




**UNIVERSIDADE FEDERAL  SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

KRISCHINA SINGER APLEVICZ

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS
EM FERMENTO NATURAL OBTIDO A PARTIR DE UVA E
SUA APLICAÇÃO EM PÃES**

**FLORIANÓPOLIS
2013**

KRISCHINA SINGER APLEVICZ

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS
EM FERMENTO NATURAL OBTIDO A PARTIR DE UVA E
SUA APLICAÇÃO EM PÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna.

**Florianópolis
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Aplevicz, Krischina Singer

Identificação de bactérias lácticas e leveduras em
fermento natural obtido a partir de uva e sua aplicação em
pães / Krischina Singer Aplevicz ; orientador, Ernani
Sebastião Sant'Anna - Florianópolis, SC, 2013.
162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Fermento natural. 3.
Bactéria láctica. 4. Levedura. 5. Pão. I. Sant'Anna, Ernani
Sebastião . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

KRISCHINA SINGER APLEVICZ

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS
EM FERMENTO NATURAL OBTIDO A PARTIR DE UVA E
SUA APLICAÇÃO EM PÃES**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciências dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 29 de abril de 2013.

Prof^a. Dr^a. Roseane Fett
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna
Orientador
UFSC

Dedico este trabalho ao meu pai, Alberto Aplevicz (*in memoriam*),
exemplo de homem, que me ensinou a lutar pelos meus objetivos
e a acreditar na minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e por me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha amada família, em especial:

Ao meu amado Adriano, sempre prestativo para me ajudar, não importando o dia e a hora. Obrigada pelo seu companheirismo, carinho e “sábias palavras”.

À minha querida Mami Guimara, pela confiança, carinho e valiosos conselhos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

Ao Professor Ernani, pela orientação, confiança e oportunidade.

À todos os co-autores desta tese, pela parceria na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Alimentar, Biologia Molecular, Cereais, Leite e Derivados e Microscopia pelo apoio e parceria, em especial: Eunice C. Ilha, Tiago da Silva, Luiz R. Morioka, Angelo Matos, Maria Helena Canella, Carlise B. Fritzen-Freire, Andréia Z. Dinon, Juliana Lorenz, Fabiane P. de Castro, Tatiana Oro, Marivone Borges e Valéria Limberger.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina pelo apoio na realização desta pesquisa, em especial às amigas: Berenice Von Dentz, Elinete de Lima, Jane Parisenti e Emanuelle Marcos pelo apoio e bons conselhos.

À amiga Jaciara Z. Mazo pelos ensinamentos iniciais e pelo incentivo.

Às amigas Simone Inglez e Patricia Scheuer pela amizade e correção dos artigos.

Às amigas distantes, porém sempre presentes, Madelon Mongruel, Carolina Prestes, Tais Boscardin e Larissa Martins pelo apoio e pela alegria de uma bela amizade.

Ao Professor Dr. Paulo José Ogliari, pelo auxílio na estatística.

Ao Professor Dr. Ivo Mottin Demiate pelos contínuos ensinamentos e por aceitar prontamente ser o relator desta tese.

Aos Professores Renata Amboni, Pedro Barreto, Edna Amante e Elane Prudêncio pelas valiosas contribuições ao longo da tese e como membro da banca.

À Professora Regina de Oliveira Moraes Arruda como membro da banca.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

Às minhas gatinhas Mila e Amélie pelas longas horas de companhia durante a escrita desta tese.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada!

APLEVICZ, Krischina Singer. **Identificação de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural obtido a partir de uva e sua aplicação em pães**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

RESUMO

O fermento natural é usado no preparo de produtos de panificação proporcionando melhorias na massa. Consiste na mistura de farinha de cereais composta por bactérias lácticas e leveduras desenvolvidas por fermentação espontânea ou pela adição de culturas *starters*. O objetivo principal deste estudo foi desenvolver um fermento natural e identificar bactérias lácticas e leveduras interessantes à panificação, avaliando a fermentação desses micro-organismos e a sua aplicação em pães. Foram desenvolvidos três fermentos: com cana de açúcar, maçã e uva. O fermento à base de uva foi o selecionado para esta pesquisa por apresentar maior volume na fermentação e ser o preferido na análise sensorial. A identificação fenotípica para bactéria láctica e leveduras foi realizada usando o kit API 50CHL e 20CAUX e foram também caracterizadas genotipicamente pelo método por sequenciamento. Quatro cepas foram isoladas neste estudo, sendo duas cepas identificadas como *Lactobacillus paracasei* (LP1 e LP2) e as outras duas como *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 e SC2). No fermentador, LP2 apresentou a mesma fase exponencial que LP1 (15 h), sendo sua velocidade específica de crescimento maior e estatisticamente diferente dos demais. As leveduras SC1 e SC2 apresentaram uma fase exponencial de 10 e 14 h, respectivamente. Os micro-organismos apresentaram uma boa estabilidade após o congelamento e liofilização, sendo que LP2 obteve a menor redução microbiana. Com relação ao tempo de fermentação do fermento natural, se constatou que o crescimento ideal foi o de 48 h. Os maiores volumes encontrados nos pães foram com 6 h de fermentação. As amostras de pães com LP1 foram descartadas da análise sensorial por apresentarem menor volume específico, massa muito firme e cor da casca pálida. A massa com SC1 apresentou o miolo mais macio e uma estrutura de glúten normal, com superfície uniforme. O melhor resultado da análise sensorial foi para a formulação com LP2/ SC1 ($P < 0,05$). Desta forma, o processamento do fermento natural, a partir de culturas *starters*, pode ser utilizado no setor

de panificação, pois a partir delas é possível obter um produto padronizado, seguro e de maior facilidade na manutenção.

Palavras-chave: fermentação espontânea, pão, fermento natural, bactéria láctica, levedura, acidez.

APLEVICZ, Krischina Singer. **Identification of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough made from grape and application in bread.** 2013. Thesis (PhD in Food Science) – Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ABSTRACT

Sourdough is used in the preparation of bakery products to provide improvements in dough. It consists of a mixture of cereal flour, composed of lactic acid bacteria and yeasts, which are developed by spontaneous fermentation or by adding starter cultures. The main objectives of this study were to develop sourdough and to identify lactic acid bacteria and yeasts of use in baking, and to evaluate the fermentation of these microorganisms and their application in bread. Three starter sources were studied with cane sugar, apple and grape. The sourdough from grape was selected for this research because it showed greater volume in fermentation and was the preferred choice in sensory analysis. The phenotypical identification of bacteria and yeasts was performed by using a API 50CHL kit and 20CAUX, and they were also genotypically characterized by the sequencing method. A total of four isolated strains were analyzed in this study, two of these strains being identified as *Lactobacillus paracasei* (LP1 and LP2) and another two as *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 and SC2). In the fermenter, LP2 showed the same exponential phase as LP1 (15 h) and its growth rate was higher and statistically different from the others. SC1 and SC2 yeasts showed an exponential phase of 10 and 14 hours, respectively. The microorganisms showed good stability after freezing and lyophilization, and LP2 showed the lowest microbial reduction. Regarding the fermentation time of sourdough, it was found that 48 hours of growth was considered to be ideal. The largest volumes were found in breads with 6 hours of fermentation. The samples of breads with LP1 were rejected in sensory analysis due to lower specific volume, very firm dough and a clear crust color. The dough with SC1 presented the softest crumbs and a normal gluten structure with uniform surface. The best results in terms of sensory analysis were for the formulation with LP2/ SC1 ($P < 0.05$). Thus, the processing of sourdough from starter cultures can be used in the bakery sector intended for consumers because it is possible to produce a standardized, safe and ease of maintenance.

Key words: spontaneous fermentation, bread, sourdough, lactic acid bacteria, yeast, acidity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 4

Figura 1	Evolução do pH (A), absorvância a 660nm (B), biomassa seca (C) e contagem em placas (D) ao longo do tempo.....	101
Figura 2	Evolução da contagem microbiana na fase exponencial ao longo do tempo.....	103
Figura 3	Sobrevivência de micro-organismos congelados e liofilizados em log UFC/ g.....	106
Figura 4	Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e contagem em placas (C) dos fermentos naturais ao longo do tempo.....	109

CAPÍTULO 5

Figura 1	Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e contagem em placas (C) da massa do pão entre 4 a 10 h de fermentação.....	122
Figura 2	Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e volume específico (C) dos pães entre 4 a 10 h de fermentação.....	124

CAPÍTULO 6

Figura 1	Efeito dos micro-organismos na firmeza do miolo dos Pães.....	142
Figura 2	Micrografia (magnificação = x 1500) dos miolos dos pães produzidos com: LP (A); LB (B); SC (C); CP (D); LPSC (E); LPCP (F); LBSC (G); LBCP (H).....	145
Figura 3	Notas atribuídas no teste de aceitabilidade.....	147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Características reológicas e físico-químicas da farinha de trigo.....	64
Tabela 2	Avaliação da atividade fermentativa dos fermentos naturais a 25, 30 e 35 °C.....	66
Tabela 3	Características físico-química dos fermentos naturais e dos pães.....	68
Tabela 4	Contagem em placas de BAL e leveduras do fermento de uva a 25, 30 e 35 °C (log UFC/g).....	70

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Identificação fenotípica de bactéria láctica de fermento natural de uva usando o kit 50 CHL.....	82
Tabela 2	Identificação fenotípica de leveduras de fermento natural de uva usando o kit API 20CAux.....	84

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Velocidade específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (t_d) dos micro-organismos.....	104
----------	--	-----

CAPÍTULO 5

Tabela 1	Volume específico de pães com aproximadamente 24 g de massa crua (mL/ g).....	126
----------	---	-----

CAPÍTULO 6

Tabela 1	Resultados físico-químicos dos pães com fermento natural.....	138
Tabela 2	Características dos pães produzidos com fermento natural com LP1, LP2, SC1, SC2 e culturas mistas.....	140
Tabela 3	Resultados de determinação da cor (L^* , b^* , a^*) na crosta e no miolo dos pães com diferentes micro-organismos.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Gama de cor (verde ao vermelho)
ANOVA	Análise de variância
ATT	Acidez titulável total
b*	Gama de cor (azul ao amarelo)
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BAL	Bactéria láctica
CO ₂	Dióxido de carbono
EST	Estabilidade
FN	Fermento natural
FI	Fermentação inicial
ITM	Índice de tolerância à mistura
J	Joules
<i>K.</i>	<i>Kluyveromyces</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
L	Extensibilidade
L*	Luminosidade
ln [N]	Logaritmo natural
LP	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
Log UFC/ g	Logaritmo de unidade formadora de colônia por grama
M	Massa
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
m.v ⁻¹	Massa/ volume
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
P	Tenacidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Potato dextrose agar
P/L	Relação tenacidade x extensibilidade
r ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ITM	Índice de tolerância à mistura
μ	Taxa de crescimento específico
μm	Micrômetro

μHg	Micrômetro de mercúrio
UB	Unidades Brabender
t_d	Tempo de duplicação
v/ v	volume/ volume
W	Energia de deformação da massa
TC	Tempo de chegada
TD	Tempo de desenvolvimento

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
CAPÍTULO 1.....	27
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1 PANIFICAÇÃO.....	27
1.2. FERMENTO NATURAL.....	29
1.3 BACTÉRIA LÁTICA.....	32
1.4 LEVEDURA.....	33
1.5 MICROBIOTA DO FERMENTO NATURAL.....	34
1.6 QUALIDADE FÍSICA, QUÍMICA E SENSORIAL DE PÃES.....	37
REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO 2.....	57
2 AVALIAÇÃO DO FERMENTO NATURAL NA PRODUÇÃO DE PÃES APLICANDO A TÉCNICA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	57
2.1 INTRODUÇÃO.....	58
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.2.1 Caracterização da farinha de trigo.....	59
2.2.2 Elaboração do fermento natural.....	60
2.2.3 Avaliação da capacidade fermentativa.....	60
2.2.4 Processamento dos pães.....	60
2.2.5 Propriedades físico-químicas e microbiológicas dos fermentos naturais e dos pães.....	61
2.2.6 Análise sensorial.....	61
2.2.7 Contagem microbiológica de bactérias lácticas e leveduras.....	61
2.2.8 Análise estatística.....	62
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
2.3.1 Caracterização da farinha de trigo.....	62
2.3.2 Caracterização dos fermentos naturais e dos pães.....	65
2.3.3 Características microbiológicas.....	69
2.4 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 3.....	77

3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS DO FERMENTO NATURAL DE UVA BRASILEIRA.....77

RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	77
3.1 INTRODUÇÃO.....	78
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
3.2.1 Preparação do fermento natural.....	79
3.2.2 Isolamento de bactérias lácticas e leveduras.....	79
3.2.3 Caracterização fenotípica de BAL e leveduras no fermento natural.....	80
3.2.4 Caracterização genotípica de BAL e leveduras no fermento natural.....	80
3.2.5 Análise estatística.....	80
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
3.3.1 Características fenotípicas.....	81
3.3.2 Identificação genotípica.....	86
3.4 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	87

CAPÍTULO 4.....93

4 ESTUDO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA AO CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DO FERMENTO NATURAL DE UVA BRASILEIRA.....93

RESUMO.....	93
ABSTRACT.....	94
4.1 INTRODUÇÃO.....	94
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	95
4.2.1 Cultivo dos microrganismos.....	95
4.2.2 Avaliação do fermentado.....	96
4.2.3 Velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação.....	96
4.2.4 Liofilização.....	97
4.2.5 Sobrevivência dos micro-organismos após a liofilização.....	97
4.2.6 Elaboração do fermento natural.....	97
4.2.7 Avaliação do fermento natural.....	98
4.2.8 Análise estatística.....	98
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
4.3.1 Cinética de crescimento na fermentação.....	98

4.3.2 Avaliação da velocidade específica de crescimento e do tempo de duplicação.....	103
4.3.3 Sobrevivência ao congelamento e liofilização	105
4.3.4 Análises dos fermentos naturais.....	107
4.4 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS.....	111

CAPÍTULO 5.....117

5 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO PÃO COM FERMENTO NATURAL.117

RESUMO.....	117
ABSTRACT.....	118
5.1 INTRODUÇÃO.....	118
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	119
5.2.1 Micro-organismos.....	119
5.2.2 Elaboração do fermento natural.....	119
5.2.3 Análise das massas e dos pães.....	119
5.2.4 Processamento dos pães.....	120
5.2.5 Volume específico.....	120
5.2.6 Análise estatística.....	121
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
5.3.1 Avaliação da massa e do pão.....	121
5.4 CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	128

CAPÍTULO 6.....131

6 EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS LIOFILIZADAS NAS PROPRIEDADES DO PÃO COM FERMENTO NATURAL.....131

RESUMO.....	131
ABSTRACT.....	131
6.1 INTRODUÇÃO.....	132
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	133
6.2.1 Micro-organismos	133
6.2.2 Elaboração do fermento natural.....	133
6.2.3 Processamento do pão.....	134
6.2.4 Propriedades físico-químicas e microbiológicas dos pães.....	134
6.2.5 Volume específico, perda de umidade e umidade do miolo.....	134
6.2.6 Análise de textura	135
6.2.7 Análise de cor.....	135

6.2.8 Propriedade de microestrutura.....	135
6.2.9 Análise sensorial.....	136
6.2.10 Análise estatística.....	136
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
6.3.1 Características físico-químicas e microbiológicas.....	136
6.3.2 Avaliação do volume específico, da perda de umidade e da umidade do miolo.....	139
6.3.3 Firmeza do miolo.....	141
6.3.4 Análise de cor.....	142
6.3.5 Microestrutura da massa dos pães.....	144
6.3.6 Análise sensorial.....	146
6.4 CONCLUSÃO.....	147
REFERÊNCIAS.....	148
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
8 ANEXOS.....	155
ANEXO A - Resumo apresentado no 16 th World Congress of Food Science and Technology.....	157
ANEXO B - Resumo apresentado no XI Congresso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos.....	158
ANEXO C - Resumo apresentado no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia.....	159
ANEXO D - Comprovante do artigo aceito para publicação.....	160
ANEXO E - Comprovante da submissão do artigo.....	161
ANEXO F - Parecer de aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC.....	162

INTRODUÇÃO

O pão é consumido em grande quantidade no mundo, nos diferentes tipos e formas, dependendo dos hábitos culturais. É estimado que 1,8 bilhão de pessoas consomem diferentes tipos de pães ao redor do mundo (CHAVAN; CHAVAN, 2011), sendo o pão branco o mais consumido (MANDALA et al., 2009).

O fermento natural é uma mistura de farinha de cereais composta por uma população heterogênea de bactérias lácticas e leveduras, desenvolvida por fermentação espontânea ou iniciada através da adição de cultura *starter* (DE VUYST; NEYSENS, 2005; CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). Segundo Plessas et al. (2008), a fermentação natural tem sido muito estudada, porém devido a sua natureza, ainda não é um processo bem compreendido.

A utilização de bactérias lácticas e leveduras no processo de fermentação natural proporciona produtos com características diferenciadas daqueles produzidos somente com a levedura comercial. Várias culturas *starters* têm sido aplicadas no preparo desses pães (PLESSAS et al., 2011b) visando melhoria na massa, no *flavour*, na textura, retardando o envelhecimento do pão e a contaminação por bolores e bactérias (GEREZ et. al., 2009; DE VALDEZ et. al., 2010).

De grande importância para o preparo dos produtos panificáveis, a levedura da panificação ganhou relevante interesse comercial e tecnológico, com desenvolvimento através da biotecnologia, que propiciou redução de custo e aumentou a facilidade da preparação dos pães, agregando qualidade, preço e acesso aos nutrientes. Contudo, a busca pela oferta de um produto diferenciado ao cliente leva muitos estabelecimentos comerciais a utilizarem técnicas antigas de fermentação natural em pães, passadas de geração em geração. Estas técnicas consistem num sistema natural formado por leveduras e bactérias lácticas, que convivem numa associação complexa. Embora de forte apelo comercial devido à diversidade e singularidade dos produtos que origina, o fermento natural acarreta gastos extras para a sua manutenção, pois é necessário o emprego diário de mão de obra e insumos para a sua conservação, o que acaba por aumentar o custo do produto final.

Os requerimentos necessários para manter um fermento natural acabam inviabilizando o seu uso. O desenvolvimento de um fermento natural seco padronizado pode evitar e eliminar a manutenção

diária do fermento natural fresco. O fermento mantido estável através da sua secagem se manterá ativo e sem alterações por mais tempo do que um fermento natural mantido refrigerado (BIANCHINI, 2004). O uso de fermento natural, utilizando a técnica da fermentação espontânea, também ocasiona a falta de padronização do produto, ante a falta de controle sobre o desenvolvimento das culturas microbianas presentes no fermento com o possível surgimento de micro-organismos indesejáveis.

No Brasil estas constatações são verificadas mais pela prática dos panificadores e pelos conhecimentos empíricos do que por comprovações científicas. No Estado de Santa Catarina o Decreto nº 31455/ 87 (BRASIL, 1987) permite apenas o uso de fermentos selecionados e de pureza comprovada por laboratório oficial, além de proibir a fermentação obtida pelas iscas de massa que utilizam processos de fermentação natural. Porém, é comum padarias especializadas, seja em virtude dos modismos de época ou da cultura local, utilizarem a técnica da isca de massa obtida por fermentação natural e ignorarem qualquer disposição legal em sentido contrário.

Desta forma, a pesquisa proposta visa desenvolver fermentos naturais utilizando culturas *starters* isoladas a partir de uma fermentação espontânea e aplicá-las no processamento de pães.

Este trabalho está dividido na forma de capítulos, com os seguintes tópicos:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Capítulo 2 – Artigo Avaliação do fermento natural na produção de pães aplicando a técnica da fermentação espontânea

Capítulo 3 – Artigo Isolamento e caracterização de bactérias lácticas e leveduras de fermento natural de uva do brasileira

Capítulo 4 – Artigo Estudo da cinética de crescimento da fermentação e sobrevivência ao congelamento e liofilização de micro-organismos isolados de fermento natural de uva brasileira

Capítulo 5 – Artigo Influência do tempo de fermentação nas características do pão com fermento natural

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PANIFICAÇÃO

Pão é um dos principais alimentos básicos consumido diariamente em todas as partes do mundo. Embora exista uma grande variedade de diferentes tipos, o termo pão geralmente se refere a produtos fermentados que contenham trigo (HAGER et al., 2012). As técnicas de produção e os produtos de panificação diferem em todo o mundo (CHAVAN; CHAVAN, 2011), sendo estes compostos por ingredientes que desempenham funções específicas no processo de formação da massa (BORGES et al., 2006).

A qualidade do produto final depende do teor de proteínas, do volume, da qualidade do miolo, da textura do pão (UPADHYAY et al., 2012) e das características sensoriais (ROSELL; SANTOS, 2010). Apesar do uso de centeio em algumas partes do mundo, o trigo ainda é o cereal com maior destaque na elaboração de pães (GOESAERT et al., 2005).

A determinação da qualidade da farinha é de grande importância no que se refere ao produto final desejado e seu processo de fabricação (DUYVEJONCK et al., 2012). Tendo em vista que a farinha de trigo é o principal ingrediente na massa do pão, as quantidades dos demais ingredientes são calculadas proporcionalmente sobre aquela, que corresponde a uma base de 100% (MONDAL; DATTA, 2008).

A farinha de trigo é composta por amido (70 a 75 %), água (12 a 14 %), proteínas (8 a 16 %) e outros constituintes menores, como polissacarídeos não amiláceos (2 a 3 %), lipídeos (2 %) e cinzas (1 %) (MORITA et al., 2002). Os principais componentes da farinha, como o glúten e o amido, influenciam as propriedades do produto final, mas a presença de células de gás dentro do pão também é essencial (WILDE, 2003) para formar a textura aerada que é característica da estrutura do pão (SROAN et al., 2009).

A produção do pão inicia com a mistura da massa com os principais ingredientes: farinha de trigo, água, fermento e sal (JEKLE; BECKER, 2012). À massa ainda podem ser acrescentados ingredientes não-essenciais, como: outros micro-organismos, gordura e açúcar (GOESAERT et al., 2005). A maioria das formulações de pães artesanais contém aproximadamente 60 a 75 % de água (MONDAL; DATTA, 2008). A adição de sal provoca modificação na reologia da

massa, principalmente por influenciar a estrutura e a formação da rede do glúten (BECK et al., 2012). Além disso, o sal é importante na percepção sensorial dos pães (MILLER; HOSENEY, 2008).

O desenvolvimento de massa é resultado da hidratação dos componentes da farinha e das mudanças estruturais induzidas pelo processo mecânico (BELTON, 2005). Durante o amassamento as propriedades do glúten se desenvolvem e ocorre a incorporação de ar à massa (DOBRA SZCZYK; MORGENSTERN, 2003), formando uma massa viscoelástica tridimensional, (SONG; ZHENG, 2007; JOYE et al., 2009) que segura o dióxido de carbono (CO₂) durante a fermentação e ocasiona a expansão da massa (GIL-HUMANES et al., 2011).

As proteínas do glúten desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade do trigo para a panificação, por conferir capacidade de absorção de água, viscosidade e elasticidade na massa (WIESIR, 2007). Segundo Pruska-Kedzior et al. (2008) as propriedades da matriz do glúten estão relacionadas com a qualidade e quantidade das frações protéicas. Apesar de suas proporções poderem variar, as proteínas totais do glúten geralmente representam cerca de 80 % das proteínas totais do grão, sendo aproximadamente 30% gliadinas e 50 % gluteninas (SHEWRY et al., 2009). Collar et al. (2007) relataram que a gliadina atua sobre a viscosidade da massa e a glutenina sobre a elasticidade.

Durante a fermentação que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o açúcar é convertido em etanol, dióxido de carbono, água. O aumento da temperatura expande o gás carbônico e o vapor d'água, que atuam como isolantes prevenindo o aumento excessivo da temperatura e a evaporação da umidade (MONDAL; DATTA, 2008). A mistura também ocasiona a aeração da massa, caracterizada por núcleos de bolhas de ar no miolo do pão (SHEHZAD et al., 2012). O volume do pão é uma das características mais importantes para se determinar a aceitabilidade pelo consumidor (STOJCESKA; BUTLER, 2012) e depende da capacidade da massa em reter o gás por um tempo prolongado durante a fermentação e o cozimento (DELCOUR; HOSENEY, 2010). A duração da fermentação pode impactar na distribuição das células. Assim, uma fermentação mais longa pode resultar em uma menor distribuição das células (LE-BAIL et al., 2009).

1.2. FERMENTO NATURAL

O fermento natural é usado na produção de pães comuns, pães fermentados com a levedura de panificação (como realçador de sabor ou para melhorar a qualidade do pão e em preparações de massa ácida ativa e inativa), pães especiais artesanais (uso do fermento natural como agente levedante natural para melhoria da qualidade sensorial) e tradicionais pães de centeio (obter a capacidade de produção da massa de centeio). Também, bolos e *crackers*, pizza e vários pães doces são produzidos com fermentação natural (GOBBETTI et al., 2005; ARENDT et al., 2007; CORSETTI; SETTANNI, 2007; GÄNZLE et al., 2007; DE VUYST et al., 2009). Muitas formulações e processos variados são utilizados na preparação no fermento natural em todo o mundo (HÄGGMAN; SALOVAARA, 2008).

As fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, ou seja, realizadas pelas leveduras provenientes das cascas das uvas, sem nenhum tipo de inoculação externa (TORIJA, 2003). Para Poutanen et al. (2009), a fermentação espontânea surgiu apenas ativando os micro-organismos existentes nos grãos de cereais moídos. Segundo Lahtinen et al. (2012), aproximadamente 30 % da Europa utiliza essa técnica no preparo de pães. Valmorri et al. (2010) relataram que em algumas regiões da Itália o fermento natural é preparado artesanalmente, para manter e desenvolver a microbiota diversificada típica da região. Tulha et al. (2011) afirmaram que a propagação contínua do fermento natural visa manter os micro-organismos ativos. Dewettinck et al. (2008) concluíram que o conhecimento científico pode ser aplicado no desenvolvimento de novos processos produtivos de fermentos para produtos comerciais.

As vantagens do uso do fermento natural em relação à levedura do pão são: a melhoria da maquinabilidade e da funcionalidade da massa (consistência da massa, resistência à extensão, extensibilidade, elasticidade etc.) (ROBERT et al., 2006); a redução ou a eliminação dos conservantes em produtos de panificação, devido a sua atividade antibacteriana e antifúngica (RYAN et al., 2008, 2009; CHAVAN; CHAVAN, 2011) e a melhoria das propriedades nutricionais, de textura e sensorial em pães contendo farelo (RIZZELLO et al., 2012).

O impacto positivo da utilização do fermento natural é atribuído à microbiota que forma um ecossistema único, consistente em bactérias lácticas (BAL) e leveduras (PARAMITHIOTIS et al., 2010). O fermento natural é uma mistura de farinha e água, fermentado por BAL e leveduras. Os níveis de BAL são maiores que $8 \log$ UFC/ g e a

proporção é geralmente na razão de 100:1 de BAL para leveduras (HANSEN, 2006). Segundo Choi et al. (2012), as propriedades metabólicas das BAL são específicas de cada cepa, por isso a seleção da cultura *starter* é fundamental para o processamento do pão com fermento natural.

O processo de elaboração do fermento natural está relacionado com a sua microbiota, com as suas atividades metabólicas, parâmetros de fermentação e com a matéria-prima. Mudanças em um destes fatores podem afetar a qualidade do pão. As principais atividades metabólicas são: acidificação (BAL), formação de sabor (BAL e leveduras) e levedação (leveduras e BAL), resultando na formação de massas com baixo pH (em média 4,0) e pães com textura e sabor desejável (GOBBETTI et al., 2005; ARENDT et al., 2007; CORSETTI; SETTANNI, 2007; GÄNZLE et al., 2007; DE VUYST et al., 2009).

Estudos microbiológicos demonstraram que foram encontradas mais de 50 espécies de bactérias lácticas, na sua maioria do gênero *Lactobacillus*, e mais de 20 espécies de leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces* e *Candida* (DE VUYST; NEYSENS, 2005). A temperatura adequada para o crescimento de *Lactobacillus* está entre 30 e 40 °C, dependendo da cepa, e para as leveduras entre 25 e 27 °C (CHAVAN; CHAVAN, 2011). Bactérias lácticas produzem ácidos láctico e acético, mantendo, normalmente, o pH abaixo de 5. Leveduras produzem dióxido de carbono e etanol. Interações entre *Lactobacilos* e leveduras são importantes para a atividade metabólica do fermento natural (POUTANEN et al., 2009).

A microbiota do fermento natural depende de fatores endógenos e exógenos (LACAZE et al., 2007). Fatores endógenos são determinados pela composição química e microbiológica da massa e fatores exógenos principalmente pela temperatura. Na prática, os efeitos principais são exercidos pela atividade de água, adição de sal, quantidade e composição do *starter*, número de etapas de propagação e tempo da fermentação (DE VUYST; NEYSENS, 2005). Para Chavan e Chavan (2011), os fatores que afetam a qualidade do fermento são: rendimento da massa, temperatura, tipo da cultura *starter*, acidificação do meio e substrato. Segundo Vogelmann et al. (2009) todos esses fatores, bem como suas interações, contribuem para o desenvolvimento da microbiota. Plessas et al. (2008) relataram que existe uma tendência no desenvolvimento de culturas *starters* que otimizem a fermentação do fermento natural.

Starters são micro-organismos concentrados (bactéria láctica somente ou a combinação com leveduras) para inoculação de massas

ácidas, podendo ser secas, em pastas ou líquidas (KULP; LORENZ, 2003). Segundo Brandt (2007) as culturas *starters* usadas na produção do fermento natural podem ser ativas ou liofilizadas. Clarke et al. (2003) afirmaram que as culturas *starters*, usadas em processos distintos, podem ocasionar diferentes resultados, e por isso devem ser cuidadosamente selecionadas para se obter a qualidade desejada. Vera et al. (2009) afirmaram que durante a fermentação do fermento natural a população microbiana tem necessidades específicas de nutrientes. Além disso, a microbiota do fermento natural é composta por diferentes espécies que podem formar associações entre cepas de BAL ou de BAL e leveduras (DE VUYST et al., 2009).

Seguindo os parâmetros tecnológicos aplicados, o fermento natural foi classificado em três tipos. Tipo I, tradicionalmente preparado à temperatura ambiente (30 °C) e continuamente alimentado; tipo II, é obtido do processo industrial e a fermentação é realizada em temperatura mais elevada (acima de 30 °C) durante um longo período; tipo III, é iniciado por culturas *starters* selecionadas e secas antes do uso (DE VUYST; NEYSENS, 2005; HAMMES et al., 2005; CORSETTI; SETTANNI, 2007). Valmorri et al. (2010) concluíram que o fermento natural é continuamente alimentado com uma mistura de farinha e água ou como semi-líquido usado em preparações com longos períodos de fermentação.

Tulha et al. (2011) afirmaram que em áreas rurais de Portugal o pão de centeio e de milho é preparado utilizando um pedaço de massa crua antiga, que é mantida sob refrigeração e coberta com uma camada de sal. Antes do preparo do pão é necessário ativar esse fermento, misturando água e farinha, servindo de inóculo para a massa do pão. Esse processo também é utilizado no Brasil, onde é chamado de isca de massa. O processo de fermentação ocorre em condições não-assépticas, podendo existir associações na microbiota por muitos anos (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). O tempo de fermentação desse fermento e o tempo final de fermentação da massa exercem influência significativa no pH do pão (CLARKE et al., 2003).

Hansen e Hansen (1994) relataram que o tipo da farinha influencia na produção de ácidos no fermento natural e que a concentração de ácido láctico foi 30 a 50 % maior em pães feitos com farinha integral do que com farinha branca. Banu et al. (2011) e Plessas et al. (2011a) afirmaram que o uso de 20 % de fermento natural origina produtos com as características adequadas.

Simonsom et al. (2003) pesquisaram o uso do sal em fermento natural industrial de centeio e concluíram que o sal influencia o

crescimento das BAL e a produção de ácido, podendo ser utilizado no controle da acidez do pão. A acidez titulável foi mínima com a utilização de 3,2 % de sal, porém, ao usar em conjunto com 6 % de sacarose, ocasionou aumento da acidez, devido a produção de ácido acético.

1.3 BACTÉRIA LÁTICA

Bactérias lácticas têm uma história antiga de uso na fermentação de cereais, especialmente na elaboração de produtos de panificação de qualidade (GOBBETTI et al., 2005). Como organismos de biopreservação, as BAL são utilizadas como culturas *starters* na indústria de alimentos e são capazes de produzir diferentes tipos de moléculas bioativas, como ácidos orgânicos, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (HASSAN; BULLERMAN, 2008).

As bactérias lácticas são Gram-positivas, quase sempre catalase negativas, não formadoras de esporos e acumulam ácido láctico no ambiente em que crescem, como produto do metabolismo primário. Todos os componentes do grupo láctico são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos, como vegetais, leite, carne e trato intestinal. São anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas (SAAD, 2006).

Malik et al. (2012) afirmaram que as BAL causam rápida acidificação da matéria-prima através da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. Além disso, também é importante a produção de ácido acético, etanol, compostos aromáticos, bacteriocinas e várias enzimas. Segundo Corsetti e Setanni (2007), a razão entre ácido láctico e acético é um importante fator que afeta o aroma final do pão. As bactérias lácticas são capazes de produzir uma grande variedade de compostos originados de alimentos fermentados, com o sabor característico de fermento natural e melhoria na segurança e na reologia dos alimentos (ARENDRT et al., 2007). Scheirlinck et al. (2007) afirmaram que cepas específicas de BAL persistem em massas artesanais durante anos, permanecendo no ambiente da padaria.

Os *Lactobacillus* (*Lb.*) podem ser divididos em três grupos, tendo como critério o produto final da sua fermentação: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses e ácido láctico (*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* e *Lb. helveticus*); *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, CO₂,

álcool e H_2O_2 (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. plantarum*) e *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO_2 , e pentoses a ácido láctico e ácido acético (*Lb. brevis* e *Lb. fermentum*) (FOX et al., 2000). Segundo Reale et al (2011), os *Lactobacillus* representam o grupo dominante na microbiota, especialmente em fermento natural maduro.

As bactérias mais encontradas nos fermentos naturais são as mesófilas, incluindo as Gram-negativas aeróbias (*Pseudomonas*), facultativas anaeróbias (*Enterobactérias*) e as bactérias lácticas Gram-positivas homofermentativas e heterofermentativas, além das indesejáveis *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Dos fermentos naturais elaborados com farinha de trigo e centeio, *Lb. sanfranciscensis* foi a bactéria láctica mais isolada (CORSETTI et al., 2001). Kline e Sugihara (1971) isolaram *Lb. sanfranciscensis* como a primeira cepa de um fermento natural. A *Lb. sanfranciscensis* é interessante por contribuir positivamente na acidificação heteroláctica, no *flavour*, na proteólise, na textura e nas propriedades nutricionais dos produtos panificáveis (SIRAGUSA et al., 2009).

1.4 LEVEDURA

As leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Não possuem flagelo e caracterizam-se por uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como: água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). As leveduras, no seu habitat natural, vivem como saprófitas em plantas ou animais (TULHA et al., 2011).

São microrganismos capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, podendo utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons, o que os torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais. Na ausência de oxigênio as leveduras fermentam os carboidratos e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo úteis em processos industriais principalmente na área de alimentos (AIDOO et al., 2006).

As leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* são unicelulares e são encontradas na natureza em frutas cítricas, cereais e vegetais. São espécies de valor econômico, uma vez que algumas cepas são utilizadas em muitos processos industriais na elaboração de produtos fermentados (BROCK, 1994). A *S. cerevisiae* é a levedura mais comum usada no preparo dos pães. Células da levedura metabolizam açúcares fermentáveis (glicose, frutose, sacarose e maltose) e sob condições anaeróbias produzem dióxido de carbono, que atua como um agente levedante fornecendo volume à massa (CHAVAN; JANA, 2008).

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como “microrganismo geralmente considerado seguro” (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Para Vrancken et al. (2010), a presença de *S. cerevisiae* no fermento natural de padaria pode ser ocasionada pela contaminação do ambiente com levedura comercial, enquanto as leveduras do fermento natural de laboratório, que é processado em condições assépticas, devem ser originadas da farinha, que é um ingrediente não estéril.

Leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Sporobolomyces* foram detectadas na quantidade aproximada 4,95 log UFC/ g em cereais e 3,30 log UFC/ g nas farinhas. A *S. cerevisiae* não foi encontrada nas matérias-primas, mas é aplicada no preparo do fermento natural (CORSETTI et al., 2001).

1.5 MICROBIOTA DO FERMENTO NATURAL

As técnicas empregadas para a caracterização de microrganismos podem ser reunidas em três grupos: métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização fenotípica; métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização molecular e métodos que envolvem somente a caracterização molecular (BERESFORD et al., 2001). A combinação de testes fenotípicos e genotípicos é necessária para determinar espécies (BERNARDEAU et al., 2008). O crescente interesse em culturas *starters* para fermentação natural requer melhor detalhamento sobre a diversidade fenotípica e genética das cepas para exploração nos processos tecnológicos (SCHEIRLINCK et al., 2007).

O API® (Biomérieux, França) consiste em um sistema comercial de identificação, que consiste em uma galeria com diferentes

conjuntos de substratos miniaturizados (EIGNER et al., 2005). É um sistema padronizado que associa 50 testes bioquímicos em microtubos, ocorrendo a fermentação de carboidratos e, assim, a identificação da espécie (ZANINI et al., 2012). Entis et al. (2002) afirmaram que o API é um sistema de diagnóstico muito utilizado para identificar isolados alimentícios, ambientais e industriais. Esta galeria vem sendo amplamente testada com exatidão de resultados de 90,2 a 93 %.

O uso de métodos moleculares representa um grande avanço e tem aumentado a qualidade e a eficiência da identificação microbiana (BERNARDEAU et al., 2008). A identificação utilizando PCR (Reação em cadeia da polimerase) comparada à identificação da fermentação de carboidratos é mais precisa e rápida, pois a fermentação de carboidratos demonstra ser subjetiva devido às variações, principalmente na diferenciação das amostras de *Lactobacillus* spp. (BARROS et al., 2009). PCR é uma metodologia in vitro que amplifica enzimaticamente uma sequência específica de DNA através do uso de *primers* que flanqueiam a região de interesse do DNA alvo (KOCHER; WILSON, 1991).

Muitas pesquisas com identificação da microbiota do fermento natural tem sido realizadas em vários países, como na Itália (REALE et al., 2011; IACUMIN et al., 2009), Tailândia (LUANGSAKUL et al., 2009), China (ZHANG et al., 2011) e França (VERA et al., 2012).

Saeed et al. (2009) identificaram BAL e leveduras em um fermento natural utilizando o kit API, e observaram que 46 % dos isolados corresponderam à *Lb. brevis*, 24 % à *Lb. plantarum* e 8 % à *Lb. fermentum*. Somente a *S. cerevisiae* foi identificada no grupo das leveduras, sendo isso relacionado ao fato da adição desta levedura no preparo desse fermento natural. Utilizando a mesma técnica, Lu et al. (2008) encontraram *Lb. plantarum* e *S. cerevisiae* como as espécies dominantes e Simonsom et al. (2003) identificaram *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp *paracasei* e *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii*. Segundo Endo et al. (2011), os carboidratos têm um grande impacto no isolamento e na variedade da BAL em alimentos fermentados.

Edema e Sanni (2006) identificaram no fermento natural de milho, durante a fermentação de 48 h a 28 °C, 34 bactérias lácticas de 15 espécies diferentes e 13 leveduras de 9 espécies. Entre os micro-organismos predominantes foram encontrados *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* e *S. cerevisiae*.

Nas amostras de fermento natural da Bélgica foram encontradas as espécies heterofermentativas: *Lb. paralimentarius*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. plantarum* e *Lb. pontis* (SCHEIRLINCK et al., 2007).

Corsetti et al. (2001) identificaram no fermento natural composições próximas de micro-organismos. *Lb. sanfranciscensis* foram encontrados em maior quantidade, seguido de *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis* e *Leuconostoc citreum*. Também isolaram 19 leveduras, sendo que 17 delas correspondiam a *S. cerevisiae*. As outras espécies identificadas foram *S. exiguus* e *Candida krusei*. *S. cerevisiae* foi a espécie de levedura mais isolada das massas ácidas estudadas por Rosenquist e Hansen (2000).

Lu et al. (2008) caracterizaram fenotipicamente 170 BAL e 96 leveduras no macarrão de arroz fermentado da China, chamado de *mifen*, sendo que *Lb. plantarum* e *S.cerevisiae* foram as espécies predominantes.

Plessas et al. (2008) aplicaram, no fermento natural, a levedura *Kluyveromyces marxianus* e as BAL homofermentativas *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Lb. helveticus* e concluíram que no teste sensorial o pão com 1 % de *Kluyveromyces marxianus* e 4 % de *Lb. bulgaricus* ou *Lb. helveticus* tiveram resultados positivos com relação aos atributos sabor e aroma.

Ontiveros-Martínez et al. (2011) pesquisaram o uso do fermento natural elaborado com *Lb. sanfranciscensis* em *tortillas*, e verificaram que o produto com menor concentração de fermento natural (5 %) e com menor tempo de fermentação (1 h) obteve a melhor aceitabilidade no atributo aroma.

Os pães preparados com cultura mista de *Lb.acidophilus* (10 %) e *Lb. sakei* (10 %) apresentaram pH de 3,9, obtendo as melhores características organolépticas no teste sensorial (PLESSAS et al., 2011b).

O valor de pH do fermento natural da Grécia variou de 3,56 a 3,71 e a acidez titulável total (ATT) variou de 14,5 a 19,3 mL 0,1 N NaOH/ 100g. A população de BAL e leveduras variou de 8,23 a 8,51 e de 7,00 a 7,87 log UFC/ g, respectivamente (PARAMITHIOTIS et al., 2010). Saeed et al. (2009) pesquisaram 15 amostras de fermento natural do Paquistão, e constataram que a contagem de BAL variou de 4,8 a 7,84 log UFC/ g, e das leveduras variou de 3,8 a 7,9 log UFC/ g. Iacumin et al. (2009) pesquisaram fermento natural na Itália e encontraram contagens de BAL variando entre 3 e 9 log UFC/ g, e de levedura variando de 7 log UFC/ g. Edema e Sanni (2008) verificaram o

crescimento microbiano em fermento natural de milho em 48 h de fermentação. A contagem em placa de BAL aumentou de 4,62 log UFC/ g no tempo inicial (0 h) para 6,45 log UFC/ g após 48 h de fermentação, enquanto a contagem de leveduras aumentou de 4,18 log UFC/ g para 6,64 log UFC/ g no mesmo período.

Na produção de pão de trigo, o uso de fermento natural tem se mostrado um inibidor da contaminação causada pelo *Bacillus* (*B.*) *subtilis* e *B. licheniformis* (ROSENQUIST; HANSEN, 2000). Pepe et al. (2003) observaram a inibição da contaminação ocasionada pelo *B. subtilis* em pães produzidos com *Lb. plantarum* e *Lb. mesenteroides* associado com *S. cerevisiae*. A atividade antimicrobiana de *Lb. plantarum* também foi pesquisada por Dal Bello et al. (2007).

1.6 QUALIDADE FÍSICA, QUÍMICA E SENSORIAL DE PÃES

Reologia é uma ferramenta de estudo que relaciona as propriedades de textura e análises físico-químicas (EVERETT; AUTY, 2008). Upadhyay et al. (2012) relataram que a massa de pão tem um comportamento viscoelástico, combinando as propriedades de um fluido viscoso e um sólido elástico. As propriedades reológicas da massa indicam o potencial de aplicação da farinha de trigo (REGIER et al., 2007), o comportamento da massa durante o processo de manuseio mecânico (STOJCESKA et al., 2007) e a qualidade do produto final (MOHAMMED et al., 2012).

Características reológicas como elasticidade, consistência e extensibilidade são importantes para as indústrias de panificação (HRUŠKOVÁ; ŠMEJDA, 2003). Diversas pesquisas utilizam equipamentos como farinógrafo, alveógrafo, extensógrafo e mixógrafo nas análises reológicas de farinhas, a fim de verificar as propriedades dos produtos de panificação (DOBRA SZCZYK; MORGENSTERN, 2003; INDRANI; RAO, 2007; KOMLENIĆ et al., 2010; RAZMI-RAD et al., 2007; STOENESCU; IONESCU, 2011).

A análise de farinografia verifica as propriedades de mistura da massa. Para a interpretação da curva farinográfica alguns parâmetros são avaliados: absorção de água (ABS), que consiste na quantidade de água necessária para a farinha ser transformada em um produto final; tempo de chegada (TC), que indica o tempo registrado quando o topo da banda alcança a linha de consistência de 500 UB a partir do início da adição de água; tempo de desenvolvimento da massa (TD), que indica o tempo em que a massa alcança a consistência máxima; estabilidade (EST), que é a diferença entre o tempo de chegada e o tempo de saída e indica a força

da massa; índice de tolerância à mistura (ITM), que indica a diferença entre o topo da curva no pico e o topo da curva medido 5 min após o pico ser alcançado (NAEGA, 2008).

A análise de alveografia verifica o comportamento da massa na fermentação (GUTKOSKI; JACOBSEN NETO, 2002). Os parâmetros obtidos na alveografia são: tenacidade (P), que mede a pressão máxima exercida na expansão da massa (mm); extensibilidade (L), que mede o comprimento da curva (mm), ou seja, a capacidade da massa em se esticar; e a energia de deformação da massa (W), que corresponde ao trabalho mecânico necessário para expandir a bolha até a ruptura, expressa em 10^{-4} J (NAEGA, 2008).

A adição de fermento natural na massa ocasiona melhorias nas propriedades reológicas (KOMLENIC et al., 2010), principalmente durante a produção de pão de trigo (CLARKE et al., 2002; CLARKE et al., 2004; KETABI et al., 2008). A acidificação e a redução de ligações dissulfureto do glúten por *Lactobacillos* heterofermentativos aumentam a atividade de proteases dos cereais e acessibilidade ao substrato (GÄNZLE et al., 2008). Para Mondal e Datta (2008), as propriedades reológicas da massa estão relacionadas ao volume específico e a textura dos produtos de panificação.

A textura pode ser definida como todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto, perceptível por meios instrumentais e sensoriais (ESTELLER et al., 2004a). O procedimento para determinação da firmeza e demais parâmetros de textura consiste em submeter os pães à compressão, e analisar a curva força-tempo resultante (ESTELLER et al., 2004b).

Mondal e Datta (2008) relataram que no preparo de pães a água e a farinha são os ingredientes principais que afetam a textura e o miolo. A aparência e a textura final do pão dependem das bolhas formadas na massa, que são criadas durante os processos de descanso e cozimento (MARTIN, 2004).

A maciez da crosta e a firmeza do miolo são mudanças que ocorrem na textura dos pães devido ao seu envelhecimento. A retrogradação não é o único fator relacionado ao envelhecimento do pão (BAIK; CHINACHOTI, 2000). Ronda et al. (2011) afirmaram que a água também exerce um papel importante no envelhecimento. Segundo Ribotta e Le Bail (2007), a retrogradação da amilopectina é o principal fenômeno envolvido na firmeza do pão. As moléculas de água são incorporadas na região cristalina e a distribuição de água é deslocada do glúten para o amido/ amilopectina, mudando assim a natureza da rede de glúten (GRAY; BEMILLER, 2003).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada para observar a morfologia de amostras espessas, ou seja, das amostras não transparentes ao feixe de elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução e à grande profundidade de foco, o que proporciona imagens tridimensionais. O equipamento consiste em uma coluna óptica eletrônica, com sistema de vácuo, controle eletrônico e sistema de imagens (GOODHEW; HUMPHREYS, 1988). Berglund et al. (1990) afirmaram que no preparo das amostras é necessário que elas estejam desidratadas ou liofilizadas e expostas a fixadores.

Através de técnicas microscópicas é possível verificar a estrutura da rede do glúten, células de gás, estruturas celulares e gelatinização do amido (AUTIO; LAURIKAINEN, 1997). Kontogiorgos et al. (2008) relataram que os espaços vazios existentes nas imagens correspondem aos espaços ocupados por bolsas de água, no caso de massas congeladas, ou por inclusão de ar na massa.

A análise da estrutura do pão utilizando a microscopia eletrônica de varredura tem sido estudada por vários pesquisadores (INDRANI et al., 2003; KIM et al., 2003; ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012).

A aparência superficial e a cor são os primeiros parâmetros de qualidade avaliados pelos consumidores e, portanto, são fatores críticos para a aceitação do alimento. Embora a visualização humana ainda seja considerada adequada, mudanças na iluminação a tornam subjetiva e variável. Desta forma é recomendável que a análise da cor seja feita através do uso de um instrumento de medida de cor (LEÓN et al., 2006).

A cor é uma característica importante nos produtos de panificação, pois junto com a textura e o aroma contribui para a preferência do consumidor (ESTELLER et al., 2006). Para Komlenić et al. (2010) a adição de fermento natural seco na massa do pão influencia na redução da luminosidade da massa.

A análise sensorial é uma ferramenta utilizada para o desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudo de vida de prateleira, determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação das preferências dos consumidores por determinado produto, otimização e melhoria da qualidade (MEILGAARD et al., 2007).

Os testes sensoriais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como “instrumentos”, e devem ser incluídos como garantia de qualidade por expressar uma medida multidimensional integrada que possui

importantes vantagens como, por exemplo, determinar a aceitação de um produto por parte dos consumidores (CARDELLO; CARDELLO, 1998).

Aceitação e preferência estão entre os mais importantes testes para determinar a escolha de alimentos (HEIN et al., 2008). A aceitabilidade pode ser feita para um único produto e não requer comparação entre produtos. O teste de preferência é aplicado em comparações diretas entre um produto e outro com a finalidade de aperfeiçoamento ou com produtos competitivos, forçando uma escolha de um dos itens sobre outro ou outros produtos avaliados (MEILGAARD et al., 2007).

REFERÊNCIAS

AIDOO, K.E.; ROB, N.M.J.; SARKAR, P.K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 30-39. 2006.

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; LE-BAIL, A.; CHEVALLIER, S.; ROSELL, C.M. Effect of the amount of steam during baking on bread crust features and water diffusion. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 128-134, 2012.

ARENDDT, E.K.; LIAM, A.M.R.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, p. 165-174, 2007.

AUTIO, K.; LAURIKAINEN, T. Relationships between flour/ dough microstructure and dough handling and baking properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 181-185, 1997.

BAIK, M.Y.; CHINACHOTI, P. Moisture redistribution and phase transitions during bread staling. **Cereal Chemistry**, v. 77, p. 484-488, 2000.

BANU, I.; VASILEAN, I.; APRODU, I. Quality evaluation of the sourdough rye breads. **Food Technology**, v. 35, p. 94-105, 2011.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OLIVEIRA, D.E.; LIMA, E.T.; CROCCI, A.J. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp.

isolados de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.319-325, 2009.

BECK, M.; JEKLE, M.; BECKER, T. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes. **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, p. 585-592, 2012.

BELTON, P.S. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 203-211, 2005.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p. 259-274, 2001.

BERGLUND, P.T.; SHELTON, D.R.; FREEMAN, T.P. Comparison of two sample preparation procedures for low-temperature scanning electron microscopy of frozen bread dough. **Cereal Chemistry**, v. 62, p.139-140, 1990.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278–285, 2008.

BIANCHINI, M.C. **Desenvolvimento de fermento natural seco para produção de panetone**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

BRANDT, M. J. Sourdough products for convenient use in baking. **Food Microbiology**, v. 24, p. 161-164, 2007.

BRASIL. Decreto Estadual em Santa Catarina n. 31455/ 1987, de 20 de dezembro de 1983. Regulamenta os artigos 30 e 31 da Lei n° 6.320, de 20 de dezembro de 1983, que dispõem sobre Alimentos e Bebidas. **Diário Oficial do Estado**, Santa Catarina. Disponível em: http://www.pge.sc.gov.br/index.php?option=com_wrapper&Itemid=163 . Acesso em 10 de junho de 2010.

BROCK, T. D. **Biology of microorganisms**. Library of Congress Catalogue publication. 7 ed. New Jersey, 1994. 900p.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica L.*) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p.211-217, 1998.

CHAVAN, R.S; CHAVAN, S.R. Sourdough Technology - A traditional way for whole some foods: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.169-182, 2011.

CHAVAN, R.S.; JANA A. Frozen dough for bread making – a review. **International Journal Food Science, Technology and Nutrition**, v. 2, p. 9-27, 2008.

CHOI, H.; KIM, Y.W.; HWANG, I.; KIM, J.; YOON, S. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2208-2216, 2012.

CLARKE, C.I.; SCHOBER, T.J.; ANGST, E.; ARENDT, E.K. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. **European Food Research Technology**, v.217, p.23-33, 2003.

CLARKE, C.I.; SCHOBER, T.J.; ARENDT, E.K. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 640-647, 2002.

CLARKE, C. I.; SCHOBER, T. J.; DOCKERY, P.; O'SULLIVAN, K.; ARENDT, E. K. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 409-417, 2004.

COLLAR, C.; BOLLAIN, C.; ROSELL, C.M. Rheological behaviour of formulated bread doughs during mixing and heating. **Food Science and Technology International**, v. 13, p. 99-107, 2007.

CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N.; GOBBETTI, M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdough of southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 95-104, 2001.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, p. 539-558, 2007.

DAL BELLO, F.; CLARKE, C.I.; RYAN, L.A.M.; ULMER, H.; SCHOBER, T.J.; STROM, K.; SJOGREN, J.; SINDEREN, D.V.; SCHNURER, J.; ARENDT, E.K. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. **Journal of Cereal Science**, v.45, p. 309-318, 2007.

DELCOUR, J.A.; HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**. 3 ed., AACC International, St Paul, MN, USA, 2010. 261p.

DE VALDEZ, G. F.; GEREZ, C. L.; TORINO, M. I.; ROLLÁN, G. **New trends in cereal based products using lactic acid bacteria**. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. Wiley-Blackwell, Iowa, 2010, 408p.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p. 43-56, 2005.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 24, p. 120-127, 2007.

DE VUYST, L.; VRANCKEN, G.; RAVYTS, F.; RIMAU, T.; WECKX, S. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. **Food Microbiology**, v. 26, p. 666-675, 2009.

DEWETTINCK, K.; VAN BOCKSTAELE, F.; KÜHNE, B.; VAN DE WALLE, D.; COURTENS, T. M.; GELLYNCK, X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. **Journal Cereal Science**, v. 48, p.243-257, 2008.

DOBRA SZCZYK, B.J.; MORGENSTERN, M.P. Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v. 38, p. 229-245, 2003.

DUYVEJONCK, A. E.; LAGRAIN, B.; DORNEZ, E.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. **Suitability of solvent retention capacity tests to assess the cookie and bread making quality of European wheat flours**. *LWT - Food Science and Technology*, v. 47, p. 56-63, 2012.

EDEMA, M.O.; SANNI, A. I. Micro-population of fermenting maize meal for sour maize bread production in Nigeria. **Nigerian Journal Microbiology**, v.20, p. 937-946, 2006.

EDEMA, M.O.; SANNI, A.I. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. **Food Microbiology**, v. 25, p. 616-625, 2008.

EIGNER, U.; SCHIMD, A.; WILD, A.; BERTSCH, D.; FAHR, A.M. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and phoenix system. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 43, p. 3829-3834, 2005.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L.M.T. Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 110, p. 1085-1092, 2011.

ENTIS, P.; FUNG, D.Y.C.; GRIFFITHS, M.W.; MCINTYRE, L.; RUSSEL, S.; SHARPE, A.N.; TORTORELLO, M.L. **Rapid methods for detection, identification and enumeration**. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. p. 89-126. 2002.

ESTELLER, M.S.; AMARAL, R.L.; LANNES, S.C.S. Effect of sugar and fat replacers on the texture of baked goods. **Journal of Texture Studies**, 35, p. 383-393, 2004a.

ESTELLER, M.S.; YOSHIMOTO, R.M.O.; AMARAL, R.L.; LANNES, S.C.S. Uso de açúcares em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p.602-607, 2004b.

ESTELLER, M. S.; ZANCANARO JUNIOR, O.; PALMEIRA, C. N. S.; LANNES, S. C. da S. The effect of kefir addition on microstructure parameters and physical properties of porous white Bread. **Europe Food Research and Technology**, v. 222, p. 26-31, 2006.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A.E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, v.18, p. 759-773, 2008.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000, 559 p.

GÄNZLE, M.G.; LOPONEN, J.; GOBBETTI, M. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. 513-521, 2008.

GÄNZLE, M.G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R.F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, v. 24, p.128-138, 2007.

GEREZ, C.L.; TORINO, M.I.; ROLLÁN, G.; DE VALDEZ, G. F. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control**, v. 20, p.144-148, 2009.

GIL-HUMANES, J.; PISTÓN, F.; SHEWRY, P. R.; TOSI, P.; BARRO, F. Suppression of gliadins results in altered protein body morphology in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4203-4213, 2011.

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p.57-69, 2005.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 12-30, 2005.

GOODHEW P. J., HUMPHERYS F. J. **Electron microscopy and analysis**. Taylor Francis, 1988. 232p.

GRAY, J.A.; BEMILLER, J.N. Bread staling: molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p.1-21, 2003.

GUTKOSKI, L. C.; JACOBSEN NETO, R. Procedimento para teste laboratorial de panificação - pão tipo forma. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 873-879, 2002.

HAGER, A. S.; WOLTER, A.; CZERNY, M.; BEZ, J.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K.; CZERNY, M. Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. **Europe Food Research and Technology**, v.235, p. 333-344, 2012.

HÄGGMAN, M.; SALOVAARA, H. Microbial re-inoculation reveals differences in the leavening power of sourdough yeast strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 148-154, 2008.

HAMMES, W.P.; BRANDT, M.J.; FRANCIS, K.L.; ROSENHEIM, J.; SEITTER, M.F.H.; VOGELMANN, S.A. Microbial ecology of cereal fermentations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 4-11, 2005.

HANSEN, A.; HANSEN, B. Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. **Journal Cereal Science**, v.19, p.185-190, 1994.

HANSEN, A. **Sourdough bread**. In: HUI, Y. H.; SHERKA, F. Handbook of food science, technology and engineering. 4 ed., Taylor and Francis Group, LLC, 2006, 928p.

HASSAN, Y. I.; BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. tolerans isolated from a sourdough bread culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.112-115, 2008.

HEIN, K. A.; JAEGER, S. R.; CARR, B. T.; DELAHUNTY C. M. Comparison of five common acceptance and preference methods. **Food Quality and Preference**, v. 19, p. 651-661, 2008.

HRUŠKOVÁ, M.; ŠMEJDA, P. Wheat flour dough alveograph characteristics predicted by NIR systems 6500. **Czech Journal Food Science**, v.21, p. 28-33, 2003.

IACUMIN, L.; CECCHINI, F.; MANZANO, M.; OSUALDINI, M.; BOSCOLO, D.; ORLIC, S.; COMI, G. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 26, p. 128-135, 2009.

INDRANI, D.; PRABHASANKAR, P.; RAJIV, J.; RAO, G. V. Scanning electron microscopy, rheological characteristics, and bread-baking performance of wheat-flour dough as affected by enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2804-2809, 2003.

INDRANI, D.; RAO, G.V. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of parotta. **Journal Food Engineering**, v. 79, p. 100-105, 2007.

JEKLE, M.; BECKER, T. Effects of acidification, sodium chloride, and moisture levels on wheat dough: II. Modeling of bread texture and staling kinetics. **Food Biophysics**, v. 7, p. 200-208, 2012.

JOYE, I. J.; LAGRAN, B.; DELCOUR, J. A. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p.11-21, 2009.

KETABI, A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; KADIVAR, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. **Food Research International**, v. 41, p. 948-951, 2008.

KIM, H. J.; MORITA, N.; LEE, S. H.; MOON, K. D. Scanning electron microscopic observations of dough and bread supplemented with *Gastrodia elata* Blume powder. **Food Research International**, v. 36, p. 387–397, 2003.

KLINE, L.; SUGIHARA, T. F. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. **Applied Microbiology**, v.21, p. 459-465, 1971.

KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. **DNA amplification by the polymerase chain reaction**. In: BROWN, T.A. Essential molecular biology – A practical approach. New York: Oxford University, v.2, 1991, 296p.

KOMLENIĆ, D.K.; UGARČIĆ-HARDI, Ž.; JUKIĆ, M.; PLANINIĆ, M.; BUCIĆ-KOJIĆ, A.; STRELEC, I. Wheat dough rheology and bread quality effected by *Lactobacillus brevis* preferment, dry sourdough and lactic acid addition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1417-1425, 2010.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.D.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical propertiers of frozen flour-water mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1135-1147, 2008.

KULP, K.; LORENZ, K. **Handbook of dough fermentations**. Marcel Dekker, INC, 2003, 328 p.

LACAZE, G.; WICKA, M.; CAPPELLE, S. Emerging fermentation technologies: development of novel sourdough. **Food Microbiology**, v. 24, p.155-160, 2007.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V. Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. 4 ed, CRC Press, 2012, 761p.

LE-BAIL, A.; BOUMALI, K.; JURY, V.; BEN-AISSA, F.; ZUNIGA, R. Impact of the baking kinetics on staling rate and mechanical properties of bread crumb and degassed bread crumb **Journal of Cereal Science**, v. 50, p.235-240, 2009.

LEÓN, K.; MERY, D.; PEDRESCHI, F; LEÓN J. Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. **Food Research International**, v. 39, p. 1084-1091, 2006.

LU, Z. H.; PENG, H. H.; CAO, W.; TATSUMI, E.; LI, L.T. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from

sour *Mifen*, a traditional fermented rice noodle from China. **Journal Applied Microbiology**, v.105, p. 893-903, 2008.

LUANGSAKUL, N.; KEERATIPIBUL, S.; JINDAMORAKOT, S.; TANASUPAWAT, S. Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for chinese steamed buns in Thailand. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1404-1412, 2009.

MALIK, D. K.; BHATIA, D; NIMBRIYA, A.; KUMAR, S. Lactic acid bacteria and bacteriocin: A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, p. 2510-2513, 2012.

MANDALA, I.; POLAKI, A.; YANNIOTIS, S. Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 137-145, 2009.

MARTIN, P. Controlling the breadmaking process: the role of bubbles in bread. **Cereal Foods World**, v. 49, p.72-75, 2004.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4 ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, 448p.

MILLER, R.A.; HOSENEY, R.C. Role of salt in baking. **Cereal Foods World**, v. 53, p. 4-6, 2008.

MOHAMMED, I.; AHMED, A. R.; SENGE, B. Dough rheology and bread quality of wheat-chickpea flour blends. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p.196-202, 2012.

MONDAL, A.; DATTA, A.K. Review Bread baking – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 465-474, 2008.

MORITA, N.; MAEDA, T.; MIYAZAKI, M.; YAMAMORI, M.; MJURA, H.; OHTSUKA, I. Dough and baking properties of highamylose and waxy wheat flour. **Cereal Chemistry**, v.79, p. 491-495, 2002.

NAEGA. **The North American export grain association**. Wheat and flour testing methods: A guide to understanding wheat and flour quality: 2008. Disponível em <http://www.wheatflourbook.org/doc.aspx?Id=201>. Acesso em 14 de setembro de 2012.

ONTIVEROS-MARTÍNEZ, M. DEL R.; OCHOA-MARTÍNEZ, L. A.; GONZÁLEZ-HERRERA, S. M.; DELGADO-LICON, E.; BELLO-PÉREZ, L. A., MORALES-CASTRO, J. Effect of sourdough on quality and acceptability of wheat flour tortillas. **Journal of Food Science**, v.76, p. 1278-1283, 2011.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.

PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINOS E.H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **Europe Food Research Technology**, v. 231, p. 883-890, 2010.

PEPE, O.; BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; GRECO, T.; VILLANI, F. Rope-producing strains of *Bacillus* species from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2321-2329, 2003.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; BEKATOTOU, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.A.; BEZIRTZOGLU, E. Examination of freshness degradation of sourdough bread made with kefir through monitoring the aroma volatile composition during storage. **Food Chemistry**, v.124, p. 627-633, 2011a.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Application of novel starter cultures for sourdough bread production. **Anaerobe**, v. 17, p. 486-489. 2011b.

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; POONAM, N.; ATHANASIOS, A.K. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, p. 985-990, 2008.

POUTANEN, K.; FLANDER, L.; KATINA, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. **Food Microbiology**, v. 26, p. 693-699, 2009.

PRUSKA-KEDZIOR, A.; KEDZIOR, Z.; KLOCKIEWICZ-KAMINSKA, E. Comparison of viscoelastic properties of gluten from

spelt and common wheat. **European Food Research Technology**, v. 277, p. 199-207, 2008.

RAZMI-RAD, E.; GHANBARZADEH, B.; MOUSAVI, S.M.; EMAM-DJOMEH, Z.; KHAZAEI, J. Prediction of rheological properties of Iranian bread dough from chemical composition of wheat flour by using artificial neural networks. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 728-734, 2007.

REALE, A.; DI RENZO, T.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 237-244, 2011.

REGIER, M.; HARDY, E.H.; KNOERZER, K.; LEEB, C.V.; SCHUCHMANN, H.P. Determination of structural and transport properties of cereal products by optical scanning, magnetic resonance imaging and Monte Carlo simulations. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 485-491, 2007.

RIBOTTA, P. D.; LE BAIL, A. Thermo-physical assessment of bread during staling **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 879-884, 2007.

RIZZELLO, C.G.; CODA, R.; MAZZACANE, F.; MINERVINI, D.; GOBBETTI, M. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. **Food Research International**, v. 46, p. 304-313, 2012.

ROBERT, H.; GABRIEL, V.; LEFEBVRE, D.; RABIER, P.; VAYSSIER, Y.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 256-265, 2006.

RONDA, F.; CABALLERO, P. A.; QUILEZ, J.; ROOS, Y. H. Staling of frozen partly and fully baked breads. Study of the combined effect of amylopectin recrystallization and water content on bread firmness **Journal of Cereal Science**, v. 53 p. 97-103, 2011.

ROSELL, C. M.; SANTOS, E. Impact of fibers on physical characteristics of fresh and staled bake off bread. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 273-281, 2010.

ROSENQUIST, H.; HANSEN, A. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. **Food microbiology**, v. 17, p. 241-250, 2000.

RYAN, L.A.M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E.K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. **International Journal Food Microbiology**, v. 125, p. 274-8, 2008.

RYAN, L.A.M.; DAL BELLO, F.; CZERNY, M.; KOEHLER, P.; ARENDT, E.K. Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p.1060-1064, 2009.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 01-16, 2006.

SAEED, M.; ANJUM, F.M.; ZAHOOR, T.; NAWAZ, H.; REHMAN, S.U. Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. **International Journal Agriculture Biology**, v. 11, p. 329-332, 2009.

SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; VAN SCHOOR, A.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. **Applied Environment Microbiology**, v. 73, p. 6262-6269, 2007.

SHEHZAD, A.; CHIRON, H.; DELLA VALLE, G.; LAMRINI, B.; LOURDIN, D. Energetical and rheological approaches of wheat flour dough mixing with a spiral mixer. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 60-70, 2012.

SHEWRY, P.R.; D'OVIDIO, R.; LAFIANDRA, D.; JENKINS, J.A.; MILLS, E.N.C.; BEKES, F. **Wheat grain proteins**. In: Khan, K.; Shewry, P.R. In: *Wheat chemistry and technology*. 4 ed, St Paul, MN: AACC International Inc., 2009, 467p.

SIMONSON, L.; SALOVAARA, H. KORHOLA, M. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. **Food microbiology**, v.20, p.193-199, 2003.

SIRAGUSA, S.; DI CAGNO, R.; ERCOLINI, D.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1099-1109, 2009.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 132-138, 2007.

SROAN, B.S.; BEAN, S.R.; MACRITCHIE, F. Mechanism of gas cell stabilization in breadmaking. I. The primary gluten-starch matrix. **Journal Cereal Science**, v. 49, p.32-40, 2009.

STOENESCU, G.; IONESCU, V.S. Rheological properties of the wheat flour supplemented with different additives. **Food Technology**, v. 35, p.54-62, 2011.

STOJCESKA, V.; BUTLER, F. Investigation of reported correlation coefficients between rheological properties of the wheat bread doughs and baking performance of the corresponding wheat flours. **Trends in Food Science and Technology**, v. 24, p. 13-18, 2012.

STOJCESKA, V.; BUTLER, F.; GALLAGHER, E.; KEEHAN, D. A comparison rheological measurements of wheat dough to predict baking behaviour. **Journal of the Food Engineering**, v. 83, p. 475-482, 2007.

TORIJA, M. J.; ROZEZ, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on de strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 6 ed. California: Art Méd, 2002.

TULHA, J.; CARVALHO, J.; ARMADA, R.; FARIA-OLIVEIRA, F.; LUCAS, C.; PAIS, C.; ALMEIDA, J.; FERREIRA, C. **Yeast, the man's best friend**. INTECH Open Access Publisher, p.255-278, 2011.

UPADHYAY, R.; GHOSAL, D.; MEHRA, A. Characterization of bread dough: rheological properties and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 104-113, 2012.

VALMORRI, S.; TOFALO, R.; SETTANNI, L.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 119-129, 2010.

VRANCKEN, G.; DE VUYST, L.; VAN DER MEULEN, R.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; DANIEL, H.M. Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 471-481, 2010.

VERA, A.; LY-CHATAIN, M. H.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 369-377, 2012.

VERA, A.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. **Food Microbiology**, v. 26, p. 728-733, 2009.

VOGELMANN, S.A.; SEITTER, M.; SINGER, U.; BRANDT, M. J.; HERTEL, C. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 205–212, 2009.

WIESIR, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, p.115-119, 2007.

WILDE, P. **Foam formation in dough and bread quality**. In: CAUVAIN, S.P. (Ed.) In: Breadmaking: improving quality. Woodhead Publishing, Cambridge, 2003, 589 p.

ZANINI, S. F.; MUSSI, J. M. S.; ZANINI, M. S.; SOUSA, D. R.; PESSOTTI, B. M. de S.; DAMASCENO, J. D. L. M.; SILVA, M. A. da. Identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus* spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. **Ciência Rural**, v.42, p.1648-1654, 2012.

ZHANG, J.; LIU, W.; SUN, Z.; BAO, Q.; WANG, F.; YU, J.; CHEN, W.; ZHANG, H. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. **Food Control**, v. 22, p.767-774, 2011.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO FERMENTO NATURAL NA PRODUÇÃO DE PÃES APLICANDO A TÉCNICA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

RESUMO

Neste estudo foram desenvolvidos três fermentos naturais usando como substrato: cana-de-açúcar, maçã e uva. A atividade fermentativa e as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do fermento natural e dos pães tipo italiano foram avaliadas. Dentre os pães preparados com os diferentes fermentos naturais, o elaborado com fermento de uva apresentou maior pH, com 4,30, e menor acidez, correspondendo a 2,99 mL NaOH 0,1N/ 100g. O fermento natural de uva foi o selecionado para esta pesquisa por apresentar o maior volume na fermentação e por ter obtido a maior nota de ordenação na análise sensorial. A contagem de bactéria láctica aeróbia a 30 °C foi de 7,52 log UFC/ g e a de leveduras foi de 7,62 log UFC/ g. Após 1 ano de cultivo as bactérias lácticas aeróbias aumentaram 1,34 ciclos logarítmicos na temperatura de 30 °C, e as leveduras reduziram 0,61 ciclos logarítmicos. Os resultados deste estudo indicam que o uso de diferentes substratos na preparação do fermento natural, fornece características sensoriais diferentes aos produtos. Apesar de ser um processo antigo, a aplicação da técnica da fermentação espontânea em pães ainda é muito utilizada, tendo em vista a demanda por produtos com as características específicas deste tipo de fermentação.

Palavras-chave: atividade fermentativa, bactéria láctica, levedura, análise sensorial.

EVALUATION OF SOURDOUGHS FOR THE PRODUCTION OF BREADS USING SPONTANEOUS FERMENTATION TECHNIQUE

ABSTRACT

This study developed three sourdoughs using sugarcane, apple and grape as substrate. The fermentative activity and physicochemical, microbiological and sensory characteristics of the sourdoughs and italian type breads were evaluated. Among the breads that were prepared

using different sourdoughs, that which was made from grape sourdough presented high pH (4.30) and less acidity (2.99 mL 0.1N/ 100g). The grape sourdough was selected for research because it presented the highest fermentation volume and because it was the most preferred in the sensory analysis. The aerobic lactic acid bacteria count at 30 °C was 7.52 log CFU/ g and yeast count was 7.62 log CFU/ g. After one year of cultivation, the aerobic lactic acid bacteria increased by 1.34 logarithmic cycles at a temperature of 30 °C and the yeasts were reduced by 0.61 logarithmic cycles. The results of this study indicate that the use of different substrates in the preparation of sourdoughs provides breads with different sensory characteristics. Although it is an old process, the application of the spontaneous fermentation technique in bread making is still much used in view of the demand for products with the specific characteristics of this type of fermentation.

Key words: fermentative activity, yeast, lactic acid bacteria, sensory analysis.

2.1 INTRODUÇÃO

Pães são consumidos em grande quantidade em todo o mundo, nos diferentes tipos e formatos, dependendo do hábito cultural. É considerado um dos produtos mais antigos, estimando-se que mais de 1,8 bilhões de pessoas consomem vários tipos de pães em todo o mundo. Produtos de panificação e suas técnicas de produção diferem amplamente (CHAVAN; CHAVAN, 2011). Entre as farinhas de cereais, somente a farinha de trigo pode formar uma massa viscoelástica tridimensional quando misturada à água. A caracterização das propriedades reológicas da massa é eficaz em prever o comportamento do processo e no controle de qualidade dos produtos alimentícios (SONG; ZHENG, 2007).

O uso do fermento natural tem aumentado nos últimos anos devido à demanda pelo consumo de alimentos sem a adição de conservantes químicos. Várias culturas *starters* têm sido aplicadas no processamento do fermento natural visando o aumento da vida de prateleira do pão e a melhoria das características sensoriais (PLESSAS et al., 2011b). A fermentação tradicional da massa ácida é um processo longo, que resulta em pães com textura peculiar e *flavour* típico, que estão relacionados, principalmente, às condições tecnológicas aplicadas (DECOCK; CAPPELLE, 2005).

Em geral, o fermento natural pode ser obtido de diferentes métodos, por meio da fermentação espontânea ou pela adição de cepas selecionadas. Seguindo os parâmetros tecnológicos aplicados, o fermento natural foi classificado em três tipos. Tipo I, o fermento é preparado tradicionalmente a temperatura ambiente (cerca de 30 °C) e continuamente propagados. Tipo II, é obtido industrialmente e a fermentação é realizada a uma temperatura mais elevada (acima de 30 °C) durante um longo período. Tipo III, geralmente é iniciado por culturas *starters* selecionadas e secas antes do uso (DE VUYST; NEYSENS, 2005; CORSETTI; SETTANNI, 2007; HAMMES et al., 2005).

O fermento natural consiste na mistura de farinha e água, que afeta as propriedades do pão de maneiras diferentes. Além de leveduras, contém uma grande diversidade de bactérias lácticas (BAL) que produzem ácido láctico e/ou acético, fornecendo gosto ácido nos produtos finais (DE VUYST; NEYSENS, 2005).

As atividades metabólicas de *Lactobacillus* durante a fermentação da massa ácida pode ocasionar melhorias nas propriedades da massa, na textura e no sabor, além de retardar o processo de envelhecimento do pão e evitar a deterioração por bolores e bactérias (GEREZ et al., 2009; DE VALDEZ et al., 2010). A fermentação da massa ácida melhora as características nutricionais, além de aprimorar as propriedades de textura e sensorial de pães com farelo (RIZZELLO et al., 2012). Características físico-químicas e bioquímicas, que surgem a partir dessa diversidade, geram bons produtos assados (DE VUYST; NEYSENS, 2005; ARENDT et al., 2007). A temperatura ótima de crescimento dos *Lactobacillus* varia entre 30 e 40 °C dependendo da cepa, e das leveduras entre 25 a 27 °C (CHAVAN; CHAVAN, 2011).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e analisar um fermento natural obtido a partir da técnica da fermentação espontânea e aplicá-lo em pães, visando obter produtos com características sensoriais diferentes dos comumente produzidos no Brasil.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Caracterização da farinha de trigo

A análise de umidade da farinha de trigo comercial foi realizada de acordo com o método nº 44-15.02 (AACC, 1999). O teor de cinzas foi analisado de acordo com a metodologia da AACC nº 08-12 (1999). A qualidade da farinha de trigo foi determinada conforme o

método nº 54-21 (AACC, 1999) usando um farinógrafo (modelo 8 101, Brabender OHG, Duisburg, Alemanha). As características viscoelásticas foram determinadas conforme o método nº 54-30A (AACC, 1999) usando um alveo-consistógrafo (modelo NG, Chopin, Villeneuve la Garenne, França). O *falling number* (modelo 2000, Perten Instruments, Huddinge, Suécia) foi determinado pelo método nº 56-81B (AACC, 1999). O percentual de glúten seco, úmido e glúten index foram obtidos usando um Glutomatic (modelo 220, Perten Instruments, Huddinge, Suécia), de acordo com a metodologia nº 38-12 (AACC, 1999).

2.2.2 Elaboração do fermento natural

Foram desenvolvidos três fermentos naturais usando como substrato cana-de-açúcar, maçã e uva. Estes ingredientes foram escolhidos por serem comumente utilizados na preparação de fermentos naturais no Brasil.

Foi utilizada a técnica de 5 estágios (1 fermentação inicial + 4 propagações diárias). Cada substrato foi misturado com água e fermentado espontaneamente por três dias a 25 °C (FI). A primeira mistura foi realizada com a adição de 100 % da fermentação inicial (FI), 100 % de farinha de trigo, 10 % de farinha de centeio e 90 % de água, permanecendo por 24 h em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) (pré-fermento). Seguindo intervalos de 24 h, foram desenvolvidas a segunda, terceira e quarta mistura com 100 % do pré-fermento, 50 % de farinha de trigo, 10 % de farinha de centeio e 40 % de água. Os fermentos, após cada propagação diária, foram acondicionados por 8 h a 25 °C, e por 16 h a 5 °C. Os fermentos naturais foram propagados semanalmente durante um ano.

2.2.3 Avaliação da capacidade fermentativa

Após a finalização do preparo dos fermentos, foram avaliadas amostras de cada um dos preparos quanto à capacidade fermentativa. Utilizou-se 10 g de cada amostra em proveta graduada, em temperaturas de 25, 30 e 35 °C, por 13 h. O volume inicial de 10 mL foi considerado.

2.2.4 Processamento dos pães

Os fermentos naturais foram testados em pães tipo italiano cuja formulação foi composta por 100 % de farinha de trigo, 20 % de fermento natural (KATINA et al., 2006; PARAMITHIOTIS et al., 2005;

PLESSAS et al., 2011a; ROBERT et al., 2006), 60 % de água e 1,8 % de sal. Após a mistura dos ingredientes, os pães foram fermentados a 30 °C por 5 h (80 % de umidade relativa) e assados com vapor a 180 °C por 30 min.

2.2.5 Propriedades físico-químicas e microbiológicas dos fermentos naturais e dos pães

Amostras dos fermentos naturais e dos pães foram submetidas à análise de pH (modelo Q-400^a, Quimis, Diadema, Brasil) e acidez titulável (ATT). A acidez foi determinada com 0,1N de NaOH e expressa em mL 0,1N NaOH/ 100 g (IAL, 2004). As amostras dos pães foram submetidas à análise de umidade, cinzas, gordura (IAL, 2004) e proteína (AOAC, 2005), além de coliformes a 45 °C, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras (APHA, 2001).

2.2.6 Análise sensorial

As amostras dos pães foram analisadas por 50 julgadores não treinados, cada um avaliando 3 amostras e baseando a avaliação na impressão global dos produtos. Os julgadores foram convidados a classificar as amostras em ordem de preferência. As amostras mais preferidas tiveram nota de ordenação 3 e as menos preferidas nota de ordenação 1. As amostras foram servidas em pratos plásticos brancos e codificadas com números de três dígitos aleatórios. Água mineral foi fornecida para enxaguar a boca entre as avaliações (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

O teste de ordenação-preferência foi aplicado para avaliar as amostras de pães com fermentos naturais com cana-de-açúcar, maçã e uva. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFSC sob o número 876/ 10. As análises microbiológicas foram realizadas visando à segurança dos julgadores durante a análise sensorial. O objetivo do teste sensorial foi identificar o melhor fermento para, a partir dele, selecionar as BAL e leveduras de interesse no preparo dos pães.

2.2.7 Contagem microbiológica de bactérias lácticas e leveduras

A contagem de BAL e leveduras foi realizada através do método *pour plate*. Do fermento natural com maior nota de ordenação

na avaliação sensorial, foram misturadas, assepticamente, 25 g de cada massa com 225 mL de água peptonada estéril ($0,1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) em *stomacher* (model P, Interscience, St. Nom, França). Foram realizadas as diluições necessárias de BAL e leveduras. O cultivo de BAL foi realizado em ágar MRS (Difco, Sparks, USA) em condições de aerobiose e anaerobiose, com incubação a $30 \text{ }^\circ\text{C}/ 48 \text{ h}$ e as leveduras em ágar PDA (Difco, Sparks, USA) com ácido tartárico 10% a $25 \text{ }^\circ\text{C}/ 72 \text{ h}$. BAL foram mantidas como culturas estoques em tubos com ágar MRS e leveduras em ágar PDA com ácido tartárico 10 % a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e repicadas mensalmente. A morfologia das bactérias lácticas foi observada quanto à coloração de *Gram* e teste da catalase. As colônias das leveduras foram submetidas ao teste microscópico quanto à presença de hifa ou pseudohifa.

2.2.8 Análise estatística

A diferença significativa entre as médias foi calculada usando a análise de variância (ANOVA) e calculada pelo teste de *Tukey* ($P < 0,05$) usando o programa *Statistica* versão 8.0 (2007). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média \pm desvio padrão. O resultado do teste de ordenação-preferência foi analisado de acordo com o teste não-paramétrico de *Friedman* (MEILGAARD et al., 2007) usando o programa *Bioestat* 5.0 (2007).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização da farinha de trigo

A farinha de trigo apresentou teor médio de $14,1 \pm 0,10 \%$ de umidade, $0,48 \pm 0,02 \%$ de cinzas, $9,5 \pm 0,10 \%$ de glúten seco e $355 \pm 2,00 \text{ s}$ de *falling number*. Os resultados da análise da farinha de trigo estão apresentados na Tabela 1. A amostra analisada neste estudo apresentou absorção de água de $60,8 \pm 0,21 \%$ e desenvolvimento da massa de $2,1 \pm 0,14 \text{ min}$. Os resultados foram próximos dos obtidos por Indrani e Rao (2007), que foram $0,45 \%$ de cinzas, $10,1 \%$ de glúten seco, 374 s de *falling number* e $57,5 \%$ de absorção de água.

A estabilidade da massa consiste no intervalo de tempo durante o qual ela mantém a máxima consistência, e o valor obtido foi de $3,6 \pm 0,64 \text{ min}$. A farinha apresentou um baixo índice de tolerância à mistura (ITM), de $58 \pm 2,83 \text{ UB}$, o que a caracteriza como capaz de formar uma massa forte. A tenacidade e a extensibilidade obtida foi de

$104 \pm 2,12$ e $57 \pm 0,71$ mm, respectivamente. A relação de P/ L da amostra é de $1,84 \pm 0,06$. Esta relação indica uma farinha com tenacidade média, ideal para pães.

Stoenescu e Ionescu (2011) observaram os principais índices de qualidade em farinhas sem aditivos e constataram que o glúten úmido foi de 26,1 % e *falling number* de 478 s. Valores altos de *falling number* indicam a necessidade da adição de α -amilase para melhoria das propriedades da massa. A massa preparada com farinha de trigo romena apresentou elasticidade de 92 mm, extensibilidade de 42 mm, *falling number* entre 250 e 300 s e um considerável valor para a elasticidade da massa para pão, entre 60-70 mm.

Tabela 1 - Características reológicas e físico-químicas da farinha de trigo.

Farinografia		Alveo-consistografia		Análise físico-química	
ABS (%)	60,8 ± 0,21	P (mm)	104 ± 2,12	umidade (% p/p)	14,10 ± 0,10
TC (min)	0,98 ± 0,03	L (mm)	57 ± 0,71	cinzas (% p/p)	0,48 ± 0,02
TD (min)	2,1 ± 0,14	P/L	1,84 ± 0,06	glúten úmido (% p/p)	27,93 ± 0,55
EST (min)	3,6 ± 0,64	W (cm ² x 10 ⁻⁴ J)	241 ± 2,12	glúten seco (% p/p)	9,50 ± 0,10
ITM (UB)	58,0 ± 2,83			glúten index (% p/p)	89,70 ± 2,29
				<i>falling number</i> (s)	355 ± 2,00

Resultados como média ± desvio padrão.

Propriedades farinográficas: ABS, absorção de água (base seca 14% de umidade); TC, tempo de chegada;

TD, tempo de desenvolvimento; EST, estabilidade; ITM, índice de tolerância à mistura.

Propriedades alveo-consistográficas: P, tenacidade; L, extensibilidade; P/L relação entre tenacidade e extensibilidade;

W, energia de deformação da massa.

2.3.2 Caracterização dos fermentos naturais e dos pães

A atividade fermentativa está apresentada na Tabela 2. Os fermentos de uva e maçã tiveram resultados próximos e superiores ao de cana-de-açúcar, a 25 e 35 °C, na primeira e na segunda hora de crescimento.

O fermento de cana-de-açúcar, de modo geral, foi o que obteve menor produção inicial de gás. O fermento natural que apresentou o maior volume foi o de uva a 25 °C. Seu maior volume foi com 5 h, com $36 \pm 3,08$ mL. A análise estatística demonstrou que não existe diferença significativa entre as médias dos nove tratamentos ao nível de significância de $P < 0,05$. A média do fermento de uva em 13 h de fermentação a 25 °C foi de 28,62 mL, sendo superior e significativamente diferente das outras.

Os tratamentos com cana-de-açúcar e maçã a 25 °C, cana-de-açúcar, maçã e uva a 30 °C e cana-de-açúcar a 35 °C foram considerados estatisticamente iguais. Os tratamentos de maçã e uva a 35 °C diferem do restante e tiveram a menor média de volume.

Tabela 2 - Avaliação da atividade fermentativa dos fermentos naturais a 25, 30 e 35 °C, expressa em mL.

Temperatura	25°C			30°C			35°C		
	Cana-de-açúcar	Maçã	Uva	Cana-de-açúcar	Maçã	Uva	Cana-de-açúcar	Maçã	Uva
0	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
1	12,8 ± 0,84	15,6 ± 1,14	15,8 ± 0,84	13,8 ± 1,30	16,2 ± 0,84	12,8 ± 1,30	14,8 ± 0,84	16,8 ± 1,30	16,25 ± 0,96
2	14,2 ± 1,10	22,4 ± 1,52	22,8 ± 2,39	16,6 ± 1,82	21,8 ± 0,84	16,4 ± 2,41	17,6 ± 0,55	22,2 ± 2,59	19,25 ± 1,71
3	16,6 ± 1,34	26,6 ± 2,51	25,0 ± 2,12	19,8 ± 2,77	24,0 ± 1,00	19,2 ± 3,03	20,8 ± 2,28	29,40 ± 3,65	25,0 ± 0,83
4	17,8 ± 1,64	30,0 ± 1,22	32,8 ± 1,79	24,8 ± 1,79	32,6 ± 0,55	34,2 ± 2,49	23,2 ± 1,92	35,0 ± 1,73	34,5 ± 1,73
5	22,8 ± 1,92	31,4 ± 0,89	36,0 ± 3,08	28,6 ± 2,61	31,2 ± 1,30	31,8 ± 2,86	26,2 ± 2,59	32,2 ± 2,59	26,0 ± 0,82
6	27,0 ± 2,00	32,2 ± 0,84	35,4 ± 2,30	29,6 ± 2,97	30,6 ± 1,34	30,6 ± 1,52	26,8 ± 3,11	30,0 ± 3,74	27,25 ± 1,71
7	28,2 ± 1,92	31,2 ± 0,84	31,8 ± 2,17	30,2 ± 2,95	30,4 ± 1,95	28,6 ± 1,67	28,0 ± 3,39	28,2 ± 1,10	26,0 ± 1,63
8	28,6 ± 2,41	30,8 ± 1,64	29,8 ± 0,84	29,4 ± 3,36	27,0 ± 3,08	26,2 ± 1,79	27,8 ± 3,27	18,8 ± 1,92	20,25 ± 3,86
9	29,0 ± 2,00	30,8 ± 0,84	30,4 ± 0,55	26,2 ± 1,10	27,2 ± 1,64	26,4 ± 2,70	28,2 ± 3,42	12,6 ± 3,58	17,0 ± 3,56
10	27,8 ± 1,30	24,4 ± 3,56	30,4 ± 2,07	26,2 ± 1,30	26,4 ± 1,67	24,6 ± 2,07	26,8 ± 2,77	10,0 ± 0,00	15,25 ± 3,59
11	27,6 ± 0,89	27,0 ± 2,61	30,0 ± 3,39	26,0 ± 2,35	26,4 ± 2,79	22,6 ± 1,95	25,6 ± 1,95	10,0 ± 0,00	13,0 ± 4,24
12	26,0 ± 1,22	21,8 ± 1,30	26,2 ± 1,30	23,2 ± 1,79	21,6 ± 2,30	21,0 ± 1,58	24,4 ± 2,70	10,0 ± 0,00	13,0 ± 4,24
13	22,2 ± 1,48	20,0 ± 0,71	25,6 ± 1,34	21,4 ± 1,67	20,6 ± 1,34	20,4 ± 1,14	22,2 ± 1,48	10,0 ± 0,00	12,5 ± 3,32
Média em 13 h	23,12 ^{ab}	26,48 ^{ab}	28,62 ^b	24,29 ^{ab}	25,85 ^{ab}	24,22 ^{ab}	24,03 ^{ab}	20,40 ^a	20,40 ^a

Resultados como média ± desvio padrão. ^{a-b} Diferença de letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença entre as amostras (Teste de Tukey, P < 0,05).

Os resultados da análise dos fermentos e dos pães estão ilustrados na Tabela 3. Os valores de pH dos fermentos ficaram próximos, variando entre $4,22 \pm 0,02$ e $4,37 \pm 0,01$.

O pão com fermento de cana-de-açúcar teve a maior acidez, com $5,44 \pm 0,15$ mL NaOH/ 100g e a menor acidez foi para o pão preparado com fermento de uva com, $2,99 \pm 0,02$ mL NaOH/ 100g.

Crowley et al. (2002) em seu estudo obteve valores de pH de 4,11, 6,01, 5,21 e 4,75 para o fermento natural, para o pão padrão, para o pão com 20 % de fermento e para o pão com 40 % de fermento, respectivamente. Valores de acidez titulável total foram de 12,35, 2,6, 5,2 e 8,18 mL NaOH/ 100g. Como esperado, o aumento da quantidade de fermento nos pães resultou no decréscimo do pH e consequentemente maior ATT.

O pH do fermento maduro varia de acordo com a natureza do processo e da cultura *starter* usado nas massas ácidas de trigo, variando entre 3,5 a 4,3 (COLLAR et al., 1994; WEHRLE, ARENDT, 1998; THIELE et al., 2002).

Paramithiotis et al. (2005) aplicaram 20 % de fermento e o pH variou entre 3,57 e 3,85 e a ATT entre 10,1 e 12,5 mL. A concentração de ácido láctico foi maior nos pães contendo 50 % de fermento quando comparada aos pães com 30 % (PLESSAS et al., 2008).

Tabela 3 - Características físico-química dos fermentos naturais e dos pães.

Fermento natural			
	Cana-de-açúcar	Maçã	Uva
pH	4,22 ± 0,02	4,37 ± 0,01	4,36 ± 0,02
Acidez titulável total (mL 0,1N/ 100g)	11,56 ± 0,10	5,55 ± 0,34	7,54 ± 0,64
Pão			
	Cana-de-açúcar	Maçã	Uva
pH	4,04 ± 0,01	4,16 ± 0,05	4,30 ± 0,02
Acidez titulável total (mL 0,1N/ 100g)	5,44 ± 0,15	4,35 ± 0,06	2,99 ± 0,02
Umidade (% p/p)	36,27 ± 0,19	37,07 ± 0,06	38,6 ± 0,10
Cinzas (% p/p)	1,46 ± 0,01	1,58 ± 0,01	1,55 ± 0,04
Gordura (% p/p)	1,17 ± 0,06	1,32 ± 0,08	1,22 ± 0,05
Proteína (% p/p)	8,89 ± 0,05	8,84 ± 0,02	8,46 ± 0,09

Resultados como média ± desvio padrão. ^{a-b} Diferença de letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença entre as amostras (Teste de *Tukey*, $P < 0,05$).

O pão tipo italiano com fermento de uva apresentou maior teor de umidade, com $38,6 \pm 0,10$ %. O pão com fermento de cana-de-açúcar obteve os menores teores de umidade, cinzas e gordura. O teor de proteína dos pães variou entre $8,46 \pm 0,09$ para o pão preparado com fermento de uva e $8,89 \pm 0,05$ % para o pão preparado com fermento de cana-de-açúcar. Análises microbiológicas de coliformes a 45 °C, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras dos pães com os fermentos apresentaram resultados satisfatórios, podendo assim serem submetidos à análise sensorial.

De acordo com o teste de Friedman existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras de pães contendo fermento de cana-de-açúcar e uva. A melhor nota de ordenação foi para os pães tipo italiano contendo fermento de uva, sendo esta a amostra escolhida para a seleção de bactérias lácticas e leveduras para futura aplicação em pães. O pão com fermento de cana-de-açúcar teve a menor nota de ordenação, sendo igual estatisticamente que o com fermento de maçã.

2.3.3 Características microbiológicas

A contagem em placas do fermento de uva está apresentada na Tabela 4. Este fermento apresentou valores próximos na contagem em placas nas diferentes temperaturas, e não foi predominante um tipo de micro-organismo.

A contagem de BAL aeróbica a 30 °C foi de $7,52 \pm 0,07$ log UFC/g, BAL anaeróbica foi de $7,55 \pm 0,18$ log UFC/ g e leveduras a 25 °C foi de $7,62 \pm 0,29$ log UFC/ g. Após um ano de cultivo do fermento de uva, a contagem em placas foi realizada. BAL aeróbica aumentou 1,34 ciclos logarítmicos na temperatura de 30 °C e as leveduras tiveram uma redução de 0,61 ciclos logarítmicos.

A microbiota de BAL é predominante (8 log UFC/g) e é representada, principalmente pelo gênero *Lactobacillus*. Leveduras são geralmente encontradas em menores níveis (7 log UFC/g) e podem estar ausentes. As leveduras são, principalmente, do gênero *Saccharomyces* e *Candida* (VERA et al., 2012).

Tabela 4 - Contagem em placas de BAL e leveduras do fermento de uva a 25, 30 e 35 °C (log UFC/g).

Leveduras		Bactéria láctica		
Aeróbica		Aeróbica		Anaeróbica
25 °C	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C
7,62 ± 0,29	7,52 ± 0,07	7,61 ± 0,05	7,55 ± 0,18	7,45 ± 0,21
Após 1 ano				
7,01 ± 0,16	8,86 ± 0,11	8,97 ± 0,08	8,42 ± 0,11	8,51 ± 0,16

Saeed et al. (2009) pesquisaram 15 amostras de fermento natural do Paquistão, e constataram que a contagem de BAL variou de 4,8 a 7,84 log UFC/g, e das leveduras variou de 3,8 a 7,9 log UFC/g. Edema e Sanni (2008) verificaram o crescimento microbiano em fermento natural de milho em 48 h de fermentação. A contagem em placa de BAL aumentou de 4,62 log UFC/g no tempo inicial (0 h) para 6,45 log UFC/g após 48 h de fermentação, enquanto a contagem de leveduras aumentou de 4,18 log UFC/g para 6,64 log UFC/g no mesmo período.

O fermento natural é dominado pelas BAL heterofermentativas (DE VUYST; NEYSENS, 2005). Endo et al. (2011) relataram que os carboidratos exercem um grande impacto no isolamento da variedade de BAL em alimentos fermentados. Scheirlinck et al. (2009) indicaram que cepas específicas de BAL continuam presentes em massas artesanais durante anos e circulam no ambiente da padaria. Além disso, o ar é um potencial portador de BAL em ambientes de padarias artesanais.

Mesmo se, aparentemente, a microbiota específica se estabilizar, o fermento natural continua a evoluir de forma lenta, podendo, como consequência ser considerado único. Por exemplo, o fermento natural tipo I é frequentemente dominado por *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. brevis* e *Lb. plantarum* enquanto *Lb. fermentum*, *Lb. panis* e *Lb. amylovorus* são mais encontrados em fermentos tipo II. Características físico-químicas e bioquímicas, que surgem a partir dessa diversidade, ocasionam bons produtos panificáveis. (ARENDT et al., 2007; DE VUYST; NEYSENS, 2005).

Células da levedura metabolizam os açúcares fermentáveis (glucose, fructose, sacarose e maltose) sob condições anaeróbicas e produzindo dióxido de carbono (CO₂) como produto residual, que atua

como agente levedante e fornece volume à massa (CHAVAN; JANA, 2008; GIANNOU et al., 2003). Rosenquist e Hansen (2000) reportaram que *Saccharomyces cerevisiae* foi a única espécie de levedura isolada de fermento natural.

As culturas *starters* oferecem vantagens quando comparadas com a fermentação espontânea sem adição de *starters*. Geralmente a fermentação espontânea precisa de um tempo longo (aproximadamente 96 h) para se completar, para reduzir o pH para um nível suficiente e melhorar a estrutura e as características sensoriais dos produtos. O início do processo pode levar um longo tempo (24-48 h) e existe o risco da contaminação microbiana competir com microorganismos desejáveis (HOLZAPFEL, 2002). A adição da cultura *starter* reduz o tempo da fermentação, pela redução rápida do pH, e aumento da acidez. Isto ajuda na redução do risco de contaminação microbiana e também contribui para o controle do aroma, textura e *flavour* no produto final (HOLZAPFEL 2002; LEROY; DE VUYST, 2004).

2.4 CONCLUSÃO

O fermento de uva foi o selecionado para a pesquisa por apresentar maior volume na fermentação e por ter a maior preferência na análise sensorial. A aplicação da técnica de fermentação espontânea é um processo antigo, mas muito usado nos dias de hoje devido à demanda por produtos com as características específicas deste tipo de fermentação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pelo apoio financeiro, e também à empresa Granotec pela realização das análises da farinha de trigo.

REFERÊNCIAS

AACC. **American Association of Cereal Chemists.** Approved Methods, 10 th ed., Saint Paul, Minnesota, USA. 1999.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists.** Official Methods of AOAC Internactional, 18th ed, Maryland, USA. 2005.

APHA. **American Public Health Association**. Compendium of methods of the microbiological examination of foods, 4th ed, Washington D.C. 2001.

ARENDR, E.K.; LIAM, A.M.R.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, p. 165–174, 2007.

CHAVAN, R.S.; CHAVAN, S.R. Sourdough technology - A traditional way for whole some foods: a review. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**, v.10, p. 169–182, 2011.

CHAVAN, R.S.; JANA, A. Frozen dough for bread making – a review. **International Journal Food Science, Technology and Nutrition**, v. 2, p. 9–27, 2008.

COLLAR, C.; DE BARBER, B. C. MARTÍNEZ-ANAYA, M.A. Microbial sourdoughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. **Journal Food Science**, v. 59, p. 629–633, 1994.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, p. 539–558, 2007.

CROWLEY, P.; SCHOBBER, T.J.; CLARKE, C.I.; ARENDR, E.K. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. **Europe Food Research Technology**, v. 214, p. 489–496, 2002.

DECOCK, P.; CAPPELLE, C. Bread technology and sourdough technology. **Trends Food Science Technology**, v. 16, p. 113–120, 2005.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends Food Science and Technology**, v. 16, p.43–56, 2005.

EDEMA, M.O.; SANNI, A.I. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. **Food Microbiology**, v. 25, p. 616–625, 2008.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L.M.T. Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 110, p.1085–1092, 2011.

FONT DE VALDEZ, G.; GEREZ, C. L.; TORINO, M. I.; ROLLÁN, G. **New trends in cereal based products using lactic acid bacteria**. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G. M. (Eds.). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Wiley-Blackwell, Iowa, 2010, p. 273–287.

GEREZ, C.L.; TORINO, M.I.; ROLLÁN, G.; FONT DE VALDEZ, G. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control**, v. 20, p. 144–148, 2009.

GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V.; TZIA, C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends Food Science Technology**, v. 14, p. 99–108, 2003.

HAMMES, W.P.; BRANDT, M.J.; FRANCIS, K.L.; ROSENHEIM, J.; SEITTER, M.F.H.; VOGELMANN, S.A. Microbial ecology of cereal fermentations. **Trends Food Science Technology**, v. 16, p. 4–11, 2005.

HOLZAPFEL, W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal Food Microbiology**, v. 75, p. 197–212, 2002.

IAL. **Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 ed, São Paulo, Brasil. 2004.

INDRANI, D.; RAO, G.V. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of parotta. **Journal Food Engineering**, v. 79, p. 100–105, 2007.

KATINA, K.; HEINIO, R.L.; AUTIO, K.; POUTANEN, K. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 1189–1202, 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends Food Science Technology**, v. 15, p. 67–78, 2004.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4th ed Boca Raton, FL, CRC Press. 2007, p. 255-309.

PARAMITHIOTIS, S.; CHOULIARAS, Y.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2813–2819, 2005.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; BEKATOROU, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.A.; BEZIRTZOGLU, E. Examination of freshness degradation of sourdough bread made with kefir through monitoring the aroma volatile composition during storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 627–633, 2011a.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Application of novel starter cultures for sourdough bread production. **Anaerobe**, v. 17, p. 486-489, 2011b.

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; POONAM, N.; ATHANASIOS, A.K. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, p. 985–990, 2008.

RIZZELLO, C.G.; CODA, R.; MAZZACANE, F.; MINERVINI, D.; GOBBETTI, M. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. **Food Research International**, v. 46, p. 304–313, 2012.

ROBERT, H.; GABRIEL, V.; LEFEBVRE, D.; RABIER, P.; VAYSSIER, Y.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 256–265, 2006.

ROSENQUIST, H.; HANSEN, A. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. **Food Microbiology**, v. 17, p. 241–250, 2000.

SAEED, M.; ANJUM, F.M.; ZAHOR, T.; NAWAZ, H.; REHMAN, S.U. Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. **International Journal Agriculture Biology**, v. 11, p. 329–332, 2009.

SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. **Journal Applied Microbiology**, v. 106, p. 1081–1092, 2009.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 18, p. 132–138, 2007.

STOENESCU, G.; IONESCU, V.S. Rheological properties of the wheat flour supplemented with different additives. **Food Technology**, v. 35, p. 54–62, 2011.

THIELE, C.; GANZLE, M.G.; VOGEL, R.F. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 45–51, 2002.

VERA, A.; LY-CHATAIN, M.H.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 369–377, 2012.

WEHRLE, K.; ARENDT, E.K. Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. **Cereal Chemistry**, v. 75, p. 882–886, 1998.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS DO FERMENTO NATURAL DE UVA BRASILEIRA

RESUMO

Neste estudo foi desenvolvido um fermento natural de uva brasileira obtido a partir de fermentação espontânea. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente e genotipicamente bactérias lácticas e leveduras isoladas do fermento natural de uva. A identificação fenotípica para bactéria láctica e leveduras foi realizada usando os kits API 50CHL e 20CAUX e foram caracterizadas genotipicamente usando o método por sequenciamento. Neste estudo, foram isoladas quatro cepas. Duas cepas foram identificadas fenotipicamente e genotipicamente como *Lactobacillus paracasei* e outra cepa como *Saccharomyces cerevisiae*. A outra amostra de levedura, identificada fenotipicamente como *Candida pelliculosa*, não obteve a mesma identidade com a técnica de sequenciamento.

Palavras-chave: fermentação espontânea, fermento natural, bactéria láctica, leveduras.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEASTS FROM THE BRAZILIAN GRAPE SOURDOUGH

ABSTRACT

This study was developed with Brazilian grape sourdough obtained from spontaneous fermentation. The aim of this work was to characterize phenotypically and genotypically lactic acid bacteria and yeasts isolated from sourdough. The phenotypical identification for bacteria and yeasts was performed by using the kit API 50CHL and 20CAUX and they were also genotypically characterized by sequencing method. A total of four isolated strains were analysed in this study. Two of these strains were phenotypically and genotypically identified as *Lactobacillus paracasei* and one as *Saccharomyces cerevisiae*. Another sample phenotypically identified as *Candida pelliculosa* did not show the same identity by sequencing.

Key words: spontaneous fermentation, sourdough, lactic acid bacteria, yeast.

3.1 INTRODUÇÃO

O fermento natural é usado na produção de pães ácidos, pães tradicionais, *snacks*, pizza e pães doces (DE VUYST, VANCANNEYT, 2007). A produção de fermento natural pode ser iniciada com uma simples mistura de farinha de trigo e água, deixada em um lugar aquecido. Após algumas propagações o fermento estará formado. A incorporação do fermento natural na tecnologia da panificação realça as características sensoriais, aumenta a vida de prateleira e melhora as propriedades nutricionais (ARENDDT; LIAM, DAL BELLO, 2007; CORSETTI et al., 2000). O impacto positivo da utilização é atribuído à microbiota, que forma um ecossistema único com leveduras e bactérias lácticas (BAL) (PARAMITHIOTIS; TSIASIOTOU; DROSINOS, 2010). A maioria dos pré-fermentos com leveduras é usada na produção de pães brancos. O uso de BAL como cultura *starter* pode ajudar na melhoria da qualidade e aumento da vida de prateleira dos produtos. As BAL originadas naturalmente de fermentos naturais podem ser utilizadas na produção de novos alimentos fermentados, como pão ácido, que tem qualidade superior e longa vida de prateleira (SAEED et al., 2009).

BAL são um grupo de bactérias Gram positivas, catalase negativa, que não apresentam mobilidade, nem produzem esporos e produzem ácido láctico como principal produto final durante a fermentação. São microaerófilas, acidofilias, tolerantes ao sal e com necessidades nutricionais complexas para carboidratos, amidoácidos, peptídios, ácidos graxos, sais, derivados nucleicos e vitaminas. O *habitat* natural desses micro-organismos incluem humanos, animais e plantas (HOLZAPFEL et al., 2001).

A microbiota de BAL é predominante (8 log CFU/g) e é representada, principalmente, pelo gênero *Lactobacillus*. Leveduras são geralmente contadas em níveis menores (7 log CFU/ g) e podem estar ausentes. As principais leveduras são dos gêneros *Saccharomyces* e *Candida* (VERA et al., 2012).

Na Itália (REALE et al., 2011), na Alemanha (VOGEL et al., 1994), na França (VERA et al., 2012) e na Bélgica (SCHEIRLINCK et al., 2009) o fermento natural tem sido pesquisado intensivamente. A caracterização do fermento natural na Turquia (GÜL et al., 2005), na Tailândia (LUANGSAKUL et al., 2009) e na China (ZHANG et al.,

2011) também tem sido estudada. No entanto, pesquisas publicadas no Brasil ainda são escassas, mesmo que o pão seja amplamente consumido. O objetivo deste estudo foi desenvolver um fermento natural de uva e identificar, fenotipicamente e genotipicamente, bactérias lácticas e leveduras para futura aplicação em pães.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Preparação do fermento natural

O fermento natural foi desenvolvido usando suco da uva “Niagara rosada” como substrato. O substrato foi misturado com água e fermentado espontaneamente por 3 dias a 25 °C (FI). Em seguida foi realizada a primeira mistura com a adição de 100 % da fermentação inicial (FI), 100 % de farinha de trigo, 10 % de farinha de centeio e 90 % de água, permanecendo por 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) originando o pré-fermento. Seguindo intervalos de 24 h, foi realizada a segunda, a terceira e a quarta mistura, usando 100 % do pré-fermento, 50 % de farinha de trigo, 10 % de farinha de centeio e 40 % de água. O fermento permaneceu por 8 h a 25 °C, e 16 h a 5 °C após cada propagação. O fermento foi propagado regularmente durante um ano com a mesma formulação utilizada na etapa da mistura.

3.2.2 Isolamento de bactérias lácticas e leveduras

A contagem de BAL e leveduras foi realizada usando o método *pour plate*. Asepticamente, 25 g de fermento natural foi misturado com 225 mL de água peptonada estéril (0,1 g 100 g⁻¹) em *stomacher* (modelo P, Interscience, St. Nom, France). Foram realizadas as diluições necessárias de BAL e leveduras. O isolamento por esgotamento de BAL foi realizado em ágar MRS (Difco, Sparks, USA) a 30 °C sobre aerobiose por 48 h e leveduras cultivadas em ágar PDA (Himedia, Mumbai, India) com ácido tartárico 10 % sobre condições aeróbicas a 25 °C a 72 h.

A contagem de BAL aeróbica a 30° C foi de $7,52 \pm 0,07$ log UFC/g e leveduras foi de $7,62 \pm 0,29$ log UFC/ g. Após incubação, 10 colônias de BAL foram isoladas aleatoriamente das placas com diluição 10^{-6} e foram transferidas para tubos com caldo MRS (Difco, Sparks, USA). A morfologia foi observada pela coloração de Gram e teste da catalase. Foram isoladas 25 colônias de leveduras selecionadas

aleatoriamente das placas da diluição 10^{-5} e transferidas para tubos com extrato de malte (Himedia, Mumbai, Índia) (APHA, 2001). As colônias foram analisadas num microscópio para detectar a presença de hifa ou de pseudohifa.

3.2.3 Caracterização fenotípica de BAL e leveduras no fermento natural

A identificação de BAL foi realizada usando a análise fenotípica API 50CHL (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) de acordo com Saeed et al. (2009) e Lu et al. (2008). As leituras foram realizadas após 24 e 48 h de incubação a 30 °C. A identificação de leveduras foi realizada usando o kit API 20CAux (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) segundo Saeed et al. (2009) e as leituras foram realizadas após 48 e 72 h de incubação a 30°C.

3.2.4 Caracterização genotípica de BAL e leveduras no fermento natural

Duas amostras caracterizadas fenotipicamente como BAL e duas amostras de leveduras foram submetidas ao sequenciamento de DNA na empresa Genotyping Biotecnologia (Botucatu, São Paulo, Brazil). O DNA dos genomas dos isolados foi extraído com 10 % de Chelex (Biorad, Hercules, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. A extração do DNA do genoma foi amplificada pelo *primer* universal 16S (16S f AACGCGAAGAACCTAC e 16S F CGGTGTGTACAAGACCC) para BAL e o *primer* ITS (ITS 4 TCCTCCGCTTATTGATAT e ITS 5 GGAAGTAAAAGTCTAACAAGG) para fungos.

Os produtos da reação por sequenciamento foram tratados com ExoSAP-IT (USB, Ohio, USA), de acordo com o protocolo do fabricante, e sequenciados com Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Foster City, CA). A sequência de nucleotídeos dos produtos do sequenciamento foi determinada conforme a metodologia de Sanger; Nicklen e Coulson (1977). A identificação dos micro-organismos isolados foi analisada usando a ferramenta *Blast* (Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide) do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.2.5 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicatas e os dados expressos como média \pm desvio padrão. O gênero e a espécie das BAL e

leveduras isoladas foram interpretadas pelo programa estatístico APIWEB 50CHL v 5.1 e APIWEB 20CAux v 4.0, respectivamente.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Características fenotípicas

Os resultados dos micro-organismos isolados e testados com o API 50CHL estão ilustrados na Tabela 1. As amostras de BAL 1 e 2 (Tabela 1) de *Lactobacillus paracasei* (amostra BAL 1 obteve $6,36 \pm 0,18$ e amostra BAL 2 obteve $8,34 \pm 0,15$ log UFC/g) foram selecionadas para este estudo devido a sua alta confiabilidade de identificação. A espécie *Lactobacillus paracasei* foi dominante, com 60 % de identificação entre as bactérias lácticas do fermento natural de uva. A amostra de *Lactobacillus paracasei* (amostra BAL 1) obteve 99,5 % de confiabilidade na identificação, enquanto a de *Lactobacillus paracasei* (amostra BAL 2) obteve 99,9 %. Isso demonstra que as BAL heterofermentativas são predominantes no fermento natural, conforme De Vuyst e Neysens (2005). Segundo Endo; Futagawa-endo e Dicks (2011), os carboidratos têm um grande impacto no isolamento e na variedade da BAL em alimentos fermentados. Após 1 ano de cultivo do fermento natural foi observado que *Lactobacillus brevis* foi a espécie dominante, com 70 % de identificação. Scheirlinck et al. (2009) afirmaram que cepas específicas de BAL persistem nas massas artesanais após muitos anos.

Tabela 1 - Identificação fenotípica de bactéria láctica de fermento natural de uva usando o kit API 50 CHL.

Amostras BAL	Identificação	% de confiabilidade de identificação	Amostras BAL	Identificação após 1 ano	% de confiabilidade de identificação
1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,5	1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,8
2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,9	2	<i>Lactobacillus brevis</i>	93,3
3	<i>Lactobacillus brevis</i>	91,9	3	<i>Lactobacillus brevis</i>	95,8
4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	95,5	4	<i>Lactobacillus brevis</i>	98,3
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	95,5	5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,1
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	91,9	6	<i>Lactobacillus brevis</i>	91,6
7	-	perfil duvidoso	7	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,8
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	95,6	8	<i>Lactobacillus brevis</i>	95,9
9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	95,5	9	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,7
10	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,1	10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	92,5

Mugula; Narvhus e Sørhaug (2003) identificaram culturas starters de BAL (*Lactobacillus brevis*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) e leveduras (*Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae*) isoladas de *togwa*, um alimento fermentado da Tanzânia.

O resultado da fermentação de carboidratos de leveduras está ilustrado na Tabela 2. As amostras de leveduras selecionadas para este estudo foram as amostras 1 e 2, ambas com 99,9 % de confiabilidade de identificação. *Saccharomyces cerevisiae* (amostra levedura 1) e *Candida pelliculosa* (amostra levedura 2) obtiveram $7,54 \pm 0,18$ e $7,34 \pm 0,06$ log UFC/ g, respectivamente.

A *Candida pelliculosa* foi a espécie dominante, com 48 % de identificação entre as leveduras isoladas do fermento natural de uva, seguidas de 28 % de identificação por *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras como a *Candida famata* e a *C. sphaerica* foram identificadas em 4% das amostras.

Após um ano de cultivo pode ser observado que a *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie dominante. *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais comum usada no preparo dos pães. Células da levedura metabolizam açúcares fermentáveis (glicose, frutose, sacarose e maltose) e, sob condições anaeróbias, produzem dióxido de carbono, que atua como um agente levedante fornecendo volume à massa (CHAVAN; JANA, 2008; GIANNOU; KESSOGLOU; TZIA, 2003). Rosenquist e Hansen (2000) afirmaram que *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais isolada nos fermentos naturais.

Tabela 2 - Identificação fenotípica de leveduras de fermento natural de uva usando o kit API 20CAux.

Amostras leveduras	Identificação	% de confiabilidade de identificação	Amostras	Identificação após 1 ano	% de confiabilidade de identificação
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	1	<i>Candida pelliculosa</i>	93,9
2	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96,2
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96,2	4	<i>Candida guilliermondii</i>	89,9
5	<i>Candida famata</i>	96,2	5	-	perfil duvidoso
6	<i>Candida sphaerica</i>	98,5	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
7	-	perfil duvidoso	7	<i>Candida sphaerica</i>	99,8
8	<i>Candida pelliculosa</i>	88,8	8	<i>Candida sphaerica</i>	98,5
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96,2	9	-	perfil duvidoso
10	-	perfil duvidoso	10	-	perfil duvidoso
11	<i>Candida pelliculosa</i>	93,1	11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,2
12	-	perfil duvidoso	12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9

13	<i>Candida pelliculosa</i>	99,3	13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,7
14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,7
15	-	perfil duvidoso	15	<i>Candida guilliermondii</i>	84,3
16	<i>Candida pelliculosa</i>	93,1	16	<i>Candida pelliculosa</i>	99,8
17	<i>Candida pelliculosa</i>	88,8	17	<i>Cryptococcus albidus</i>	99,8
18	<i>Candida pelliculosa</i>	99,3	18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
19	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
20	<i>Candida pelliculosa</i>	93,1	20	-	perfil duvidoso
21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
22	<i>Candida pelliculosa</i>	88,8	22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,7
23	<i>Candida pelliculosa</i>	88,8	23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,2
24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9
25	<i>Candida pelliculosa</i>	99,8	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9

Lu et al. (2008) caracterizaram fenotipicamente 170 BAL e 96 leveduras no macarrão de arroz fermentado da China, chamado de *mifen*, sendo que *Lb. plantarum* e *S.cerevisiae* foram as espécies predominantes. A microflora de 25 fermentos de trigo da região Apulia, sul da Itália, foi caracterizada por Corsetti et al. (2001). Edema e Sanni (2008) pesquisaram massa de pão de milho ácido e 30 % dos micro-organismos isolados foram identificados como *Lactobacillus sanfranciscensis*, 20 % como *Lb. alimentarius*, 14 % como *Lb. brevis*, 12% como *Leuconostoc citreum*, 7 % como *Lb. plantarum*, 6 % como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4 % como *Lb. fermentum* e *Lb. acidophilus*, 2 % como *Weissella confusa* e 1% como *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.

Qureshi et al. (2007) isolaram e caracterizaram cepas de leveduras capazes de usar maltose durante a fermentação do pão. Das 40 cepas, 14 foram identificadas como *S. cerevisiae*, 12 como *S. kluyveri*, 4 como *S. exigus* e *S. dairnensis*, 2 como *S. ludwigii*, *S. octosporus* e *S. unisporus*, respectivamente. Além disso, 14 dos micro-organismos isolados de *S. cerevisiae* foram avaliados pela sua capacidade de utilização da maltose na produção de pães.

3.3.2 Identificação genotípica

Quatro culturas representativas de BAL e leveduras caracterizadas fenotipicamente neste estudo foram analisadas genotipicamente pelo sequenciamento da região 16S rRNA para BAL e ITS, para detecção de fungos. O produto do sequenciamento resultou no fragmento de 600 bp para amostras de BAL e 800 bp para amostras de leveduras.

A amostra caracterizada fenotipicamente como *Lactobacillus paracasei* (amostra BAL 1) obteve 93 % de cobertura de sequência com 99 % de identificação para *Lactobacillus casei*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. paracasei*. A cultura isolada fenotipicamente identificada como *Lactobacillus paracasei* (amostra BAL 2) obteve 97 % de cobertura de sequência com 98 % de identificação para *Lactobacillus casei*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. paracasei*.

A partir dos resultados do sequenciamento das culturas isoladas e caracterizadas fenotipicamente como *Saccharomyces cerevisiae* (amostra levedura 1), houve 88 % de identificação para *Saccharomyces cerevisiae*, com 93 % de cobertura da sequência. A cultura isolada caracterizada fenotipicamente como *Candida pelliculosa*

(amostra levedura 2) obteve 99% de identificação para *Saccharomyces cerevisiae*, com 89 % de cobertura da sequência.

Esta sequência de resultados obtidos pela PCR indica que todas as amostras de BAL mostram maior identidade com *Lactobacillus casei*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. paracasei*. Entretanto, a caracterização fenotípica indicou que as amostras de BAL são *Lactobacillus paracasei*.

De acordo com os resultados fenotípicos e genotípicos para amostras de leveduras, é possível confirmar a identificação de *Saccharomyces cerevisiae* para amostra de levedura 1. Entretanto, a amostra de levedura 2 foi identificada fenotipicamente como *Candida pelliculosa* e genotipicamente como *Saccharomyces cerevisiae*. Comparando à PCR, a caracterização por fermentação de carboidratos é sensível devido às variações do processo (BARROS et al., 2009). De acordo com Nigatu (2000), as diferenças principais entre análise fenotípica e genotípica indicam que os resultados do kit API devem ser complementados com os resultados genéticos para se obter um resultado preciso.

3.4 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu isolar e identificar quatro micro-organismos de um fermento natural de uva para aplicação no desenvolvimento do fermento para pão. A caracterização fenotípica e genotípica indicou que duas amostras foram consideradas *Lactobacillus paracasei* e outra amostra como *Saccharomyces cerevisiae*.

A outra amostra foi identificada fenotipicamente como *Candida pelliculosa*, mas foi genotipicamente identificada como *Saccharomyces cerevisiae*. O resultado fenotípico deve ser confirmado por análise genotípica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

APHA. **American Public Health Association**. Compendium of methods of the microbiological examination of foods, 4th ed, Washington D.C. 2001.

ARENDR, E.K.; LIAM, A.M.R.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, p. 165–174, 2007.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OLIVEIRA, D.E.; LIMA, E.T.; CROCCI A.J. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp. isolados de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 319-325, 2009.

CHAVAN, R.S.; JANA, A. Frozen dough for bread making – a review. **International Journal Food Science, Technology and Nutrition**, v. 2, p. 9–27, 2008.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 3044–3051, 2000.

CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N.; GOBBETTI, M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdough of southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 95-104, 2001.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends Food Science and Technology**, v. 16, p.43–56, 2005.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 24, p. 120-127, 2007.

EDEMA, M.O.; SANNI, A.I. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. **Food Microbiology**, v. 25, p. 616–625, 2008.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L.M.T. Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 110, p.1085–1092, 2011.

GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V.; TZIA, C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends Food Science Technology**, v. 14, p. 99–108, 2003.

GÜL, H.; ÖZÇELİK, S.; SAGDIÇ, O.; CERTEL, M. Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 691–697, 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365–373, 2001.

LU, Z. H.; PENG, H. H.; CAO, W.; TATSUMI, E.; LI, L.T. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour *Mifen*, a traditional fermented rice noodle from China. **Journal Applied Microbiology**, v.105, p. 893-903, 2008.

LUANGSAKUL, N.; KEERATIPIBUL, S.; JINDAMORAKOT, S.; TANASUPAWAT, S. Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for chinese steamed buns in Thailand. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1404-1412, 2009.

MUGULA, J.K.; NARVHUS, J.A.; SØRHAUG, T. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. **International Journal Food Microbiology**, v. 83, p. 307– 318, 2003.

NIGATU, A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. **Journal Applied Microbiology**, v. 89, p.969-978, 2000.

PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINOS E.H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **Europe Food Research Technology**, v. 231, p. 883-890, 2010.

QURESHI, S.K.; MASUD, T.; SAMMI, S. Isolation and taxonomic characterization of yeast strains on the basis of maltose utilization

capacity for bread making. **International Journal Agriculture Biology**, v. 9, p.110-113, 2007.

REALE, A.; DI RENZO, T.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 237-244, 2011.

ROSENQUIST, H.; HANSEN, A. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. **Food Microbiology**, v. 17, p. 241–250, 2000.

SAEED, M.; ANJUM, F.M.; ZAHOOR, T.; NAWAZ, H.; REHMAN, S.U. Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. **International Journal Agriculture Biology**, v. 11, p. 329–332, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. **Journal Applied Microbiology**, v. 106, p. 1081–1092, 2009.

SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; VAN SCHOOR, A.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. **Applied Environment Microbiology**, v. 73, p. 6262-6269, 2007.

VERA, A.; LY-CHATAIN, M.H.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 369–377, 2012.

VOGEL, R.F.; BÖCKER, G.; STOLZ, P.; EHRMANN, M.; FANTA, D.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K.H.; HAMMES, W.P. Identification of lactobacilli from sourdough and

description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 223–229, 1994.

ZHANG, J.; LIU, W.; SUN, Z.; BAO, Q.; WANG, F.; YU, J.; CHEN, W.; ZHANG, H. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. *Food Control*, v. 22, p.767-774, 2011.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA AO CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DO FERMENTO NATURAL DE UVA BRASILEIRA

RESUMO

Este estudo avaliou a influência de cepas de *Lactobacillus paracasei* (LP1 e LP2) e de *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 e SC2) na fermentação e na sobrevivência ao congelamento e à liofilização, bem como os seus efeitos na preparação do fermento natural. Os micro-organismos foram cultivados em um sistema de fermentação descontínua durante 15 h, sendo realizadas as análises de pH, absorvância, biomassa seca e contagem em placas. LP1 teve a mesma fase exponencial que LP2, mas a sua velocidade específica de crescimento foi maior e estatisticamente diferente das demais ($P < 0,05$). As leveduras apresentaram um crescimento mais rápido que as bactérias lácticas. Os micro-organismos apresentaram uma boa estabilidade antes e após a liofilização e LP2 obteve a menor redução microbiana. Com relação ao fermento natural, foi verificado que com apenas 24 h de crescimento os microrganismos se desenvolveram satisfatoriamente. As BAL apresentaram maior biomassa e menor valor de pH. Os fermentos naturais preparados com BAL tiveram maior acidez que os preparados com leveduras. Todos os micro-organismos apresentaram crescimento microbiano satisfatório, sendo 48 h o tempo ideal. Com exceção de LP2, os maiores crescimentos microbianos foram com 48 h.

Palavras-chave: fermentação, cinética, liofilização, bactéria láctica, levedura.

STUDY OF FERMENTATION GROWTH KINETICS AND SURVIVAL TO FREEZING AND LYOPHILIZATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM BRAZILIAN GRAPE SOURDOUGH

ABSTRACT

This study was developed to evaluate the influence of strains of *Lactobacillus paracasei* (LP1 and LP2) and *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 and SC2) in fermentation and in survival during the processes of freezing and lyophilization, as well as their effect in the preparation of sourdough. The microorganisms were cultivated in a discontinuous fermentation system for 15 h and the analyses of pH, absorbance, dry biomass and plate counts were performed. LP1 showed the same exponential phase as LP2, and its specific speed of growth was higher and statistically different from the others ($P < 0.05$). The yeasts presented growth rates higher than the LAB. The microorganisms presented good stability before and after lyophilization, with LP2 showing lower microbial reduction. Regarding the sourdough, it was found that after only 24 h of growth the microorganisms showed good results. The LAB presented higher biomass yields and lower pH values. The sourdoughs prepared with LAB presented higher titratable acidity than those prepared with yeasts. All microorganisms showed a satisfactory microbial growth, with 48 h being the ideal time. With the exception of LP2, the highest growths were during a period of 48 h.

Key words: fermentation, kinetics, lyophilization, lactic acid bacteria, yeast.

4.1 INTRODUÇÃO

O fermento natural é uma mistura de farinha e água, fermentado por bactérias lácticas (BAL) e leveduras (HANSEN, 2006), apresentando algumas características específicas, como baixo pH e alta acidez. A microbiota de BAL é predominante ($8 \log \text{ UFC/ g}$) e é principalmente representada pelo gênero *Lactobacillus*. As leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces* e *Candida*, aparecem em níveis menores ($7 \log \text{ UFC/ g}$), podendo até mesmo estarem ausentes. O fermento natural pode ser obtido por diferentes métodos, através de fermentação espontânea ou de culturas *starters* específicas (DE VUYST; NEYSENS, 2005; HAMMES et al., 2005; CORSETTI; SETTANNI, 2007). A aplicação do

fermento natural nos pães é motivada pelos benefícios como *flavour*, textura, vida de prateleira e propriedades nutricionais (GÄNZLE et al., 2007).

A reinoculação microbiana consecutiva, também chamada de propagação dos micro-organismos, é usada para manter a microbiota (HÄGGMAN; SALOVAARA, 2008). Nestas propagações dominam as cepas mais adaptadas (LEROY; DE VUYST, 2004). Tulha et al. (2011) afirmaram que a propagação contínua do fermento natural visa manter os micro-organismos ativos. As culturas *starters* devem ser mantidas e propagadas diariamente. A indústria tornou disponíveis essas culturas na forma de concentrados congelados, secas ou liofilizadas. Algumas permitem, inclusive, a inoculação direta (SANDINE, 1996).

A qualidade e a vida de prateleira dos alimentos são determinadas pelo crescimento de micro-organismos, que depende de fatores intrínsecos, como atividade de água e acidez, e fatores extrínsecos, como a temperatura e a disponibilidade de oxigênio (WIJTZES et al., 1995). Variações entre o tipo de cultura *starter* usada na fermentação e as condições da fermentação (temperatura, tempo, pH etc) diferem significativamente, dependendo do processo aplicado (HANSEN; SCHIEBERLE, 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de cepas de *Lactobacillus paracasei* e de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação, na sobrevivência ao congelamento e à liofilização, bem como os efeitos da preparação do fermento natural usando a técnica de três estágios.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Cultivo dos microrganismos

O fermento natural foi produzido utilizando como substrato suco da uva Niágara rosada adquirida no comércio local e previamente higienizada. As cepas usadas neste estudo foram isoladas do fermento natural de uva e caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente como: *Lactobacillus paracasei* (LP1 e LP2) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 e SC2).

Os inóculos foram produzidos a partir de uma cultura isolada repicada mensalmente, ativados em tubos individuais contendo 5 mL de caldo MRS (Difco, Sparks, USA) a 30 °C/ 16 h para as BAL, e caldo extrato de malte (Himedia, Mumbai, Índia) a 25 °C/ 24 h para as leveduras. A população final do inóculo foi de 5,45 log UFC/ g para

LP1; 9,79 log UFC/ g para LP2; 4,67 log UFC/ g para SC1 e 4,54 log UFC/ g para SC2.

Os micro-organismos foram cultivados em um sistema de fermentação descontínua (modelo Bioflo 2000, New Brunswick Scientific, USA), contendo 4,5 L de caldo a 100 rpm por 15 h. Após cada cultura atingir a fase estacionária o fermentado foi centrifugado (modelo NT-825, Novatécnica, Piracicaba, Brasil) a 6000 x g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa foi lavada duas vezes com água peptonada estéril (0,1 g 100 g⁻¹) usando o mesmo volume do caldo e ressuspendidas a 1/40 de volume em leite desnatado reconstituído (10 % m.v⁻¹) como crioprotetor (adaptado de FIORENTINI et al., 2009). A solução foi congelada a -20 °C em tubos de 50 mL, utilizando apenas 1/3 da sua capacidade. Todo o processo foi realizado sob condições assépticas.

4.2.2 Avaliação do fermentado

As amostras foram coletadas a cada 60 min, por 15 h seguidas, em frascos estéreis para realização das análises de pH, absorvância, biomassa seca e contagem em placas. O pH foi medido em phmetro (modelo Q - 400^a, Quimis, Diadema, Brasil) e a absorvância em espectrofotômetro (modelo U 2010, Hitachi, Tóquio, Japão) a 660 nm (OD_{660nm}) (ANASTASSIADIS et al., 2005; EDWARD et al., 2011). A biomassa seca foi obtida por filtração em membranas Durapore HV 0,45µm (Millipore) e seca em estufa a 60 °C, até peso constante, e o resultado foi expresso em g/ L. A avaliação do crescimento foi determinada por contagem em placas do logaritmo do número de células viáveis (log UFC/ g). As BAL foram cultivadas em ágar MRS (Difco, Sparks, USA) a 30 °C/ 48h, e as leveduras em ágar PDA (Himedia, Mumbai, India) com ácido tartárico 10% a 25 °C/ 72h. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições em duplicata.

4.2.3 Velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação

A cinética da fermentação foi realizada para verificar o tempo exponencial de cada micro-organismo para efetuar a maior coleta de biomassa. A velocidade específica de crescimento, μ (h⁻¹) e o tempo de duplicação t_d (h) das BAL e das leveduras, a partir das curvas de crescimento do número de células viáveis (UFC/ g) versus tempo (h), foram calculados.

A taxa máxima da velocidade específica de crescimento está de acordo com o coeficiente angular (inclinação) da equação linear do logaritmo natural do número de colônias $\ln [N]$ em função do período de fermentação t (h), relacionado com a fase de crescimento exponencial, determinada pela regressão linear (RIBEIRO; HORII, 2004).

O tempo de duplicação (t_d) foi definido por Montville (1997) e pode ser calculado seguindo a Equação (1).

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (1)$$

4.2.4 Liofilização

Amostras dos micro-organismos foram acopladas a um liofilizador (modelo LT1000, Terroni, São Carlos, Brasil) por 24 h a 90 μ Hg de vácuo. As culturas liofilizadas foram armazenadas a - 20 °C.

4.2.5 Sobrevivência dos micro-organismos após a liofilização

A sobrevivência dos micro-organismos foi verificada pelo log do número de células viáveis em unidades formadoras de colônia por g (log UFC/ g), antes e após a liofilização. Uma alíquota da cultura em solução de leite foi retirada e submetida à diluição decimal utilizando água peptonada estéril (0,1 g 100 g⁻¹), plaqueadas e incubadas. As amostras liofilizadas foram analisadas inicialmente e, após 6 meses, ressuspensas em água peptonada, diluídas, plaqueadas e incubadas (PALMFELDT; HAHN-HÅGERDAL, 2000). Experimentos foram realizados em três repetições em triplicata.

4.2.6 Elaboração do fermento natural

Para a preparação do fermento natural foi utilizada a técnica de três estágios (72 h) adaptada de Paramithiotis et al. (2005). A massa (M1) foi preparada misturando 60 mL de água com 50 g de farinha de trigo, 0,5g de cultura *starter* (1 % peso da farinha, PLESSAS et al., 2008) e 0,25 g de NaCl, e incubadas a 30 °C. Após 24 h de incubação o fermento natural 1 (FN1) foi obtido. Para formar a massa 2 (M2), foi misturado 100 g de FN1 com 200 g de farinha de trigo e 100 mL de água. Após 24 h de incubação o fermento natural 2 (FN2) foi formado. Para formar a massa (M3), foi misturado 100 g de FN2 com 200 g de farinha de trigo e 100 mL de água. Após 24 h de incubação o fermento natural 3 (FN3) foi finalizado.

4.2.7 Avaliação do fermento natural

Foram realizadas as análises de pH, acidez titulável (ATT) e contagem em placas nas amostras do fermento natural, em um intervalo de 3 dias, a cada 24 h.

O pH e a acidez foram verificados utilizando 0,1N NaOH/ 100g (IAL, 2004). A ATT foi expressa em mL 0,1N NaOH/ 100g. A avaliação do crescimento foi determinada pela contagem em placas do logaritmo do número de células viáveis (\log UFC/ g) usando o método *pour plate*. Asépticamente, 25 g de cada massa foi misturada com 225 mL de água peptonada estéril (0,1 g 100 g⁻¹) em *stomacher* (modelo P, Interscience, St. Nom, França). Foram realizadas as diluições necessárias de BAL e leveduras, sendo aquelas cultivadas em ágar MRS a 30 °C/ 48 h e estas em ágar PDA com ácido tartárico 10% a 25 °C/ 72 h. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica[®] versão 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). A cinética do crescimento na fermentação durante 15 h e o comportamento dos fermentos naturais com diferentes micro-organismos durante 72 h foi estudado aplicando o modelo de regressão linear simples, dado por $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$, onde X é o tempo de fermentação, em horas. As diferenças entre as médias foram calculadas através da análise de variância (ANOVA) *one-way* utilizando o teste de *Tukey*. Foram consideradas significativas as diferenças ao nível de 5 % ($P < 0,05$).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Cinética de crescimento na fermentação

Culturas *starters* podem ser compostas por cepas individuais de BAL ou por misturas de BAL e leveduras. Seu uso garante a produção de um pão de qualidade. Os tipos de *starters* requerem conhecimento prévio das suas características bioquímicas e dos potenciais micro-organismos destinados aos panificados. O desempenho de BAL isoladas tem sido estudado pelas influências nas propriedades da massa, como o pH, a acidez titulável total e a produção de ácidos acético e láctico durante a fermentação (COLLAR, 1996; CORSETTI et al., 1998; HAMMES; GÄNZLE, 1998). Geralmente o uso de culturas

starters resulta na produção de pães com alta qualidade, exibindo um alto grau de aceitação (PARAMITHIOTIS et al., 2005).

As equações estimadas da análise de regressão linear para pH, absorvância a 660 nm, biomassa seca e contagem microbiana dos microorganismos estudados nas 15 h estão ilustradas na Figura 1 (A, B, C e D).

As análises de regressão linear nas 15 h indicaram que os coeficientes angulares e lineares de SC1 e SC2 e o coeficiente angular de LP1 e LP2 referente às taxas de decréscimo do pH (Figura 1A) foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Portanto, não rejeitamos H_0 pelo teste F ao nível de significância de 5%, onde H_0 indica que os coeficientes angulares são iguais. Todos os outros contrastes apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Na análise de pH foi observado um coeficiente de determinação maior para as BAL (LP1: 0,9090; LP2: 0,9823), seguido das leveduras SC2 (0,8328) e SC1 (0,6577).

De acordo com os resultados obtidos para a taxa de crescimento da absorvância a 660nm nas 15 h de fermentação (Figura 1B), constatou-se que os coeficientes de regressão de LP1/ SC2 foram iguais entre si. Os coeficientes lineares foram significativamente diferentes para LP1/ SC2 e para SC1/ SC2. Foi observado um coeficiente de determinação maior na absorvância para LB, seguido por SC2; SC1 e LP1 ($r^2 = 0,9878$; $0,9726$; $0,9530$; $0,8111$).

A análise de regressão referente ao aumento da biomassa nas 15 h (Figura 1C), através do teste F para contraste dos coeficientes angulares, indicou que LP1 e SC2 diferem entre si, ou seja, apresentam taxas de crescimento diferentes ao nível de significância de 5%. Todos os outros testes de comparação de coeficientes angulares não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$). Com relação ao coeficiente linear, somente SC1 e SC2 foram iguais entre si. As outras comparações entre os coeficientes lineares foram significativamente diferentes ($P < 0,05$). SC2 obteve o maior resultado do coeficiente de determinação para biomassa seca, de 0,9717, seguida de LP2, SC1 e LP1 (0,9369, 0,8953, 0,8426).

Para contagem em placas nas 15 h (Figura 1D), a análise de regressão indicou que os coeficientes angulares e lineares de SC1 e SC2, e o coeficiente linear de LP1 e SC1 foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Portanto, não rejeitamos H_0 pelo teste F ao nível de significância de 5%. Todas as outras comparações entre coeficientes angulares e lineares deram diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os maiores coeficientes de determinação (r^2) na contagem em placas foram

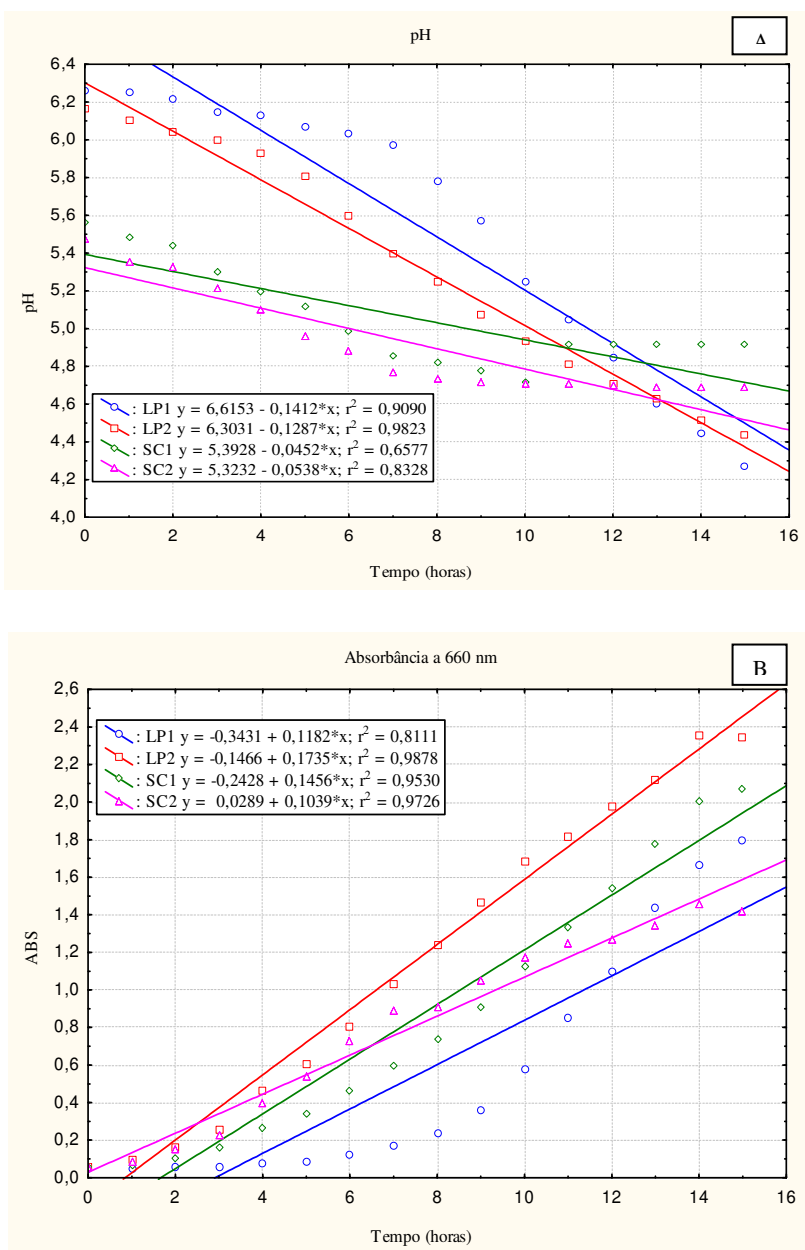
para LP2 e LP1 (0,9926 e 0,9772), seguidos de SC2 (0,8159) e SC1 (0,7271).

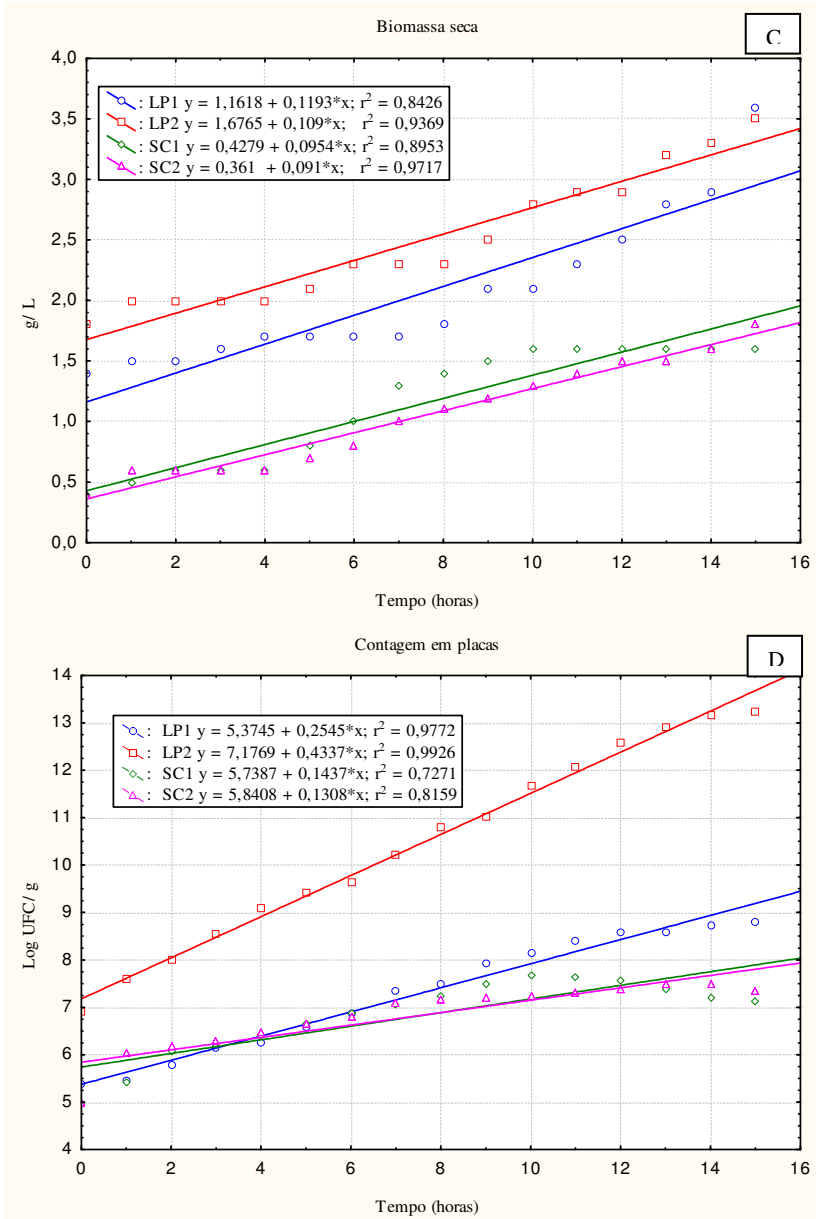
Cepas de *L. fermentum* BFE 6620 produziram 2,8 g/ L de biomassa comparada a 2,6 g/ L de *Lactobacillus mesenteroides* ssp. *mesenteroides* BFE 7668 1 e 5,1 g/ L por *L. plantarum* BFE 6688. *L. fermentum* BFE 662 com 18 h de fermentação obteve contagem microbiana final de 11,6 (log UFC/ g), enquanto *L. plantarum* BFE 6713 apresentou 12,2 log UFC/ g. A produção de biomassa por *Weissella paramesenteroides* BFE7601 e BFE7608 foram de 1,4 e 3,7 g/ L, respectivamente e as contagens no liofilizado foram entre 11,3 e 12,2 log UFC/ g. O tempo de fermentação foi entre 8 e 14,5 h. (EDWARD et al., 2011).

León et al. (2006) afirmaram que *L. brevis* LBM13 apresentou um crescimento acelerado desde o início, com uma contagem de 5,61 log UFC/ g (absorbância 0,130) em 10h, com 11,91 log UFC/ g (absorbância 1,180) alcançou, em 12 h, a fase estacionária e o declínio com 21 h. Salovaara (2004) obteve valores de crescimento aproximados entre 7 e 8 h de cultivo, com 9,28 UFC/ g. Corsetti et al. (2000) relataram que a absorbância obtida excede o máximo registado de 1,25 para uma contagem de 9 UFC/ g de BAL quando se cultiva a 24 °C em caldo MRS. A contagem de *L. plantarum* variou entre 9,1 e 10,6 log UFC/ g nas formulações inoculadas após 48 h de fermentação (EDWARD et al., 2011). O pH inicial de *L. brevis* LBM13 foi de 6,33 e em 10 h foi de 4,98. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que este micro-organismo é considerado ideal na elaboração de fermentos naturais, ante a sua rápida adaptação ao meio (LEÓN et al., 2006).

A maior velocidade específica de crescimento foi para LP1, onde se observou, após 15 h, o pH de $4,28 \pm 0,16$, absorbância de $1,793 \pm 0,15$ e $8,81 \log \text{ UFC/ g}$. Também com 15 h, LB1 apresentou pH de $4,44 \pm 0,01$, absorbância de $2,346 \pm 0,06$ e $13,23 \log \text{ UFC/ g}$. O rendimento da biomassa de $3,6 \pm 0,28$ e $3,5 \pm 0,14 \text{ g/ L}$ foi obtido por LP1 e LP2, respectivamente. SC1 apresentou, após 10 h, pH de $4,72 \pm 0,30$, enquanto SC2, após 14 h, obteve $4,69 \pm 0,17$. Ambas as leveduras apresentaram a mesma biomassa, de $1,6 \pm 0,00 \text{ g/ L}$, absorbância de $1,479 \pm 0,01$ e $1,456 \pm 0,01$, e contagem em placas de $7,68 \log \text{ UFC/ g}$ e $7,50 \log \text{ UFC/ g}$, respectivamente. Os resultados mostram que as leveduras apresentaram crescimento mais rápido que as BAL. Entretanto, as BAL apresentaram maior rendimento da biomassa e menor valor de pH.

Figura 1 - Evolução do pH (A), absorbância a 660nm (B), biomassa seca (C) e contagem em placas (D) ao longo do tempo.



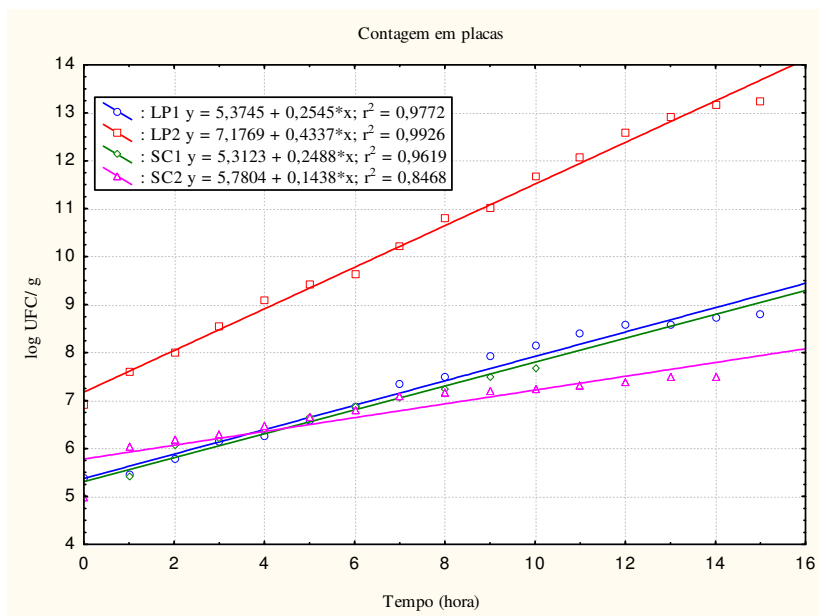


LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.2 Avaliação da velocidade específica de crescimento e do tempo de duplicação

A evolução da contagem microbiana na fase exponencial ao longo do tempo está ilustrada na Figura 2. A velocidade específica de crescimento e o tempo de duplicação dos micro-organismos estão apresentados na Tabela 1.

Figura 2 - Evolução da contagem microbiana na fase exponencial ao longo do tempo.



LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 1 - Velocidade específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (t_d) dos micro-organismos.

Amostras	μ (h^{-1})	t_d (h)
LP1	$0,586 \pm 0,00^b$	$1,18 \pm 0,00^b$
LP2	$0,999 \pm 0,03^c$	$0,69 \pm 0,02^a$
SC1	$0,573 \pm 0,01^b$	$1,20 \pm 0,02^b$
SC2	$0,331 \pm 0,01^a$	$2,09 \pm 0,08^c$

Resultados como média \pm desvio padrão. ^{a-c} Letras diferentes sobrescritas entre as amostras na mesma coluna indicam diferença significativa (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

A duração da fase lag pode variar consideravelmente. Pode ser curta ou não existir se o inóculo foi proveniente de uma cultura em fase exponencial de crescimento, ou pode ser longa se o inóculo for obtido de um meio rico e o micro-organismo for colocado em um meio mínimo definido. Nesse caso, provavelmente o micro-organismo teria que sintetizar muitas proteínas envolvidas na geração dos componentes celulares que estavam prontamente disponíveis no meio complexo (INGRAHAM et al., 1997).

A fase exponencial da cultura LP foi de 0 a 15 h. LP1 apresentou uma velocidade específica de crescimento de $0,586 h^{-1}$, correspondendo ao tempo de duplicação de 1,18 h. Apesar dos inóculos serem provenientes de culturas em fase exponencial, houve uma fase de latência de 1 h para LP1. Reações cinéticas de primeira ordem podem ser usadas para descrever as alterações no número de células durante a fase exponencial de crescimento. Microbiologistas de alimentos geralmente usam o tempo de duplicação (t_d) como uma constante cinética para descrever a velocidade de crescimento exponencial (MONTVILLE, 1997).

LP2 apresentou a mesma fase exponencial que LP1, mas a sua velocidade específica de crescimento foi maior, de $0,999 h^{-1}$ com 0,69 h de tempo de duplicação, sendo estatisticamente diferente dos demais ($P < 0,05$). No caldo com LP2 o valor de r^2 foi de 0,9926, significando que o ajuste da regressão explica 99,26 % da variação total de Y, sendo apenas 0,74 % para a variação residual (erro), o que é considerado um bom ajuste.

No caldo com a levedura SC1 a fase exponencial foi menor, apenas 10 h, com $0,573 \text{ h}^{-1}$ de velocidade específica de crescimento e 1,20 h de tempo de duplicação. Os coeficientes de regressão de contagem microbiana na fase exponencial de LP1 e SC1 foram iguais ($P > 0,05$). Todos os outros coeficientes angulares e lineares foram significativamente diferentes entre si.

No caldo com SC2 a cultura se manteve em fase exponencial durante 14 h (0 a 14 h), cujo tempo foi utilizado para estimar a equação de regressão linear. A velocidade específica de crescimento foi de $0,331 \text{ h}^{-1}$, com o maior tempo de duplicação de 2,09 h, sendo estatisticamente diferente dos demais ($P < 0,05$).

Shin et al. (2000) afirmaram que o tempo de duplicação da *Bifidobacterium* spp. (Bf-1), crescida em leite desnatado, foi de 3,95 h. *Lactobacillus* sp. (LB - 12) mostraram maior velocidade específica de crescimento e, portanto, menor tempo de duplicação (μ : $0,5480 \text{ h}^{-1}$; T_d : 1,2 h). *Lactobacillus acidophilus* (B/ 103-1-5) apresentou velocidade específica de crescimento de $0,4930 \text{ h}^{-1}$ e T_d de 1,4 h (BRIZUELA et al., 2001). A velocidade específica de crescimento é o principal parâmetro de controle da indústria na produção de levedura para panificação (VAN HOEK et al., 1998). Vrancken et al. (2008) estudaram a produção de *L. fermentum* IMDO 130101 e relataram que a maior velocidade específica de crescimento foi observada usando frutose ($0,85 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) e maltose ($0,82 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$). Adamberg et al. (2003) relataram que o pH reduziu de 6,2 para 5,8, e a velocidade específica de crescimento de *L. bulgaricus* foi quase constante ($1,15 \text{ h}^{-1}$). *L. acidophilus* La5 e *L. paracasei* E1H3 tiveram a menor velocidade específica de crescimento, $0,5$ e $0,3 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

4.3.3 Sobrevivência ao congelamento e liofilização

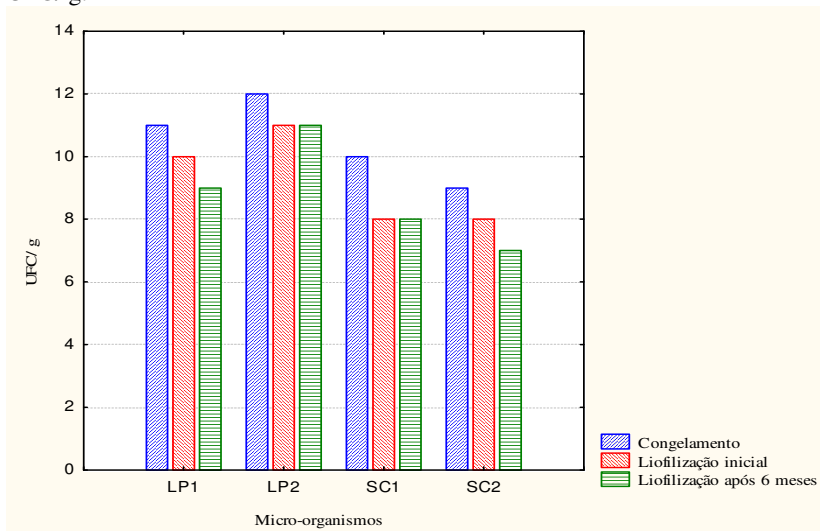
LP2 e LP1 congeladas apresentaram resultados próximos, de 11,81 e 11,28 log UFC/ g, respectivamente, considerando uma redução de 0,53 ciclos de log.

O maior índice de sobrevivência após a liofilização foi para LP2, que apresentou 1,65 ciclos de log a mais que LP1. LP1 congelada e LP2 liofilizada apresentaram resultados próximos.

Com relação às leveduras, vale destacar que antes da liofilização SC1 apresentou 9,77 log UFC/ g, enquanto SC2 apresentou 8,91 log CFU/ g, representando uma redução de 0,86 ciclos de log. O maior índice de sobrevivência entre as liofilizadas foi para SC1, com 8,30 log UFC/ g, enquanto SC2 apresentou 7,5 log UFC/ g. Durante os 6

meses de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi constatada uma pequena redução no número de células. Os resultados indicam que os micro-organismos utilizados neste estudo apresentaram uma boa estabilidade antes e após a liofilização, e LP2 mostrou a menor redução microbiana. Estes resultados estão ilustrados na Figura 3.

Figura 3 - Sobrevivência de micro-organismos congelados e liofilizados em log UFC/ g.



LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

Fiorentini et al. (2009) relataram que cepas de *Staphylococcus xyloso* AD1 e U5 armazenadas por 1 e 6 meses, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresentaram boa estabilidade no processo de liofilização. Uma pequena diminuição do número de células foi observada durante a estocagem, que ocorre devido aos efeitos positivos das condições de estocagem e também do crioprotetor utilizado (leite em pó). Condições de armazenamento desejáveis para culturas liofilizadas são: congelamento a temperaturas mais baixas que $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ausência de oxigênio e umidade. Sob essas condições a atividade da cultura *starter* é garantida por oito meses (BUCKENHÜSKES, 1993). De acordo com Carvalho et al. (2004), o leite em pó é capaz de prevenir a injúria celular pela estabilização da membrana celular, e fornece um revestimento protetor para as células.

Zhao e Zhang (2005) reportaram que a alta sobrevivência de *L. brevis* e *Oenococcus oeni* foram obtidos com reidratação com 10% de sacarose e meio MGY (minimal glycerol), respectivamente. As células bacterianas *L. brevis* e *O. oeni*, quando congeladas rapidamente (- 65 °C), mostraram maior viabilidade após a liofilização do que quando congeladas lentamente (- 20 °C).

4.3.4 Análises dos fermentos naturais

As equações de regressão, estimadas a partir dos dados experimentais, e os coeficientes de determinação para os diferentes microrganismos podem ser observados nas Figuras 3 (A, B e C). As análises de regressão linear indicaram que as taxas de decréscimo do pH (Figura 4A) e de aumento da acidez titulável (Figura 4B), dos quatro micro-organismos, são iguais ao longo do tempo pelo teste F para comparação dos coeficientes de regressão (β_1) ao nível de significância de 5 %, sendo as quatro retas paralelas estatisticamente. Foi observado um coeficiente de determinação maior no pH para SC1, seguido por SC2; LP2 e LP1 ($r^2 = 0,9998$; $0,9799$; $0,8165$; $0,7177$, respectivamente). Entre os grupos, o menor valor do pH final foi da bactéria láctica LP1, com $2,98 \pm 0,03$. Já no grupo das leveduras, o menor valor final foi para SC1, com $3,84 \pm 0,01$.

As leveduras SC1 e SC2 obtiveram os maiores valores do coeficiente de determinação na análise de ATT, com valores iguais a 0,9930 e 0,9925, respectivamente, tendo em vista que os seus resultados apresentaram um crescimento progressivo ao longo do tempo. O maior valor de ATT com 72h foi para LP1, com $14,70 \pm 0,90$, seguido de LP2 com $13,16 \pm 0,36$ mL 0,1N NaOH/ 100g. As leveduras SC1 e SC2 apresentaram $9,66 \pm 1,12$ e $7,60 \pm 0,55$ mL 0,1N NaOH/ 100g, respectivamente. A partir dos resultados obtidos constatou-se que os fermentos elaborados com bactérias lácticas apresentaram menor pH e maior ATT que os elaborados com leveduras. Também foi constatada uma tendência à aproximação dos resultados pelos grupos de microrganismos.

O valor do pH para os fermentos naturais da Grécia variaram entre 3,56 e 3,71, a ATT de 14,5 e 19,3 mL 0,1 N NaOH/ 100g. A população de BAL e leveduras variaram entre 8,23 e 8,51 e de 7,00 a 7,87 log UFC/ g, respectivamente (PARAMITHIOTIS et al., 2010). O pH variou de 3,57 a 3,85 e ATT variou de 10,1 a 12,5 mL 0,1 N NaOH/ 100g. A inclusão de espécies complementares de BAL e a aplicação da

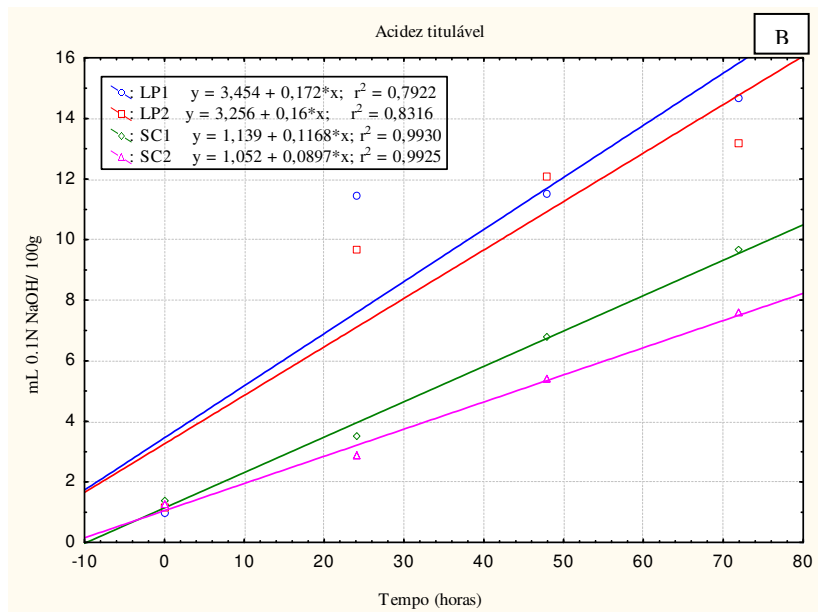
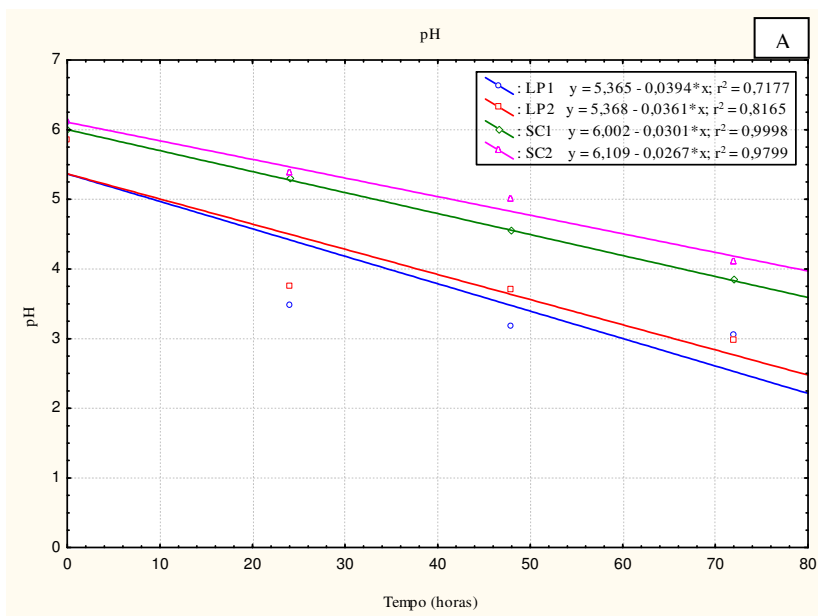
técnica de três estágios produziu efeito na acidificação da massa (PARAMITHIOTIS et al., 2005).

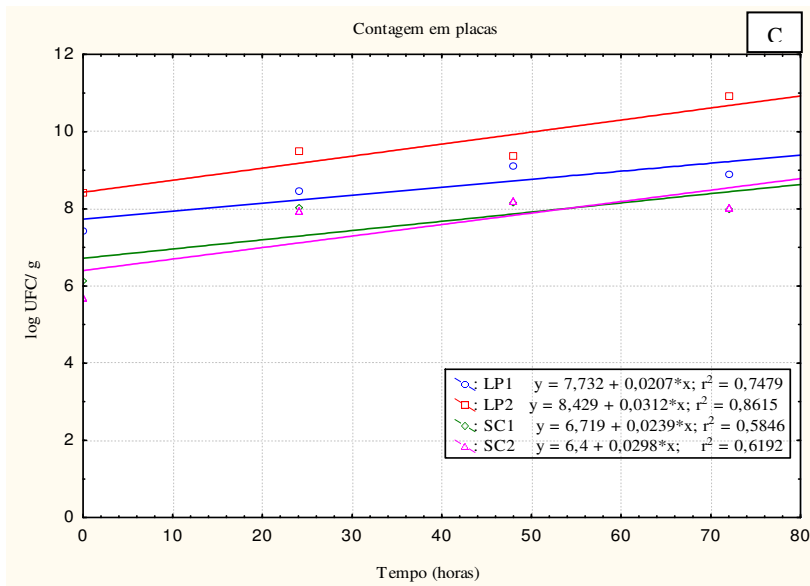
Com exceção de LP2, os maiores crescimentos microbianos foram com 48 h de fermentação, sendo o maior valor para LP1, com 9,12 log UFC/ g. Nesse mesmo período as leveduras obtiveram um crescimento próximo, com 8,20 log UFC/ g para SC2 e 8,16 log UFC/ g para SC1. Com 72 h de fermentação houve uma redução de 0,24, 0,18 e 0,16 ciclos de log para LP1, SC2 e SC1, respectivamente. Já para LP2 houve um aumento de 1,54 ciclos de log. A partir dos resultados constatou-se que, com apenas 24 h de crescimento, os microrganismos se desenvolveram satisfatoriamente. Porém, com exceção de LP2, os maiores crescimentos microbianos foram com 48 h.

Contagens em placas de BAL e leveduras, na fermentação espontânea de farinha de milho, foram estudadas por Edema e Sanni (2008). A contagem de BAL aumentou de 4,62 log UFC/ g no tempo inicial (0 h) para 6,45 log UFC/ g após 48 h de fermentação, enquanto as leveduras aumentaram de 4,18 a 6,64 log UFC/ g no mesmo período. Saeed et al. (2009) pesquisaram no Paquistão quinze amostras de fermentos, e constataram que a contagem de BAL foi entre 4,8 e 7,84 log UFC/ g e das leveduras entre 3,8 e 7,9 log UFC/ g.

Para contagem em placas (Figura 4C), a análise de regressão indicou que apenas os coeficientes lineares de LP2 e SC2 foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Portanto, não rejeitamos H_0 pelo teste F ao nível de significância de 5 %. Todos os outros contrastes obtiveram diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$). O baixo valor do coeficiente de determinação (r^2) para SC1 e SC2 indicam uma possível associação com outros fatores além do tempo, tais como espécie do micro-organismo, quantidade de nutrientes e temperatura.

Figura 4 - Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e contagem em placas (C) dos fermentos naturais ao longo do tempo.





LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as leveduras apresentaram velocidade específica de crescimento menor que as BAL. Entretanto, as BAL apresentaram maior rendimento da biomassa e menor valor de pH.

LP2 apresentou a mesma fase exponencial que LP1, sendo sua velocidade específica de crescimento maior e estatisticamente diferente dos demais ($P < 0,05$). SC2 apresentou a menor velocidade específica de crescimento ($P < 0,05$), diferente de LP2 e SC1. Neste estudo os micro-organismos apresentaram boa estabilidade antes e após a liofilização, sendo que LP2 apresentou menor redução microbiana.

Com relação ao fermento natural, verificou-se que os elaborados com bactérias lácticas apresentaram menor pH e maior acidez titulável que os elaborados com leveduras. De uma maneira geral, o tempo ideal para o crescimento microbiano foi de 48 h. Todos os micro-

organismos apresentaram um crescimento microbiano satisfatório para futura aplicação em pães.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ADAMBERG, K.; KASKA, S.; PAALMEA, T.L.T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 171–183, 2003.

ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, A.; WANDREY, C.; REHM, H.J. Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 91, p. 494-501, 2005.

BRIZUELA, M. A.; SERRANO, P.; PÉREZ, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 95-99, 2001.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology**, v. 12, p. 253-272, 1993.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 835-847, 2004.

COLLAR, C. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications. **Food Science and Technology International**, v. 2, p. 349–367, 1996.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. **Journal of Food Science**, v. 63, 347–351, 1998.

CORSETTI, A.; GOBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, I. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 3044-3051, 2000.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, p. 539-558, 2007.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p. 43-56, 2005.

EDEMA, M.O.; SANNI, A.I. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. **Food Microbiology**, v. 25, p. 616-625, 2008.

EDWARD, V. A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; VAN ZYL, P. J.; SINGH, S., HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C.M.A.P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. **Food Control**, v. 22, p. 389-395, 2011.

FIorentini, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. Viability of *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal sausages for application as starter cultures in meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 129-133, 2009.

GÄNZLE, M.G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R.F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, v. 24, p.128-138, 2007.

HÄGGMAN, M.; SALOVAARA, H. Microbial re-inoculation reveals differences in the leavening power of sourdough yeast strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 148-154, 2008.

HAMMES, W.P.; BRANDT, M.J.; FRANCIS, K.L.; ROSENHEIM, J.; SEITTER, M.F.H.; VOGELMANN, S.A. Microbial ecology of cereal

fermentations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 4-11, 2005.

HAMMES, W. P.; GÄNZLE, M. G. **Sourdough breads and related products**. In: WOODS, B. J. B. *Microbiology of Fermented Foods*. London: Blackie Academic/ Professional, 1998, p. 199–216.

HANSEN, A.; SCHIEBERLE, P. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. **Trends in Food Science Technology**, v. 16, p. 85–94, 2005.

HANSEN, A. **Sourdough bread**. In: HUI, Y. H.; SHERKA, F. *Handbook of food science, technology and engineering*. 4 ed., Taylor and Francis Group, LLC, 2006, 928p.

IAL. **Instituto Adolfo Lutz**. *Physico-chemical methods for food analysis*, 4 ed, São Paulo, Brasil. 2004.

INGRAHAM, J.L.; MAALØE, O.; NEIDHARDT, F.C. **Microbial growth**. In: PERRY, J.J.; STALEY, J.T. *Microbiology: dynamics and diversity*. Fort Worth: Sauders College Publishing, 1997, p. 136-157.

LEÓN, A.M.; MONTOYA, O.I.; MOTATO, K.E.; GRANDA, D.M.; CARO, C.A.; RESTREPO, J.M.; ECHEVERRI, S.; VALENCIA, J.; QUINCHÍA, L. Bacterias ácido lácticas silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 13, p. 26-35, p. 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 67–78, 2004.

MONTVILLE, T.J. **Principles which influence microbial growth, survival and death in foods**. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, DC: ASM, 1997, p. 13-29.

PALMFELDT, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 235–238, 2000.

PARAMITHIOTIS, S.; CHOULIARAS, Y.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2813–2819, 2005.

PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINOS E.H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **Europe Food Research Technology**, v. 231, p. 883-890, 2010.

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; POONAM, N.; ATHANASIOS, A.K. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, p. 985-990, 2008.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Negative H₂S character and flocculation as yeast strain markers for inoculum recovery. **Science Agriculture**, v. 61, p. 292-297, 2004.

SAEED, M.; ANJUM, F.M.; ZAHOOR, T.; NAWAZ, H.; REHMAN, S.U. Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. **International Journal Agriculture Biology**, v. 11, p. 329-332, 2009.

SALOVAARA, H. **Lactic acid bacteria in cereal-based products**. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND A. Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. Nueva York: Marcel Dekker, 2004, p. 115-135.

SANDINE, W. E. (1996). **Commercial production of dairy starter cultures**. In: COGAN, T. M.; ACCOLAS, J.P. Dairy starters culture. New York: J.P. VCH., 1996, p. 101-129.

SHIN, H. S.; LEE, J.H.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 884-887, 2000.

TULHA, J.; CARVALHO, J.; ARMADA, R.; FARIA-OLIVEIRA, F.; LUCAS, C.; PAIS, C.; ALMEIDA, J.; FERREIRA, C. **Yeast, the man's best friend**. INTECH Open Access Publisher, p. 255-278, 2011.

VAN HOEK, P.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4226–4233, 1998.

VRANCKEN, G., RIMAUX, T., DE VUYST, L. LEROY F. Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 58–66, 2008.

WIJTZES, T.; DE WIT, J. C.; IN'T VELD, J. H. J. H.; VAN TRIET, K.; ZWIETERING, M. H. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2533–2539, 1995.

ZHAO, G.; ZHANG, G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 333–338, 2005.

CAPÍTULO 5

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO PÃO COM FERMENTO NATURAL

RESUMO

O fermento natural é usado no processamento de vários produtos de panificação. As cepas usadas no preparo dos fermentos foram de *Lactobacillus paracasei* e *Saccharomyces cerevisiae*. Das amostras de massa crua, foi analisado o pH, a acidez titulável e a contagem em placas. Das amostras do pão, foi analisado o pH, a acidez titulável e o volume específico. As amostras foram analisadas num intervalo de 2 h, entre 4 e 10 h de fermentação. Ao final, os menores valores de pH foram para a massa crua com LP2 e o pão com SC1. Os valores de acidez titulável aumentaram ao longo do tempo, apresentando os maiores teores de acidez a massa e o pão com leveduras. As bactérias lácticas apresentaram as maiores contagens microbiológicas ao longo do tempo. Com exceção de SC2, os maiores crescimentos microbianos foram com 10 h de fermentação. LP1 apresentou menor volume em todas as horas ($P < 0,05$). Os maiores volumes encontrados nos pães foram com 6 h de fermentação. SC1 apresentou os melhores resultados de volume específico durante todo o período.

Palavras-chave: fermento natural, pão, bactéria láctica, levedura, regressão linear.

INFLUENCE OF FERMENTATION TIME IN THE CHARACTERISTICS OF SOURDOUGH BREAD

ABSTRACT

The sourdough is used in the manufacture of a number of bakery products. The strains used in the preparation of the sourdoughs were *Lactobacillus paracasei* and *Saccharomyces cerevisiae*. Samples of raw dough were analyzed for pH, titratable acidity and plate counts and samples of bread were analyzed for pH, titratable acidity and specific volume. The samples were analyzed in a range of 2 h, between 4 and 10 h of fermentation. At the end of 10 hours of fermentation, the lower values of pH were for the dough with LP2 and the bread with SC1. Values titratable acidity were increasing over time, with the highest levels of acidity of dough and of bread with yeast. Lactic acid bacteria showed the highest microbial counts over time. With the exception of SC2, the biggest microbial increases were with 10 hours of fermentation. LP1 showed the lowest volume in all hours ($P < 0.05$). The largest volumes were found in breads were with 6 hours of fermentation. SC1 showed the best values of specific volume in all times.

Key words: sourdough, bread, lactic acid bacteria, yeast, linear regression.

5.1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da demanda dos consumidores por produtos naturais, saborosos e saudáveis, a produção do tradicional processo do fermento natural de pão vem sendo empregada com sucesso nos últimos anos (BRÜMMER; LORENZ, 1991; THIELE et al., 2002; LOPEZ et al., 2003). O fermento natural tem sido empregado no processamento de vários produtos, como pães, bolos e biscoitos (DE VUYST; GÄNZLE, 2005).

Gocmen et al. (2007) e Thiele et al. (2002) afirmaram que a aplicação do fermento natural em pães de trigo produz vários efeitos, incluindo levedação, acidificação, melhoria das propriedades da massa, *flavour*, textura, redução da firmeza e do envelhecimento, aumentando a resistência à deterioração microbiana e melhoria da disponibilidade de nutrientes nos produtos. Esses benefícios são provenientes das bactérias lácticas (BAL) e leveduras, que estão presentes nos fermentos naturais.

A adição do fermento natural ocasiona mudanças nas propriedades reológicas da massa de trigo, tornando-a macia, menos elástica e facilmente extensível (CLARKE et al., 2002). A massa deve conter um grande volume de gás e manter uma reserva para o seu aumento no forno (BLOKSMA, 1990). Além disso, existem outros fatores que devem ser considerados, como o tipo de farinha, as condições de fermentação do fermento natural (pH e temperatura), a seleção da cultura *starter* específica e as propriedades metabólicas, como a produção de compostos voláteis (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). Nesta pesquisa, foi verificada a influência do tempo de fermentação no pH, na acidez titulável, na contagem microbiológica e no volume da massa e dos pães.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismos

As bactérias lácticas *Lactobacillus paracasei* (LP1 - 9,4 log UFC/ g e LP2 - 11,11 log UFC/ g), e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 - 8,18 log UFC/ g e SC2 - 7,16 log UFC/ g), foram isoladas do fermento natural de uva, liofilizadas e aplicadas neste estudo.

5.2.2 Elaboração do fermento natural

Os fermentos naturais foram preparados isoladamente com cada cepa utilizando 1% de micro-organismos (p/ p base da farinha, PLESSAS et al., 2008), e fermentado por 48 h.

A massa (M1) foi preparada misturando 60 mL de água com 50 g de farinha de trigo, 0,5g de cultura *starter* e 0,25 g de NaCl, e incubadas a 30 °C. Após 24 h de incubação o fermento natural 1 (FN1) foi obtido. Para formar a massa 2 (M2), foi misturado 100 g de FN1 com 200 g de farinha de trigo e 100 mL de água. Após 24 h de incubação o fermento natural 2 (FN2) foi formado, de acordo com Paramithiotis et al. (2005), com modificações.

5.2.3 Análise das massas e dos pães

As amostras da massa crua foram analisadas o pH, a acidez titulável (ATT) e a contagem em placas. Nas amostras de pão foram

analisados o pH, a acidez titulável e o volume. Estas análises foram realizadas a cada 2 h, entre 4 e 10 h de fermentação.

O pH e a acidez foram verificados utilizando 0,1N NaOH (IAL, 2004). A ATT foi expressa em mL 0,1N NaOH/ 100g. A avaliação do crescimento foi determinada pela contagem em placas do logaritmo do número de células viáveis (log UFC/ g) usando o método *pour plate*. Asépticamente, 25 g de cada massa foi misturada com 225 mL de água peptonada estéril (0,1 g 100 g⁻¹) em *stomacher* (modelo P, Interscience, St. Nom, França). Foram realizadas as diluições necessárias de BAL e leveduras, sendo aquelas cultivadas em MRS ágar a 30 °C/ 48 h e estas em PDA ágar com ácido tartárico 10 % a 25 °C/ 72 h. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.4 Processamento dos pães

Os fermentos foram aplicados nos pães, cuja formulação foi composta de 100 % de farinha de trigo, 20 % de fermento natural (PARAMITHIOTIS et al., 2005; KATINA et al., 2006a; ROBERT et al., 2006; PLESSAS et al., 2011), 60 % de água e 1,8 % de sal. Após a mistura de todos os ingredientes, foram pesados 24 g de cada massa. Em seguida foram colocadas para fermentar em uma climatizadora (modelo CFC P-20, Perfecta, Curitiba, Brasil) a 30 °C por 4, 6, 8 e 10 h (80 % umidade relativa) e assadas em forno (modelo ventile E-6, Líder, Araucária, Brasil) a 180 °C por 18 min.

5.2.5 Volume específico

O volume dos pães foi medido usando a metodologia de deslocamento de sementes descrito por Hallén, İbanoğlu e Ainsworth (2004). O volume do pão foi medido em um recipiente com volume conhecido (V_C). O recipiente foi coberto com sementes, o pão foi removido e o volume de sementes anotado (V_R). O volume do pão (V_L) foi calculado seguindo a Equação (1).

$$V_L \text{ (mL)} = V_C - V_R \quad \dots\dots\dots (1)$$

Após esfriar 1 h, os mesmos pães foram medidos e pesados em escala digital (g). O volume específico (V_S) do pão foi calculado seguindo a Equação (2).

$$V_S \text{ (mL/ g)} = V_L / P \quad \dots\dots\dots (2)$$

5.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica[®] versão 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). O comportamento da massa crua e do pão preparado com fermento natural com LP1, LP2, SC1 e SC2 entre 4 e 10 h de fermentação foi estudado aplicando o modelo de regressão linear simples, dado por $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$, onde X é o tempo de fermentação, em horas. As diferenças entre as médias foram calculadas através da análise de variância (ANOVA) *one-way* utilizando o teste de *Tukey*. Foram consideradas significativas as diferenças ao nível de 5 % ($P < 0,05$).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação da massa e do pão

As equações estimadas da análise de regressão linear para o pH, a ATT e a contagem em placas para a massa entre 4 e 10 h de fermentação estão ilustradas na Figura 1 (A, B e C). O pH, a ATT e o volume do pão entre 4 e 10 h de fermentação estão ilustrados na Figura 2 (A, B e C).

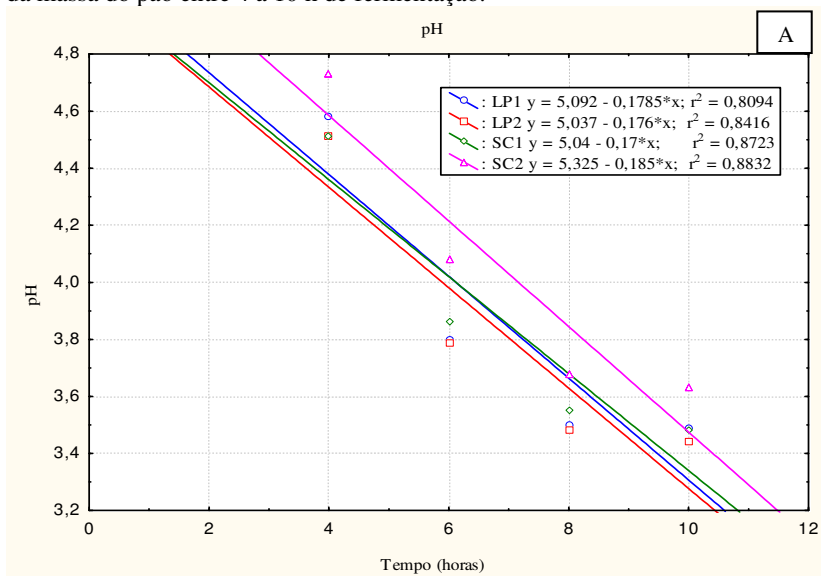
Os valores do pH da massa e do pão foram reduzindo ao longo do tempo de fermentação. O pH inicial das massas e dos pães em 4 h de fermentação variou entre 4,51 e $4,73 \pm 0,01$ e $4,45$ à $4,74 \pm 0,01$, respectivamente. Ao final de 10 h de fermentação os menores valores de pH foram para a massa com LP2 ($3,44 \pm 0,04$) e o pão com SC1 ($2,99 \pm 0,05$). As análises de regressão linear indicaram que as taxas de decréscimo do pH da massa (Figura 1A) e do pão (Figura 2A) foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Portanto, não rejeitamos H_0 pelo teste F ao nível de significância de 5 %, onde H_0 indica que os coeficientes angulares são iguais. Na análise do pH da massa foi observado um coeficiente de determinação maior para as leveduras (SC2: 0,8832; SC1: 0,8723; LP2: 0,8416; LP1: 0,8094), enquanto que no pH dos pães as BAL tiveram um maior r^2 (LP2: 0,9512; LP1: 0,9162; SC1: 0,9061; SC2: 0,8831). Entre os efeitos mais importantes, o valor do pH exerceu influência na produção de ácidos orgânicos e nas propriedades viscoelásticas da massa (WEHRLE; ARENDT, 1998).

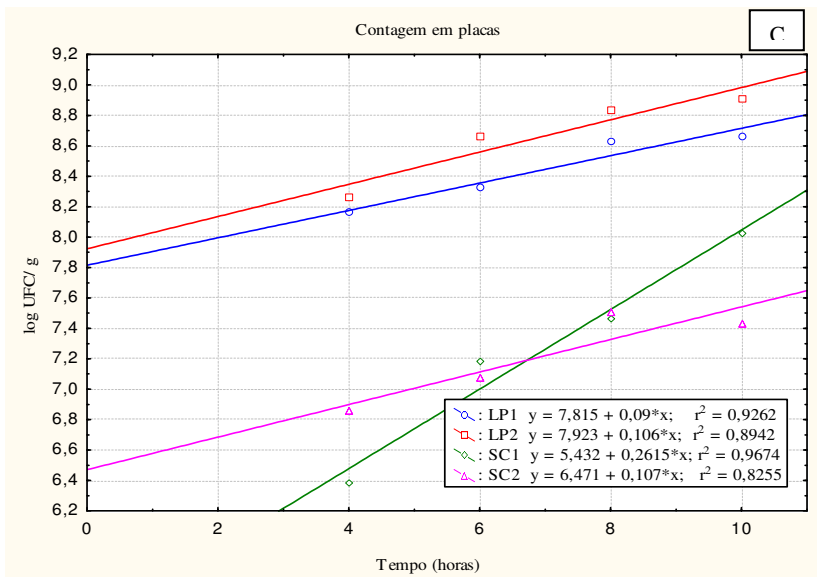
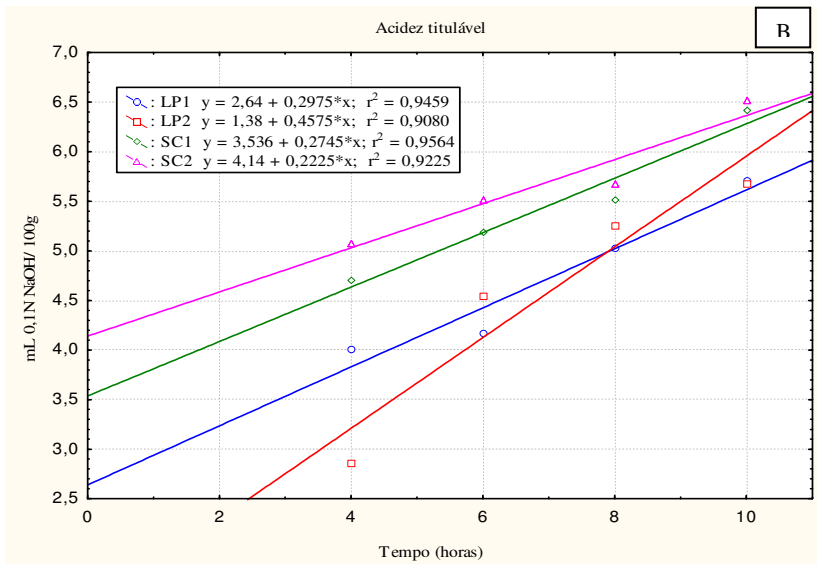
Os valores de acidez titulável aumentaram ao longo do tempo. A massa e o pão preparado com leveduras apresentaram os maiores teores de acidez. SC2 apresentou a maior produção de acidez da massa

em todas as horas ($5,08 \pm 0,41$; $5,52 \pm 0,16$; $5,68 \pm 0,10$; $6,51 \pm 1,32$), seguida de SC1 ($4,70 \pm 0,13$; $5,19 \pm 0,49$; $5,52 \pm 0,01$; $6,42 \pm 0,13$). As análises de regressão linear do aumento da acidez titulável das massas (Figure 1B), através do teste F para contraste dos coeficientes, indicaram diferenças significativas entre os coeficientes angulares e lineares de LP2/ SC2 e o coeficiente linear de LP2/ SC1 ($P < 0,05$). SC1 apresentou o coeficiente de determinação maior na acidez titulável, seguido por LP1; SC2 e LP2 ($r^2 = 0,9564$; $0,9459$; $0,9225$; $0,9080$). Para a análise da acidez titulável dos pães (Figura 2B) houve diferença significativa entre os coeficientes angular e linear de LP1/ SC1 e SC1/ SC2, coeficiente angular de LP2/ SC2 e o coeficiente linear de LP2/ SC1 ($P < 0,05$). O maior coeficiente de determinação foi de LP1, seguido por LP2; SC2 e SC1 ($r^2 = 0,9801$; $0,9196$; $0,9138$; $0,8296$).

O processo de acidificação, afetado pela aplicação do fermento natural, é utilizado principalmente para a melhoria da qualidade e *flavour* dos pães de trigo (BRÜMMER; LORENZ, 1991; KATINA et al., 2006a; ARENDT et al., 2007), além de reduzir o envelhecimento dos pães (KATINA et al., 2006b; PLESSAS et al., 2007).

Figura 1 - Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e contagem em placas (C) da massa do pão entre 4 a 10 h de fermentação.





LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

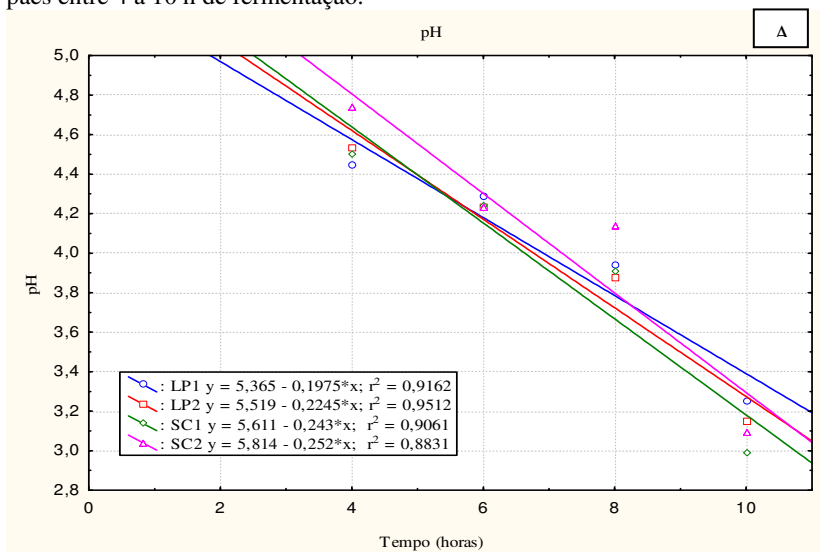
As BAL apresentaram as maiores contagens ao longo do período analisado. Com exceção da SC2, os maiores crescimentos

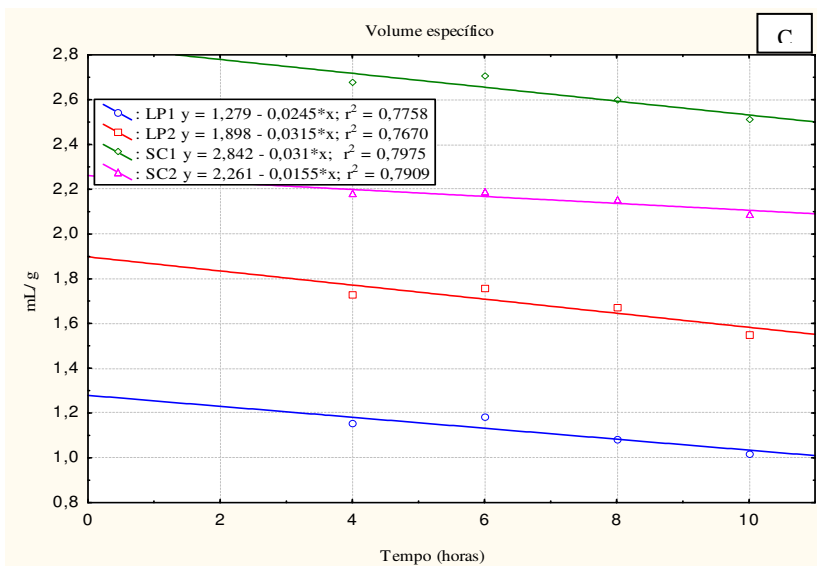
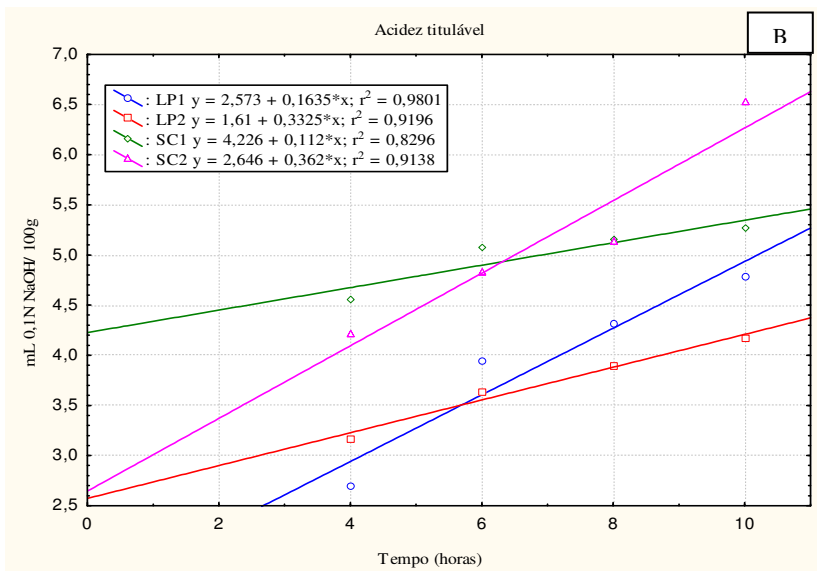
microbianos foram com 10 h de fermentação, sendo o maior valor para LP2 com 8,91 log UFC/ g, seguido de LP1 com 8,66 log UFC/ g e SC1 com 8,03 log UFC/ g. Nessa mesma hora, SC2 apresentou uma queda de 0,21 log UFC/ g. Com 6 h de fermentação, LP2 obteve 8,66 log UFC/ g e LP1 8,33 log UFC/ g. As leveduras apresentaram 7,18 log UFC/ g para SC1 e 7,08 log UFC/ g para SC2.

Edema e Sanni (2008) estudaram as contagens de colônias de BAL e leveduras durante a fermentação espontânea de farinha de milho. As contagens de BAL aumentaram de 4,62 log UFC/ g no tempo inicial (0 h) para 6,45 log UFC/ g após 48 horas de fermentação, enquanto a contagens de leveduras aumentaram de 4,18 para 6,64 log UFC/ g no mesmo período.

Para contagem em placas (Figura 1C), a análise de regressão indicou que os coeficientes angulares e lineares de LP1/ LP2 foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$), assim como os coeficientes lineares de LP1/ SC2 e LP2/ SC2. Todos os outros contrastes obtiveram diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$). O maior coeficiente de determinação (r^2) na contagem em placas foi de SC1, com 0,9674, significando que o ajuste da regressão explica 96,74 % da variação total de Y, com apenas 3,26 % para a variação residual (erro), o que é considerado um bom ajuste.

Figura 2 - Evolução do pH (A), acidez titulável (B) e volume específico (C) dos pães entre 4 a 10 h de fermentação.





LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

A análise de regressão do volume específico (Figura 2C) indicou que todos os coeficientes lineares são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Os maiores coeficientes de determinação (r^2) foram para as leveduras SC1 e SC2 (0,7975; 0,7909).

Os *Lactobacillus* podem ser divididos em três grupos, tendo como critério o produto final de sua fermentação: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses e ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*); *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, CO_2 , álcool e H_2O_2 (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*); e *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO_2 e pentoses a ácido láctico e ácido acético (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) (FOX et al., 2000).

LP1 apresentou menor volume em todas as horas ($P < 0,05$). Os maiores volumes encontrados nos pães foram com 6 h de fermentação (Tabela 1). SC1 apresentou melhores resultados em todos os tempos, seguido de SC2. SC1 obteve, com 6 h de fermentação, o maior resultado, com 2,71 mL/g ($P < 0,05$). *Saccharomyces cerevisiae* é usada no preparo de pães devido a sua capacidade de formar uma massa com estrutura e de reter gás. A partir de 6 h de fermentação pode ser observada uma influência inversamente proporcional entre o aumento da acidez titulável e a queda do volume ao longo do tempo.

Tabela 1 – Volume específico de pães com aproximadamente 24 g de massa crua (mL/g).

Amostras	4h	6h	8h	10h
LP1	1,15 ± 0,03 ^a	1,18 ± 0,04 ^a	1,08 ± 0,04 ^a	1,02 ± 0,03 ^a
LP2	1,73 ± 0,15 ^b	1,76 ± 0,10 ^{a,b}	1,67 ± 0,07 ^b	1,55 ± 0,08 ^b
SC1	2,68 ± 0,08 ^d	2,71 ± 0,22 ^c	2,60 ± 0,10 ^d	2,51 ± 0,17 ^d
SC2	2,18 ± 0,03 ^c	2,19 ± 0,37 ^{b,c}	2,15 ± 0,09 ^c	2,09 ± 0,07 ^c

Resultados como média de triplicatas ± desvio padrão.

^{a-d} Diferença de letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença entre as amostras (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;

SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

Sanz-Penella et al. (2012) aplicaram *Bifidobacteria pseudocatenulatum* como cultura *starter* no fermento natural, e relataram que com a utilização de 20 % deste fermento no pão obtiveram o valor de ATT de $9,23 \pm 0,32$ mL NaOH 0,1N/ 100g e pH de $4,57 \pm 0,11$. Prepararam outro pão adicionado esta BAL e levedura comercial, e a ATT passou $10,60 \pm 0,41$ mL NaOH 0,1N/ 100g e o pH para $4,96 \pm 0,06$. As amostras com 20 % de fermento natural apresentaram volume específico de $2,22 \pm 0,12$ mL/ g. Crowley et al. (2002) relataram que o volume específico do pão aumentou significativamente na formulação contendo 20 % de fermento natural ($3,40 \pm 0,08$ mL/ g).

Collar et al. (1994) desenvolveram pães usando alta porcentagem de fermento com *L. plantarum* e *L. brevis*. A acidificação do fermento e a parcial acidificação da massa do pão impactou na estrutura dos componentes, como o glúten e o amido. Durante a incubação do fermento natural e da massa do pão ocorreram mudanças bioquímicas nos carboidratos e nas proteínas da farinha devido à ação de enzimas endógenas e microbianas (ROLLAN et al., 2005). Arendt et al. (2007) afirmaram que existe um considerável consenso entre várias pesquisas sobre os efeitos positivos da adição do fermento natural sobre a estrutura do miolo e do volume do pão.

5.4 CONCLUSÃO

Os valores do pH da massa e do pão foram reduzindo ao longo do tempo de fermentação. *Saccharomyces cerevisiae* 2 apresentou a maior produção de acidez da massa em todas as horas estudadas. As BAL apresentaram as maiores contagens microbiológicas na massa crua entre 4 e 10 h. *Lactobacillus paracasei* 1 apresentou o menor volume específico em todas as horas ($P < 0,05$). O melhor tempo de fermentação dos pães considerado nesta pesquisa foi de 6 h, por apresentar os maiores volumes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARENDRT, E.K.; LIAM, A.M.R.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, p. 165-174, 2007.

BLOKSMA, A.H. Rheology of the breadmaking process. **Cereal Foods World**, v. 35, p. 228–236, 1990.

BRÜMMER, J. M.; LORENZ, K. European developments in wheat sourdoughs. **Cereal Foods World**, v. 36, p. 310-314, 1991.

CLARKE, C.I.; SCHOBBER, T.J.; ARENDRT, E.K. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. **Cereal Chemistry**, v.79, p. 640-647, 2002.

COLLAR, C.; BENEDITO DE BARBER, C.; MARTINEZ-ANAYA, M. A. Microbial sourdoughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. **Journal of Food Science**, 59, p. 629-633, 1994.

CROWLEY, P.; SCHOBBER, T. J.; CLARKE, C. I.; ARENDRT, E. K. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. **Europe Food Research Technology**, v. 214, p. 489-496, 2002.

DE VUYST, L.; GÄNZLE, M. Second international symposium on sourdough: from fundamentals to applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 2-3, 2005.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.24, p. 120–127, 2007.

EDEMA, M.O., SANNI, A.I. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. **Food Microbiology**, v.25, p. 616–625, 2008.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p.587.

GOCMEN, D.; GURBUZ, O.; KUMRAL, A.Y.; DAGDELEN, A.F.; SAHIN, I. The effects of wheat sourdough on glutenin patterns, dough rheology and bread properties. **Europe Food Research Technology**, v. 225, p. 821–830, 2007.

HALLÉN, E.; İBANOĞLU, Ş.; AINSWORTH, P. Effect of fermented/germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p.177–184, 2004.

IAL. **Instituto Adolfo Lutz**. Physico-chemical methods for food analysis, 4 ed, São Paulo, Brasil. 2004.

KATINA, K.; HEINIÖ, R.L.; AUTIO, K.; POUTANEN, K. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 1189-1202, 2006a.

KATINA, K.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; PARTANEN, R.; FORSELL, P.; AUTIO, K. Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.39, p. 479-491, 2006b.

LOPEZ, H.W.; DUCLOS, V.; COUDRAY, C.; KRESPINE, V.; FEILLET-COUDRAY, C.; MESSEGER, A.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. **Nutrition**, v.19, p. 524-530, 2003.

PARAMITHIOTIS, S.; CHOULIARAS, Y.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS. G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2813–2819, 2005.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; BEKATOROU, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.A.; BEZIRTZOGLU, E. Examination of freshness degradation of sourdough bread made with

kefir through monitoring the aroma volatile composition during storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 627–633, 2011.

PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Use of immobilized cell biocatalysts in baking. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1244–1249, 2007.

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; POONAM, N.; ATHANASIOS, A.K. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, p. 985–990, 2008.

ROBERT, H.; GABRIEL, V.; LEFEBVRE, D.; RABIER, P.; VAYSSIER, Y.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT – Food Science and Technology*, v.39, p.256–265, 2006.

ROLLAN, G.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M.; DE VALDEZ, G. F. Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1495–1502, 2005.

SANZ-PENELLA, J.M.; TAMAYO-RAMOS, J. A.; HAROS, M. Application of bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. **Food Bioprocess Technology**, v.5, p. 2370–2380, 2012.

THIELE, C.; GANZLE, M.G.; VOGEL, R.F. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. **Cereal Chemistry**, v. 79, p.45–51, 2002.

WEHRLE, K.; ARENDT, E.K. Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. **Cereal Chemistry**, v.75, p. 882-886, 1998.

CAPÍTULO 6

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS LIOFILIZADAS NAS PROPRIEDADES DO PÃO COM FERMENTO NATURAL

RESUMO

No processamento do pão com fermento natural foi analisada a adição de cepas de *Lactobacillus paracasei* (LP1 e LP2) e de *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 e SC2) como cultura *starter*. Foram avaliadas as propriedades físico-químicas, microbiológicas, de volume, textura, cor, microestrutura e sensorial. Pães produzidos com fermento natural adicionado de LP1/ SC2 tiveram menor pH e a maior acidez foi para SC1 ($P < 0,05$). O volume específico foi negativamente afetado pela adição de LP1 na formulação. O maior volume específico obtido foi para os pães com SC1. Pães com LP2 ou tratamentos combinados (LP2/ SC1 e LP2/ SC2) tiveram melhor maciez do miolo que amostras com LP1 ou suas combinações (LP1/ SC1 e LP1/ SC2). Entretanto, o pão com LP1 foi significativamente mais firme e apresentou crosta mais clara que as outras amostras. A massa com SC1 apresentou uma rede de glúten firme, com superfície uniforme. As melhores notas da análise sensorial foram encontradas em pães contendo LP2/ SC1 na formulação ($P < 0,05$).

Palavras-chave: pão, fermento natural, firmeza, produção de gás, glúten.

EFFECT OF THE INCORPORATION OF DIFFERENT FREEZE-DRIED CULTURES ON THE PROPERTIES OF SOURDOUGH BREAD

ABSTRACT

The application of strains of *Lactobacillus paracasei* (LP1 and LP2) and *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 and SC2) as starter cultures for sourdough breadmaking was analyzed. The physicochemical, microbiological, specific volume, texture, color, microstructural and sensorial properties of sourdough bread were evaluated. The breads that were produced using the LP1/ SC2 sourdough process had low pH levels and the highest acidity was for SC1 ($P < 0,05$). The specific

volume was negatively affected by the addition of LP1 in the formulation. The highest specific volume obtained was for breads made with SC1. Breads made with LP2 or with a combination treatment (LP2/ SC1 and LP2/ SC2) had improved crumb softness relative to samples with LP1 or with a combination treatment (LP1/ SC1 and LP1/ SC2). However, LP1 sourdough bread was significantly harder and had a lighter-colored crust than other samples. The dough with SC1 presented a firm gluten matrix and a uniform surface. The best scores for sensory analysis were found in breads containing LP2/ SC1 in formulation ($P < 0.05$).

Key words: bread, sourdough, firmness, gas production, gluten.

6.1 INTRODUÇÃO

Produtos de panificação e suas técnicas de produção diferem amplamente em todo o mundo (CHAVAN; CHAVAN, 2011). O fermento natural é uma mistura de farinha e água, fermentado por bactérias lácticas (BAL) e leveduras (HANSEN, 2006), aplicado no processamento de panificáveis de qualidade (VERA et al., 2012).

O alto valor nutricional do fermento natural e a preferência pelo consumo pode ser atribuída às características sensoriais e ao aumento da vida de prateleira quando comparado ao pão com levedura comercial (KATINA et al., 2002; MESSENS; DE VUYST, 2002). A adição de fermento natural durante a produção de pães de trigo provoca mudanças nas características da massa (CLARKE; SCHOBBER; ARENDT, 2002; CLARKE et al., 2004; KETABI et al., 2008). O fator positivo da utilização do fermento natural é atribuído à microbiota, que forma um ecossistema único, consistente em BAL e leveduras (PARAMITHIOTIS; TSIASIOTOU; DROSINOS, 2010).

A qualidade do produto panificável depende do teor de proteína, do volume, da qualidade do miolo e da textura do pão (UPADHYAY; GHOSAL; MEHRA, 2012). Os principais componentes da farinha, como o glúten e o amido, exercem forte influência nas propriedades do produto final, mas a presença de gás nas células também é essencial (WILDE, 2003). A adição de fermento natural pode modificar a maquinabilidade e a funcionalidade da massa (ROBERT et al., 2006). Assim, várias culturas *starters* têm sido aplicadas no preparo do pão com fermento natural visando o aumento da vida de prateleira e a melhoria das características sensoriais (PLESSAS et al., 2011).

Culturas *starters* específicas de fermento natural, fermento natural ativo ou micro-organismos liofilizados são usadas para iniciar a fermentação com a microflora necessária (BRANDT, 2007). Os níveis de BAL são maiores que 8 log UFC/ g e a proporção é geralmente na razão de 100:1 de BAL para leveduras (HANSEN, 2006). Nos pães com este fermento, BAL produzem menores concentrações de compostos voláteis que as leveduras e são, principalmente, responsáveis pela acidificação da massa. As leveduras são responsáveis pela produção de compostos do *flavour* (MEIGNEN et al., 2001). Além disso, BAL contribuem no aspecto sabor, textura e vida de prateleira, além da sua capacidade antifúngica devido à formação de bacteriocinas (PLESSAS et al., 2007). As propriedades metabólicas das BAL são específicas de cada cepa, por isso a seleção da cultura *starter* é fundamental para o processamento do pão com fermento natural (CHOI et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação de cepas de *Lactobacillus paracasei* (LP1 e LP2) e de *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 e SC2) e nas propriedades físico-químicas, microbiológicas, de volume, textura, cor, microestrutura e sensorial em pães.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Micro-organismos

A BAL heterofermentativa facultativa *Lactobacillus paracasei* (LP1 - 9,4 log UFC/ g e LP2 - 11,11 log UFC / g) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SC1 - 8,18 log UFC/ g e SC2 - 7,16 log UFC/ g), foram isoladas do fermento natural de uva, caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente, liofilizadas e aplicadas neste estudo.

6.2.2 Elaboração do fermento natural

Para a preparação do fermento natural foi utilizado 1% de micro-organismos (p/ p base da farinha) (PLESSAS et al., 2008) fermentado por 48 h. Foram preparadas oito formulações de fermento natural com micro-organismos individuais (LP1, LP2, SC1 e SC2) e culturas mistas na proporção de 1:1 de bactéria láctica e levedura (LP1/ SC1, LP1/ SC2, LP2/ SC1 e LP2/ SC2).

A massa 1 (D1) foi preparada misturando-se 60 mL de água com 50 g de farinha de trigo, 0,5 g de cultura *starter* e 0,25 g de NaCl, e incubadas a 30 °C. Após 24 h de incubação o fermento natural 1 (FN1) foi obtido. Para formar a massa 2 (M2), foi misturado 100 g de FN1

com 200 g de farinha de trigo e 100 mL de água. Após 24 h de incubação o fermento natural 2 (FN2) foi formado, de acordo com Paramithiotis et al. (2005), com modificações.

6.2.3 Processamento do pão

Os fermentos foram aplicados nos pães, cuja formulação foi composta de 100 % de farinha de trigo, 20 % de fermento natural (PARAMITHIOTIS et al., 2005; KATINA et al., 2006a; ROBERT et al., 2006; PLESSAS et al., 2011), 60 % de água e 1,8 % de sal.

Para a mistura dos ingredientes, foi utilizada uma masseira (modelo ARES 25N, Haas, Curitiba, Brasil) por aproximadamente 12 min. Foram pesadas 450g de massa, e, em seguida, foram acondicionadas em formas com tampa, fermentadas em uma climatizadora (modelo CFC P-20, Perfecta, Curitiba, Brasil) a 30 °C por 6 h (80 % umidade relativa) e assadas em forno (modelo ventile E-6, Líder, Araucária, Brasil) a 180 °C por 40 min.

6.2.4 Propriedades físico-químicas e microbiológicas dos pães

As amostras dos pães foram analisadas quanto à umidade, cinzas e gordura, como descrito pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2004). O teor proteico foi estimado através da determinação do nitrogênio total pelo método Kjeldahl de acordo com AOAC (2005). O valor do pH foi determinado com o pHmetro (modelo Q - 400^a, Quimis, Diadema, Brasil), e a acidez titulável (ATT) foi determinada de acordo com IAL (2004). Nas amostras dos pães também foram analisados coliformes a 45 °C e *Salmonella* sp (APHA, 2001). Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2.5 Volume específico, perda de umidade e umidade do miolo

O volume dos pães foi medido usando a metodologia de deslocamento de sementes descrito por Hallén; İbanoğlu e Ainsworth (2004). O volume do pão foi medido em um recipiente com volume conhecido (V_C). O recipiente foi coberto com sementes, o pão foi removido e o volume de sementes anotado (V_R). O volume do pão (V_L) foi calculado seguindo a Equação (1).

$$V_L \text{ (mL)} = V_C - V_R \quad (1)$$

Após esfriar 1 h, os mesmos pães foram medidos e pesados em escala digital (g). O volume específico (V_s) do pão foi calculado seguindo a Equação (2).

$$V_s \text{ (mL/ g)} = V_L / P \quad (2)$$

A perda de umidade foi medida deduzindo o peso do pão assado do peso inicial da massa antes do assamento (PLESSAS et al., 2007). O teor de umidade do miolo dos pães foi analisado por três dias seguidos, de acordo com IAL (2004). Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2.6 Análise de textura

A firmeza do miolo foi medida 12 h após o assamento dos pães e foi determinada como a força de compressão máxima (40 % compressão) usando um texturômetro modelo TA-XT plus (Stable Micro Systems, Texture Exponent software, Surrey, UK) e um probe cilíndrico com 36 mm de diâmetro. Oito amostras de cada formulação de pão foram medidas e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A medida de cada fatia foi de 2,5 cm, e as bordas das fatias foram cortadas antes das medições (adaptado de KATINA et al., 2006b). O pico máximo de força (g) foi medido através da curva de penetração, resultando na firmeza do miolo.

6.2.7 Análise de cor

A análise da cor foi realizada na crosta e no miolo, utilizando o colorímetro Minolta Chroma Meter (CR - 400, Konica Minolta, Osaka, Japão), ajustado para operar com D65 de luz e 10° de ângulo de observação. A escala de cor CIELab foi usada para medir os parâmetros L^* , a^* e b^* . Na escala de cor CIELab o parâmetro L^* varia de 0 a 100, indicando a variação de cor do preto ao branco; o eixo a^* demonstra a variação do vermelho (+ a^*) ao verde (- a^*); o eixo b^* demonstra a variação do amarelo (+ b^*) ao azul (- b^*). A medida de cor da crosta e do miolo de cada formulação foi repetida oito vezes.

6.2.8 Propriedade de microestrutura

As amostras de pães foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) pelo método adaptado de Kim et al.

(2003). Após o assamento as amostras foram congeladas (- 20 °C) e desidratadas no liofilizador (modelo LT1000, Terroni, São Carlos, Brasil) por 6 h a 90 µHg a vácuo. As amostras liofilizadas dos pães foram quebradas em tamanhos aproximados de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm usando uma faca e recobertas com ouro. O microscópio eletrônico de varredura (JSM – 3690LV, Jeol, Tóquio, Japão) foi usado a 10 kV na magnificação de 1500 x.

6.2.9 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard; Civille e Carr (2007). O teste de aceitabilidade foi aplicado a um grupo de julgadores não treinados (n = 50), utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos (1 - desgostei extremamente; 9 - gostei extremamente). Foi aplicado um questionário para se obter informações sobre os julgadores. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFSC sob o número 876/ 10.

6.2.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica® versão 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). As diferenças entre as médias foram calculadas através da análise de variância one-way (ANOVA) com o teste de *Tukey*. Foram consideradas significativas as diferenças ao nível de 5 % (P < 0,05).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Características físico-químicas e microbiológicas

Os resultados físico-químicos dos pães estão apresentados na Tabela 1. Os teores de umidade dos pães foram próximos dos obtidos por Sanz-Penella; Tamayo-Ramos e Haros (2012).

Todos os pães produzidos por culturas *starters* individuais tiveram valores de pH significativamente iguais. Plessas et al. (2011) reportaram que os pães preparados com cultura mista de *Lactobacillus acidophilus* (10 %) e *Lactobacillus sakei* (10 %) apresentaram pH de 3,9. No entanto, nesta pesquisa, os pães produzidos com fermento com LP1 tiveram menor ATT (P < 0,05). Moore; Dal Bello, Arendt (2008) relataram que o valor da ATT do fermento natural com *Lactobacillus*

plantarum foi maior (5,61) que os fermentos preparados com *Lactobacillus sanfranciscensis* (5,31).

Análises microbiológicas de coliformes a 45 °C e *Salmonella* sp apresentaram resultados de acordo com os padrões exigidos pela legislação.

Tabela 1 - Resultados físico-químicos dos pães com fermento natural.

Amostras	Umidade (% p/p)	Cinzas (% p/p)	Gordura (% p/p)	Proteína (% p/p)	pH	ATT (mL NaOH/ 100g)
LP1	38,95 ± 0,03 ^a	1,22 ± 0,03 ^a	1,02 ± 0,00 ^a	8,07 ± 0,04 ^a	4,29 ± 0,04 ^d	4,32 ± 0,00 ^{ab}
LP2	38,79 ± 1,20 ^a	1,20 ± 0,00 ^a	1,11 ± 0,05 ^a	8,98 ± 0,08 ^a	4,23 ± 0,00 ^d	3,63 ± 0,13 ^a
SC1	36,91 ± 0,08 ^a	1,45 ± 0,01 ^a	1,15 ± 0,05 ^a	7,76 ± 0,37 ^a	4,24 ± 0,01 ^d	5,07 ± 0,04 ^c
SC2	42,82 ± 0,36 ^a	1,35 ± 0,01 ^a	0,89 ± 0,05 ^a	6,95 ± 0,05 ^a	4,23 ± 0,00 ^d	4,83 ± 0,49 ^{bc}
LP1/ SC1	35,77 ± 0,25 ^a	1,59 ± 0,00 ^a	1,19 ± 0,05 ^a	7,52 ± 0,24 ^a	4,11 ± 0,01 ^c	4,76 ± 0,04 ^{bc}
LP1/ SC2	37,16 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,01 ^a	1,07 ± 0,02 ^a	7,49 ± 0,33 ^a	3,91 ± 0,01 ^a	4,63 ± 0,01 ^{bc}
LP2/ SC1	36,35 ± 0,01 ^a	1,64 ± 0,01 ^a	1,13 ± 0,10 ^a	7,57 ± 0,04 ^a	4,14 ± 0,02 ^c	4,96 ± 0,06 ^{bc}
LP2/ SC2	37,56 ± 0,18 ^a	1,65 ± 0,01 ^a	1,10 ± 0,13 ^a	7,36 ± 0,08 ^a	4,03 ± 0,02 ^b	4,63 ± 0,03 ^{bc}

Resultados como média ± desvio padrão. ^{a-c} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey P < 0, 05).

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;

SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.2 Avaliação do volume específico, da perda de umidade e da umidade do miolo

Os resultados das análises de volume e umidade estão apresentados na Tabela 2. Segundo Delcour e Hosney (2010) o volume do pão depende da capacidade da massa em reter o gás por um tempo prolongado durante a fermentação e o cozimento. O volume específico dos pães foi negativamente afetado pela adição de LP1 na formulação. O maior volume específico obtido entre os pães foi com SC1.

A produção de gás na fermentação da massa é um parâmetro essencial na formação da estrutura da massa do pão. Os resultados do volume específico estão de acordo com Plessas et al. (2007), que encontraram valores de 1,9 mL/ g para levedura comercial e 2,1 mL/ g para pão com *kefir*. Sanz-Penella; Tamayo-Ramos e Haros (2012) também obtiveram resultados próximos, utilizando 20 % de fermento natural preparado com *Bifidobacteria pseudocatenulatum*, apresentando um volume específico significativamente menor que o controle, com 2,22 mL/ g.

Tabela 2 - Características dos pães produzidos com fermento natural com LP1, LP2, SC1, SC2 e culturas mistas.

Amostras	Volume específico (mL/ g)	Perda de umidade (g)	Umidade do miolo (g H ₂ O/ g)		
			1º Dia	2º Dia	3º Dia
LP1	1,18 ± 0,04 ^a	4,40 ± 0,17 ^{ab}	0,396 ± 0,00 ^a	0,380 ± 0,00 ^a	0,368 ± 0,00 ^a
LP2	1,62 ± 0,38 ^{abc}	4,19 ± 0,81 ^a	0,433 ± 0,00 ^a	0,422 ± 0,00 ^a	0,397 ± 0,00 ^a
SC1	2,71 ± 0,22 ^d	5,60 ± 0,51 ^{ab}	0,415 ± 0,01 ^a	0,411 ± 0,01 ^a	0,396 ± 0,01 ^a
SC2	2,19 ± 0,37 ^{cd}	5,96 ± 0,74 ^b	0,416 ± 0,01 ^a	0,411 ± 0,00 ^a	0,387 ± 0,01 ^a
LP1/ SC1	1,42 ± 0,13 ^{ab}	5,04 ± 0,32 ^{ab}	0,424 ± 0,01 ^a	0,419 ± 0,00 ^a	0,388 ± 0,00 ^a
LP1/ SC2	1,40 ± 0,20 ^{ab}	5,35 ± 0,23 ^{ab}	0,425 ± 0,00 ^a	0,403 ± 0,01 ^a	0,401 ± 0,01 ^a
LP2/ SC1	2,04 ± 0,12 ^{bc}	4,70 ± 0,06 ^{ab}	0,414 ± 0,00 ^a	0,411 ± 0,00 ^a	0,400 ± 0,00 ^a
LP2/ SC2	1,76 ± 0,10 ^{abc}	4,66 ± 0,88 ^{ab}	0,421 ± 0,00 ^a	0,415 ± 0,01 ^a	0,408 ± 0,02 ^a

Resultados como média ± desvio padrão. ^{a-d} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey P < 0, 05).

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;

SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

Quanto à perda de umidade, as amostras preparadas com LP2 e SC2 retiveram, respectivamente, mais e menos umidade após o assamento. A menor perda de umidade do miolo, com 0,72 %, foi para LP2/ SC1 após 2 dias. Pães fermentados com LP2/ SC2 mantiveram as características de umidade por mais tempo. A umidade do miolo para SC1 reduziu 0,96 % em 2 dias e 4,58 % após 3 dias (Tabela 2). Plessas et al. (2005) reportaram que o pão com levedura comercial obteve redução da umidade do miolo em 15 % após 3 dias e 35 % após 5 dias. O envelhecimento do pão após 3 dias foi observado para LP1/ SC1 e LP2.

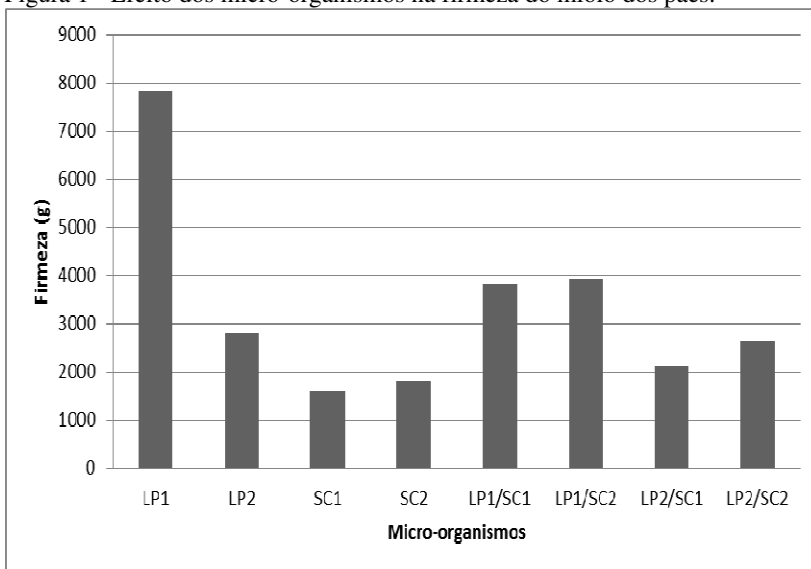
6.3.3 Firmeza do miolo

A firmeza do miolo dos pães está ilustrada na Figura 1. Pães com LP2 ou tratamentos combinados (LP2/ SC1 e LP2/ SC2) tiveram miolos mais macios que com LP1 e tratamentos combinados (LP1/ SC1 e LP1/ SC2). No entanto, o pão com LP1 foi significativamente mais duro que as outras amostras. Wehrle; Grau e Arendt (1997) sugerem que a mudança no valor do pH causada pela produção de ácido lático também influenciam as propriedades da massa.

Os miolos dos pães somente com leveduras (SC1 e SC2) foram significativamente mais macios que os pães com somente BAL (LP1 e LP2) na composição. O miolo do pão da amostra com SC1 tiveram os melhores resultados de maciez ($P < 0,05$).

Rizzello et al. (2010) elaboraram fermento natural com gérmen de trigo e observaram que o pico da força requerida para o pão foi de 2381 g. Carr e Tadini (2003) obtiveram valores de firmeza de 5602 g para o pão francês. Coda; Rizzello e Gobbetti (2010) prepararam fermento com *Lactobacillus plantarum* e leveduras usando 50 % de fermento na sua formulação e observaram maior firmeza (5189 g), valores próximos de volume específico (1,83 mL/ g) e menor brilho (46,66) que neste estudo. Moore; Dal Bello e Arendt (2008) estudaram fermento preparado com *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sanfranciscensis* em pães sem glúten e relataram que após o assamento, a firmeza do miolo foi estatisticamente igual.

Figura 1 - Efeito dos micro-organismos na firmeza do miolo dos pães.



LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.4 Análise de cor

Esteller et al. (2006) afirmam que a cor é uma importante característica de produtos de panificação, pois junto com a textura e com o aroma, contribui para a preferência do consumidor. As análises de cor da crosta e do miolo estão apresentadas na Tabela 3. A cor da crosta do pão com LP1/ SC2 foi significativamente mais escura que as demais amostras. Pães com LP1 apresentaram maior brilho da crosta, com tendência levemente para o verde e amarelo. Consumidores de pães têm preferência por produtos com miolo mais claro, que pode ser obtido utilizando LP2, que também apresenta uma coloração ao verde.

A cor do miolo de SC1, LP1/ SC1, LP1/ SC2 e LP2/ SC1 apresentaram, significativamente, o mesmo brilho. A diferença de cor encontrada na casca e no miolo está relacionada a fermentação dos diferentes micro-organismos utilizados na preparação do fermento.

Komlenić et al. (2010) relataram que a adição de fermento natural seco reduziu significativamente o brilho e aumentou a tendência ao amarelo e vermelho do miolo, quando comparado ao fermento com *Lactobacillus brevis*.

Tabela 3 - Resultados de determinação da cor (L*, b*, a*) na crosta e no miolo dos pães com diferentes micro-organismos.

Micro-organismos	Crosta			Miolo		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
LP1	61,89 ± 1,55 ^c	7,20 ± 1,19 ^a	33,92 ± 1,96 ^d	65,62 ± 1,34 ^{ab}	0,71 ± 0,04 ^f	13,98 ± 0,24 ^d
LP2	54,69 ± 1,31 ^c	12,24 ± 0,61 ^{cd}	30,84 ± 1,02 ^{abc}	70,66 ± 1,19 ^d	0,43 ± 0,06 ^c	13,07 ± 0,57 ^{bc}
SC1	57,29 ± 1,77 ^d	11,26 ± 0,62 ^c	32,08 ± 1,15 ^{cd}	67,59 ± 1,18 ^c	-0,31 ± 0,11 ^a	14,24 ± 0,60 ^d
SC2	59,18 ± 1,05 ^d	9,33 ± 0,75 ^b	29,29 ± 0,92 ^a	64,53 ± 0,92 ^a	-0,05 ± 0,07 ^b	11,71 ± 0,61 ^a
LP1/ SC1	52,69 ± 1,59 ^{abc}	13,63 ± 0,66 ^e	31,64 ± 0,66 ^{bc}	68,64 ± 1,21 ^c	0,12 ± 0,11 ^c	15,22 ± 0,25 ^e
LP1/ SC2	50,82 ± 1,86 ^a	13,56 ± 1,36 ^{de}	31,54 ± 1,32 ^{bc}	68,05 ± 1,04 ^c	0,30 ± 0,10 ^{de}	13,71 ± 0,26 ^{cd}
LP2/ SC1	54,02 ± 1,79 ^{bc}	11,51 ± 0,66 ^c	29,47 ± 1,31 ^a	68,59 ± 1,28 ^c	0,11 ± 0,10 ^c	13,72 ± 0,29 ^{cd}
LP2/ SC2	51,87 ± 1,83 ^{ab}	12,05 ± 0,69 ^c	29,82 ± 0,98 ^{ab}	67,20 ± 1,27 ^{bc}	0,21 ± 0,07 ^{cd}	12,90 ± 0,26 ^b

Resultados como média ± desvio padrão. ^{a-f} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0, 05).

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;

SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.5 Microestrutura da massa dos pães

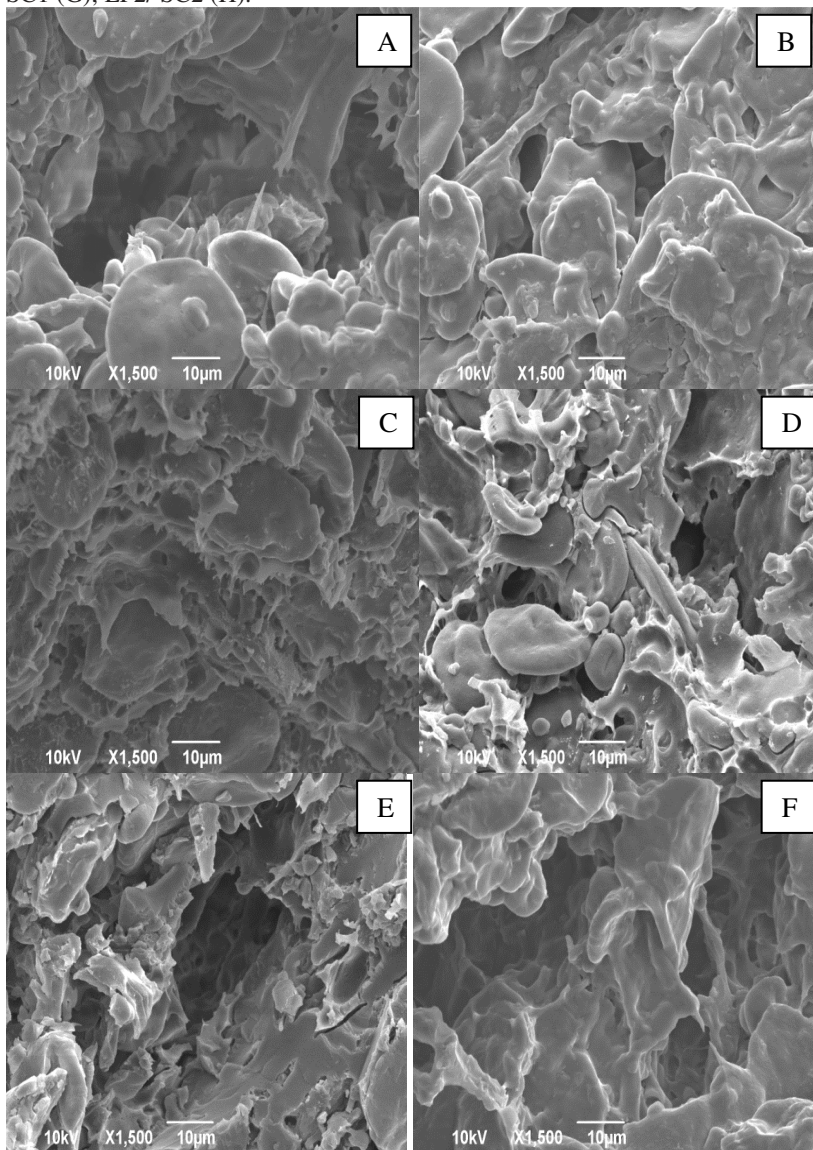
A microestrutura das amostras dos pães com diferentes micro-organismos está ilustrada nas Figuras 2 (A-H). De acordo com Kim et al. (2003), durante a fermentação os amidos incham e a massa retém gás nas células. As membranas entre as células de gás precisam ser capazes de sustentar grandes extensões sem ruptura. Assim, a ruptura das membranas exteriores causa perda de gás, reduzindo o volume do pão, como pode ser observado na Figura 2 A.

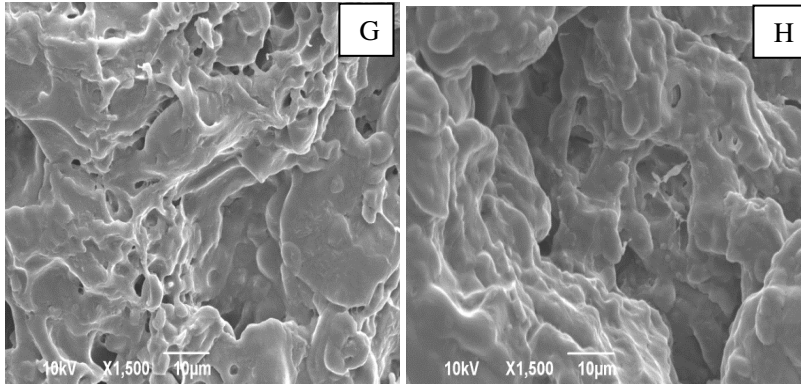
A Fig. 2 (B) mostra menos erupção de bolhas de gás e muitos grânulos de amido inchados aparecem na superfície, enquanto na Fig. 2 (C) a massa com SC1 apresenta um rede de glúten normal, com uma superfície uniforme. Os grânulos de amido estão distribuídos na matriz protéica. Além disso, a massa com SC2 (Fig. 2D) e LP2/ SC1 (Fig. 2G) tem um rede de glúten descontínua quando comparada à massa com SC.

Sroan; Bean e Macritchie (2009) afirmaram que durante o crescimento da massa a rede de glúten-amido em torno das células de gás expande, devido ao excesso de pressão produzido naquelas células, por difusão de dióxido de carbono, tendo em vista a expansão térmica dos gases durante o cozimento. Nas Figuras 2 (E) e (F) a superfície é coberta com numerosas erupções de bolhas de gás e por uma rede de glúten menos coesa. A Figura 2 (H) ilustra os grânulos de amido dispersos no interior da proteína.

Upadhyay, Ghosal e Mehra (2012) compararam o tamanho das bolhas de gás e a sua distribuição usando diferentes concentrações de leveduras (2, 5 e 10 %), e relataram que o aumento na concentração da levedura tornam as bolhas menores.

Figura 2 - Micrografia (magnificação = x 1500) dos miolos dos pães produzidos com: LP1 (A); LP2 (B); SC1 (C); SC2 (D); LP1/ SC1 (E); LP1/ SC2 (F); LP2/ SC1 (G); LP2/ SC2 (H).





LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;
 SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.6 Análise sensorial

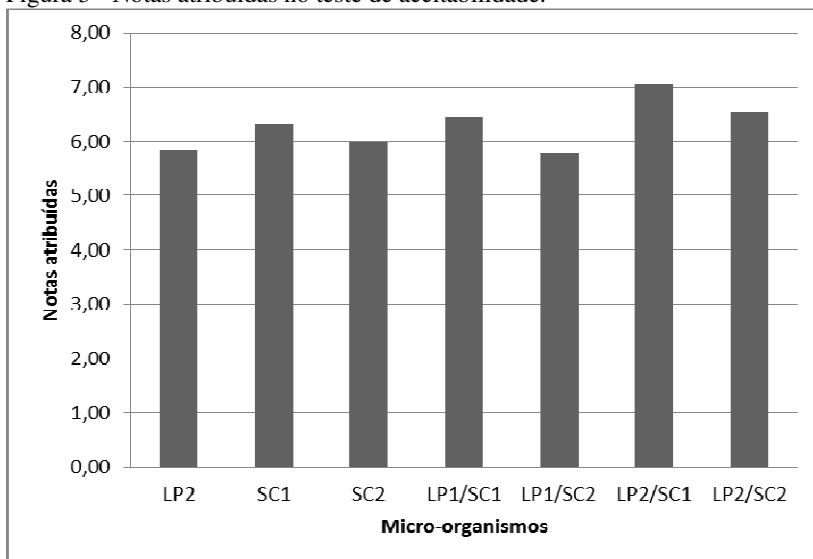
No teste sensorial, 76 % dos julgadores foram mulheres. A totalidade dos julgadores foi classificada como grandes consumidores de pão, pois 32 % relataram consumir três ou mais vezes ao dia, 42 % duas vezes e 18 % uma vez ao dia.

Os pães com LP1 não foram submetidos à análise sensorial por apresentarem baixo volume específico, massa muito firme e cor da casca com mais brilho ($P < 0,05$). *Lactobacillus paracasei* é uma bactéria láctica classificada como heterofermentativa facultativa (FOX et al., 2000) e não produziu quantidade suficiente de gás.

A partir dos valores das médias dos pães obtidas pelo teste de aceitação, foi verificada a ausência de diferença significativa entre as amostras com SC1, SC2, LP1/ SC1 e LP2/ SC2. As melhores notas sensoriais foram para os pães produzidos somente com LP2/ SC1 na formulação ($P < 0,05$). Os resultados do teste de aceitabilidade foram analisados com o teste de Tukey e estão ilustrados na Figura 3.

Os resultados obtidos por Plessas et al. (2008) mostraram que culturas starters mistas de *Kluyveromyces marxianus* e *Lactobacillus bulgaricus* ou *Lactobacillus helveticus* podem ser usadas na produção de pães, pois tiveram a melhor avaliação sensorial. Robert et al. (2006) observaram que a utilização de cepas de *Leuconostoc* sp ou *Lactobacillus plantarum* na produção de pães tiveram resultados satisfatórios de aceitação.

Figura 3 - Notas atribuídas no teste de aceitabilidade.



Escala hedônica: 1 - desgostei extremamente; 9 - gostei extremamente.

LP1: *Lactobacillus paracasei* 1; LP2: *Lactobacillus paracasei* 2;

SC 1: *Saccharomyces cerevisiae* 1; SC 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

As notas atribuídas pelos julgadores no teste de aceitabilidade variaram entre “indiferente e gostei regularmente”. Os resultados podem estar relacionados à elevada acidez dos pães aliada à falta de hábito dos julgadores em consumir produtos com essa característica.

6.4 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostram que as culturas *starters*, utilizadas de forma individual ou mista, foram capazes de produzir pães com características diferentes.

A aplicação individual de *Lactobacillus paracasei* 1 não apresentou êxito nos resultados, porém quando utilizada em conjunto com *Saccharomyces cerevisiae* 1 teve uma boa aceitação sensorial. O melhor resultado sensorial foi para a cultura mista de *Lactobacillus paracasei* 2 e *Saccharomyces cerevisiae* 1.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada no preparo de pães, pois atua como agente levedante fornecendo volume à massa. Os melhores resultados da análise de volume específico, textura do miolo e de formação da rede do glúten foram para

Saccharomyces cerevisiae 1. Essa pesquisa, mais uma vez, comprovou as vantagens da utilização desta levedura no processamento de pães.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao LCME-UFSC pelo uso do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

REFERÊNCIAS

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of AOAC Internacional, 18th ed, Maryland, USA. 2005.

APHA. **American Public Health Association**. Compendium of methods of the microbiological examination of foods, 4th ed, Washington D.C. 2001.

BRANDT, M. J. Sourdough products for convenient use in baking. **Food Microbiology**, v. 24, p. 161-164, 2007.

CARR, L.G.; TADINI, C.C. Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, p. 609–614, 2003.

CHAVAN, R.S; CHAVAN, S.R. Sourdough Technology - A traditional way for whole some foods: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.169-182, 2011.

CHOI, H.; KIM, Y.W.; HWANG, I.; KIM, J.; YOON, S. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2208-2216, 2012.

CLARKE, C.I.; SCHOBER, T.J.; ARENDT, E.K. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 640-647, 2002.

CLARKE, C. I.; SCHOBER, T. J.; DOCKERY, P.; O'SULLIVAN, K.; ARENDT, E. K. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 409-417, 2004.

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 236-245, 2010.

DELICOUR, J.A.; HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**. 3 ed., AACC International, St Paul, MN, USA, 2010. 261p.

ESTELLER, M. S.; ZANCANARO JUNIOR, O.; PALMEIRA, C. N. S.; LANNES, S. C. da S. The effect of kefir addition on microstructure parameters and physical properties of porous white Bread. **Europe Food Research and Technology**, v. 222, p. 26-31, 2006.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000, 559 p.

HALLÉN, E.; İBANOĞLU, Ş.; AINSWORTH, P. Effect of fermented/germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 177-184, 2004.

HANSEN, A. **Sourdough bread**. In: HUI, Y. H.; SHERKA, F. Handbook of food science, technology and engineering. 4 ed., Taylor and Francis Group, LLC, 2006, 928p.

IAL. **Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 th ed, São Paulo, Brasil. 2004.

KATINA, K.; HEINIO, R.L.; AUTIO, K.; POUTANEN, K. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 1189-1202, 2006a.

KATINA, K.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; PARTANEN, R.; FORSSELL, P.; AUTIO, K. Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 479-491, 2006b.

KATINA, K.; SAURI, M.; ALAKOMI, H.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 35, p. 38–45, 2002.

KETABI, A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; KADIVAR, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. **Food Research International**, v. 41, p. 948-951, 2008.

KIM, H. J.; MORITA, N.; LEE, S. H.; MOON, K. D. Scanning electron microscopic observations of dough and bread supplemented with *Gastrodia elata* Blume powder. **Food Research International**, v. 36, p. 387–397, 2003.

KOMLENIĆ, D.K.; UGARČIĆ-HARDI, Ž.; JUKIĆ, M.; PLANINIĆ, M.; BUCIĆ-KOJIĆ, A.; STRELEC, I. Wheat dough rheology and bread quality effected by *Lactobacillus brevis* preferment, dry sourdough and lactic acid addition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1417-1425, 2010.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4 ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, 448p.

MEIGNEN, B.; ONNO, B.; GELINAS, P.; INFANTES, M.; GUILOIS, S.; CAHAGNIER, B. Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. **Food Microbiology**, v. 18, p. 239-245, 2001.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdough-a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 72, p. 31–43, 2002.

MOORE, M. M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and

shelf life of gluten-free bread. **Europe Food Research Technology**, v. 226, p. 1309–1316, 2008.

PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINOS E.H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **Europe Food Research Technology**, v. 231, p. 883-890, 2010.

PARAMITHIOTIS, S.; CHOULIARAS, Y.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS. G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2813–2819, 2005.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Application of novel starter cultures for sourdough bread production. **Anaerobe**, v. 17, p. 486-489. 2011.

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; POONAM, N.; ATHANASIOS, A.K. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, p. 985-990, 2008.

PLESSAS, S.; PHERSON, L.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A. A. Bread making using kefir grains as baker's yeast. **Food Chemistry**, v. 93, p. 585–589, 2005.

PLESSAS, S.; TRANTALLIDI, M.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A.A. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, v. 105, p. 187-194, 2007.

RIZZELLO, C. G.; NIONELLI, L.; CODA, R.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermented for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. **Europe Food Research Technology**, v. 230, p. 645–654, 2010.

ROBERT, H.; GABRIEL, V.; LEFEBVRE, D.; RABIER, P.; VAYSSIER, Y.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete

wheat sourdough breadmaking process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 256-265, 2006.

1.

SANZ-PENELLA, J.M.; TAMAYO-RAMOS, J. A., HAROS, M. Application of bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2370–2380, 2012.

SROAN, B.S.; BEAN, S.R.; MACRITCHIE, F. Mechanism of gas cell stabilization in breadmaking. I. The primary gluten-starch matrix. **Journal Cereal Science**, v. 49, p.32-40, 2009.

UPADHYAY, R.; GHOSAL, D.; MEHRA, A. Characterization of bread dough: rheological properties and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 104-113, 2012.

VERA, A.; LY-CHATAIN, M. H.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 369-377, 2012.

WEHRLE, K.; GRAU, H.; ARENDT, E.K. Effects of lactic acid acetic acid and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 739–744, 1997.

WILDE, P. **Foam formation in dough and bread quality**. In: CAUVAIN, S.P. In: Breadmaking: improving quality. Woodhead Publishing, Cambridge, 2003, 589 p.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa indicam que o uso de diferentes substratos, na produção do fermento natural, proporciona pães com características diferenciadas. Embora muito utilizada atualmente, a aplicação da técnica da fermentação espontânea é um processo antigo. A contra indicação decorre, basicamente, de dois fatores: 1) falta de padronização do produto final, devido à falta de controle sobre a microbiota e, 2) necessidade de emprego diário de mão de obra e insumos para a sua manutenção.

Este estudo permitiu isolar e identificar quatro microrganismos de um fermento natural de uva para aplicação no desenvolvimento do fermento natural. A caracterização fenotípica e genotípica indicou que duas amostras foram consideradas *Lactobacillus paracasei* e outra amostra como *Saccharomyces cerevisiae*. A outra amostra de levedura foi identificada fenotipicamente como *Candida pelliculosa*, mas foi genotipicamente identificada como *Saccharomyces cerevisiae*.

Na cinética da fermentação foi observado que *Lactobacillus paracasei* 2 apresentou a mesma fase exponencial que *Lactobacillus paracasei* 1, de 15h. Os resultados indicam que as leveduras apresentaram velocidade específica de crescimento maior que as bactérias lácticas. Entretanto, as bactérias lácticas apresentaram maior rendimento da biomassa e menor valor de pH. Os micro-organismos apresentaram boa estabilidade antes e após a liofilização, sendo que *Lactobacillus paracasei* 2 apresentou menor redução microbiana.

Com relação ao fermento natural, os elaborados com bactérias lácticas apresentaram menor pH e maior acidez titulável em comparação aos elaborados com leveduras. De uma maneira geral, os fermentos naturais apresentaram crescimento microbiano ideal com 48 h de cultivo. Todos os micro-organismos apresentaram um crescimento microbiano satisfatório para futura aplicação em pães.

A análise dos resultados do tempo de fermentação da massa de pão com fermento natural entre 4 e 10 h demonstrou que as bactérias lácticas apresentaram as maiores contagens microbiológicas. Com exceção da *Saccharomyces cerevisiae* 2, os maiores crescimentos microbianos foram com 10 h de fermentação. Com relação ao volume específico dos pães, o melhor resultado foi com 6 h de fermentação.

Os resultados desta pesquisa mostram que as culturas *starters*, utilizadas de forma individual ou mista, foram capazes de produzir pães com características diferentes. A aplicação individual de *Lactobacillus*

paracasei 1 não apresentou êxito nos resultados, porém quando utilizada em conjunto com *Saccharomyces cerevisiae* 1 apresentou boa aceitação sensorial. O melhor resultado sensorial foi para a cultura mista de *Lactobacillus paracasei* 2 e *Saccharomyces cerevisiae* 1.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada no preparo de pães, pois atua como agente levedante fornecendo volume à massa. Os melhores resultados da análise de volume específico, textura do miolo e de formação da rede do glúten foram para o pão com *Saccharomyces cerevisiae* 1. Essa pesquisa, mais uma vez, comprovou as vantagens da utilização desta levedura no processamento de pães.



Sugere-se, para estudos futuros, a análise cromatográfica dos compostos voláteis dos pães produzidos com os fermentos naturais pesquisados. Além disso, é necessário o aumento de pesquisas sobre a caracterização da microbiota dos fermentos naturais produzidos no Brasil, uma vez que, apesar da legislação restritiva, a técnica é cada vez mais aplicada no cotidiano dos estabelecimentos que elaboram produtos panificados.

8 ANEXOS

ANEXO A – Resumo apresentado no 16th World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, agosto de 2012.



ANEXO B – Resumen presentado no XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, Buenos Aires, noviembre de 2012.

MICROAL 2012

26 al 29 de noviembre de 2012 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina

XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos
IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos
III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos




CERTIFICAMOS que el trabajo:


**"FREEZE-DRYING OF LACTIC ACID BACTERIA
AND YEAST ISOLATED FROM GRAPE
SOURDOUGH"**

KS Aplevicz, MH Canella, LR Morioka, ES Sant Anna

ha sido aceptado y presentado como **COMUNICACIÓN
LIBRE** bajo la modalidad de póster en MICROAL 2012.



Virginia Fernández Pinto
Secretaría Científica



Ricardo A. Sobol
Presidente

Comisión Organizadora

Presidente
Ricardo A. Sobol

Vicepresidente 1º
Marta Rivas

Vicepresidente 2º
Jorge Reinheimer

Secretaría General
Silvia Raffellini - Laura Duverne

Secretaría Científica
Virginia Fernández Pinto

Secretaría Finanzas
Horacio Fraide

Secretaría Relaciones Públicas
Fabiana Guglielmoni

Secretaría Técnica
Isabel Chinen

Coordinación Simposio de Conservación
Stella Maris Alzamora

Vocales
María Cristina Mans
Sergio González Silvano
Marilena Pichel
Josefina Cabrera Durango
Susana Binetti
Marcelo Masana
Sergio Epsztejn

Delagados Regionales
Centro: Nancy Passalacqua
Urbora: Juan Carlos Basílico
NEA: Mariela Darré - Silvana Lösch
NOA: Marisa Garro
Cuyo: Analia Laciari
Sur: Gabriela Gottardi - Norma Cifone
Luis A. Ottaviano

Comisión LAS – ICMSF
Alina Ratto (Perú) - Presidente

ANEXO C – Resumo apresentado no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos, outubro de 2012.



XXI ALAM
Congresso Latinoamericano
de Microbiologia
SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS NO PROCESSAMENTO DE FERMENTO NATURAL com a autoria de: SILVA, T., APLEVICZ, K.S., SANT'ANNA, E. S., OGLIARI, P.J., CANELLA, M.H. foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

Carlos P. Taborda
Prof. Dr. Carlos P. Taborda
Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia

Adalberto Pessoa Junior
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia

Organização e realização



ANEXO D – Comprovante do artigo aceito para publicação “Influence time fermentation in the characteristics of sourdough bread” submetido à Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Revisão - BJPS - 200/12

Entrada x



Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

12 mar (2 dias atrás) ☆



para mim ▾

Prezado autor,


Informamos que o artigo (200/12) "


Influence time fermentation in the characteristics of sourdough bread" foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. No entanto, de acordo com a última orientação do Conselho Editorial, é fundamental a revisão da língua inglesa (ressalto que a revisão deverá ser realizada na versão do artigo em anexo). Assim, vimos solicitar-lhe que execute este trabalho e envie-nos o Certificado de revisão. Com propósito de ajudar-lhe, sugerimos algumas empresas nacionais e estrangeiras que efetuam tal serviço (arquivo anexo).

Colocamo-nos a disposição para esclarecimentos ou informações necessárias e apresentamos nossos cumprimentos.

Leila R. de Carvalho Aranha
Editoria Executiva/BJPS

ANEXO E – Comprovante da submissão do artigo “Effect of the incorporation of different freeze-dried cultures on the properties of sourdough bread” submetido à LWT - Food Science and Technology.

 **LWT - Food Science & Technology** <lwt@elsevier.com> 2 fev ☆ ↶ ▾
para mim ▾

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Ms. Ref. No.: LWT-D-13-00164
Title: Effect of the incorporation of different freeze-dried cultures on the properties of sourdough bread
LWT - Food Science and Technology

Dear Mrs. Krischina Singer Aplevicz,

Your submission "Effect of the incorporation of different freeze-dried cultures on the properties of sourdough bread" has been assigned manuscript number LWT-D-13-00164.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/lwt/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to LWT - Food Science and Technology.

Kind regards,

LWT - Food Science and Technology

ANEXO F - Parecer de aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC

Certificado

Page 1 of 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 876

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP:

APROVADO

PROCESSO: 876

FR: 355127

TÍTULO: Identificação de bactérias lácticas em fermento natural e sua aplicação em pães

AUTOR: Emani Sebastião Sant Anna, Krischina Singer Aplevitz, Jaciara Zarpellon Mazo, Eunice Cassanego Ilha

FLORIANÓPOLIS, 26 de Julho de 2010 .

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA