A perda de água e a baixa ingestão alimentar, provavelmente, influenciaram a reserva hídrica e lipídica do organismo. Essa proposição se confirma diante do nível de lipídios na carcaça, correspondente à metade encontrada nas carcaças dos ratos do grupo RPC (Tabela 4).

Os valores de nitrogênio total na carcaça, o consumo de nitrogênio total, o NPU e o NPU relativo indicaram uma expressiva vantagem para o grupo RPC, em detrimento ao grupo RSSF (Tabela 5). O NPU relativo do grupo RSSF foi de 26,54%,

comparado ao NPU do grupo RPC, indicando uma significativa diferença (P≤0,01) em relação à caseína.

Diante do perfil aminoacídico, a proteína do soro de leite seco fermentado pela levedura *K. fragilis* apresentou deficiência em seus aminoácidos em relação às proteínas padrão do ovo e da FAO. Através dos métodos biológicos adotados, a qualidade protéica do soro fermentado mostrou-se inferior à proteína padrão caseína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.E.V., TERRA, N.N., MELLER, A.C. *et al.* Buttermilk as a medium for the culture of edible yeast. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.6, n.8, p.275-280, 1976.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - A.O.A.C. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: Kenneth Helrich, 1990. 2v. 1298p.
- BEAUSEJOUR, D., LEDUY, A., RAMALHO, R.S. Bath cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. **Can J Chem Eng**, v.59, n.8, p.522-526, 1981.
- COMMITTEE OF LABORATORY ANIMAL DIETS - C.L.A.D. Control of diets in laboratory animal experimentation. **Nutrition Abstracts & Reviews B: Livestock Feeds and Feeding**, v.49, n.11, p.413-419, 1979.
- CONCON, J.M. Rapid and simple method for the determination of tryptophan in cereal grains. **Anal Biochem**, v.62, p.206-219, 1975.
- COZZOLINO, S.M.F. **Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos**. São Paulo, 1982. 147p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, 1982.
- DZIEZAK, D.J. Yeast and yeast derivatives: applications. **Food Technol**, v.41, n.2, p.122-125, 1987.
- EUCLYDES, R.F. **Sistemas de análises estatísticas e genéticas** - SAEG. Viçosa : CPD/Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa, 1982. 83p.
- EVANS, E., WITTY, R. An assessment of methods used to determine protein quality. **World Rev Nutr Diet**, n.32, p.1-26, 1978.
- GILLIAND, S.E., STEWART, C.F. Amount of yeast and whey protein recovered from cottage cheese whey cultured with *Kluyveromyces fragilis*. **J Dairy Sci**, v.63, n.6, p.89-99, 1980.
- HOPKINS, D.T., STEINKE, F.H. Updating protein quality measurement techniques. **Cereal Foods World**, v.23, n.9, p.539-543, 1978.

- KUNTZ, L.A. Proteins possibilities. **Food Protein Design**, v.7, n.7, p.76-90,1997.
- KINSELA, J.E., SETTY, K.J. Yeast proteins: recorry nutritional and funcional properties. **Adv Exp Med Biol**, s.v., p.717-725, 1978.
- MAHMOUD, M.M. **Ultrafiltration in the manufacture of soft pickled and production of alcohol and single cell protein from whey**. Ithaca, 1980. 91p. Dissertation (PhD in Food Science) - Cornell University, 1980.
- MARIATH, J.G.R. **Comportamento biológico da proteína isolada do resíduo de cerveja - Estudo de alguns parâmetros bioquímicos e nutricionais**. São Paulo, 1981. 166p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, 1981.
- MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D. **Animal Nutrition**. 3rd ed. New York : Longman, 1981: Evaluation of foods (D). protein: p.240-261.
- MITCHELL, G.V., JENKINS, M.Y., GRUNDEL, E. Protein efficiency ratios and net protein ratios of selected protein foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.39, n.1, p.53-58, 1989.
- MOORE, S., STEIN, W. Chhromatography determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. **Meth Enzymol**, v.6, p.819-831, 1963.
- PAUL, D., CHATTERJEE, B.P., GUHA, A .K. Aavailable lysine in protein in *Kluyveromyces fragilis* yeast grown in whey. **Indian J Dairy Sci**, v.49, n.2, p.78-80, 1996.
- SHAY, L.K., WEGNER, G.H. Nonpollution conversion of whey permeate to food yeast protein. **J Dairy Sci**, v.69, n.3, p.676-683, 1986.
- SILVA, C.A., CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. **Semina Ci Agr**, v.16, n.1, p.17-20, 1995.
- SPACKMAN, D.H., STREIN,W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal Chem**, v.30, p.1120-1206, 1958.
- VANANUVAT, P., KINSELLA, J.E. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. **J Food Sci**, v.40, n.2, p.336-341, 1975.
- WASLIEN, C.I. Unusual sources of protein for man. **Crit Rev E Sci Nutr**, v.6, n.1, p.77-151, 1975.