



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS PALMAS-TO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BÁRBARA MARQUES BIANCHINI CONDESSA

**POTENCIAL DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E NÃO-
SACCHAROMYCES AUTÓCTONES DO CERRADO COMO CULTURAS
INICIADORAS EM PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO.**

PALMAS-TO
2019

BÁRBARA MARQUES BIANCHINI CONDESSA

**POTENCIAL DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E NÃO-
SACCHAROMYCES AUTÓCTONES DO CERRADO COMO CULTURAS
INICIADORAS EM PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins – UFT campus Palmas, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia Aplicada à Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Juliana Fonseca Moreira da Silva

PALMAS-TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

C745p Condessa, Bárbara Marques Bianchini.
POTENCIAL DE LEVEDURAS SACCHAROMYCES E NÃO-
SACCHAROMYCES AUTÓCTONES DO CERRADO COMO CULTURAS
INICIADORAS EM PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO.. / Bárbara Marques
Bianchini Condessa. – Palmas, TO, 2019.

62 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

Orientadora : Cláudia Cristina Auler do Amaral Santos

Coorientadora : Juliana Fonseca Moreira da Silva

1. Panificação. 2. Biorreator. 3. Aroma. 4. Cerrado. I. Título

CDD 664

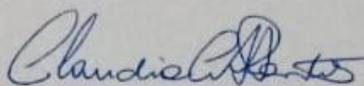
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

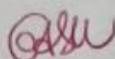
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
BÁRBARA MARQUES BIANCHINI CONDESSA

POTENCIAL DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E NÃO-
SACCHAROMYCES AUTÓCTONES DO CERRADO COMO CULTURAS
INICIADORAS EM PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO.

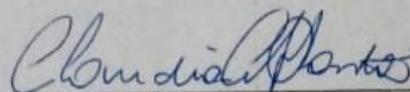
Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 05 de dezembro de 2019, pela
Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Universidade Federal de Lavras – UFLA



Prof.ª. Dr.ª. Glêndara Aparecida de Souza Martins
Universidade Federal do Tocantins - UFT



Prof.ª. Dr.ª. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos
Orientadora - Universidade Federal do Tocantins - UFT

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me sustentar e capacitar a cada dia. Ele é a fonte da vida e sabedoria.

Ao meu esposo, pelo companheirismo, paciência, dedicação, amor e cuidado a mim devotado.

Aos meus pais e irmã, por serem a minha base, meu apoio e por me incentivarem e acreditarem em mim.

A minha sobrinha por me proporcionar tantas alegrias e amor durante esta etapa.

A minha orientadora, Prof^a. Dr. Claudia Auler, pela paciência, palavras de incentivo, pelo exemplo de profissional e por todos os ensinamentos.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr. Juliana Fonseca, e ao Prof. Dr. Edenilson Niculau pela disponibilidade, pelo apoio e atenção.

A Heloisa, minha amiga irmã, que me acolheu em Palmas com tanto carinho.

As minhas colegas, Kamilla, Ianna, Priscila, Jéssica e Mirelle, pelo apoio e ajuda, fundamentais para terminar este trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) e Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA), pela estrutura disponibilizada.

A Universidade Federal do Tocantins, que possibilitou mais uma vez a minha formação e crescimento.

Aos gestores do IFTO e coordenadores de curso, pela compreensão e liberação para as atividades do mestrado.

E a todos que, direta ou indiretamente, foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

“De repente tudo vai ficando tão simples que assusta. A gente vai perdendo as necessidades, vai reduzindo a bagagem. As opiniões dos outros, são realmente dos outros, e mesmo que sejam sobre nós; não tem importância. [...] Por fim entendemos que tudo o que importa é ter paz e sossego, é viver sem medo, é fazer o que alegra o coração naquele momento. E só.”

Mário Quintana

RESUMO

O pão foi uma das primeiras aplicações de processos fermentativos da história. Apesar do papel central da levedura de panificação na qualidade final do produto, pesquisas sobre o impacto de microrganismos não convencionais sobre a complexidade sensorial do pão ainda são escassas. Assim, o presente estudo visa contribuir com as recentes investigações sobre o impacto de leveduras selvagens e não convencionais sobre os parâmetros físico-químicos e perfil aromático de pão. Para isto utilizou-se cepas de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* selvagens, isoladas de fruto e casca de árvore do cerrado, respectivamente. Analisou-se o cultivo de forma estática e em biorreator, comparando-se parâmetros cinéticos de crescimento (velocidade específica, tempo de geração e produtividade de células). A capacidade de crescimento em meio com alta concentração de açúcar e a resistência após a liofilização foram analisadas. Com os pães prontos e tendo-se como controle o pão elaborado com levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Dona Benta), comparou-se os principais parâmetros físico-químicos de qualidade do pão (pH, umidade, volume específico, cor da crosta e do miolo), bem como o perfil de compostos voláteis do pão. Observou-se que o cultivo em biorreator foi capaz de atenuar a fase *lag* de crescimento e reduziu pela metade o tempo de geração das leveduras. As leveduras apresentaram capacidade de crescimento em meio contendo alta concentração de açúcar (115g/L), o que é desejável para leveduras de panificação. O meio contendo 10g/L de maltose favoreceu o crescimento de ambas as leveduras. O pão produzido com a levedura *Candida tropicalis* (ART101.3) se destacou por possuir os parâmetros físicos mais próximos ao pão controle, a saber: pH=6,00±0,11; volume específico de 2,33±0,06ml/g e umidade de 27,06±2,16%, adicionado da capacidade de produção de compostos voláteis diferentes da levedura controle, como álcool benzílico, acetato de hexila, m-cimeno, α -tujene, β -pineno e dodecano, produzindo pães com maior complexidade sensorial. Assim, o presente trabalho demonstra o potencial de leveduras autóctones do Cerrado para serem utilizadas e exploradas em processos industriais, bem como contribui para a diversificação de culturas iniciadoras de panificação.

Palavras-chave: Panificação; biorreator; aroma; complexidade sensorial; levedura de padreiro; Cerrado.

Potential of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts from the Cerrado as starter cultures in the baking process.

ABSTRACT

Bread was one of the first applications of fermentative processes in history. Despite the central role of baking yeast in the final product quality, research on the impact of unconventional microorganisms on the sensory complexity of bread is still scarce. Thus, the present study aims to contribute to recent investigations on the impact of wild and unconventional yeasts on the physicochemical parameters and aromatic profile of bread. For this, strains of wild *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, isolated from cerrado fruit and tree bark, respectively, were used. Static and bioreactor cultivation were analyzed by comparing growth kinetic parameters (specific velocity, generation time and cell productivity). Growth capacity in medium with high sugar concentration and resistance after lyophilization were analyzed. With the ready-made breads and having as control the bread made with commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Dona Benta), the main physicochemical quality parameters of the bread (pH, humidity, specific volume, crust and crumb color) were compared.), as well as the profile of volatile compounds in bread. Bioreactor cultivation was able to attenuate the lag phase of growth and halved yeast generation time. Yeasts showed growth capacity in medium containing high sugar concentration (115g / L), which is desirable for baking yeasts. The medium containing 10g / L maltose favored the growth of both yeasts. The bread produced with *Candida tropicalis* yeast (ART101.3) stood out for having the physical parameters closest to the control bread, namely: pH = 6.00 ± 0.11 ; specific volume of 2.33 ± 0.06 ml / g and humidity of $27.06 \pm 2.16\%$, plus the production capacity of volatile compounds other than control yeast such as benzyl alcohol, hexyl acetate, m-cymene, α -tujene, β -pinene and dodecane, producing breads with greater sensory complexity. Thus, the present work demonstrates the potential of native Cerrado yeasts to be used and exploited in industrial processes, as well as contributing to the diversification of bread starter cultures.

Key-words: Bakery; bioreactor; aroma; sensory complexity; baker's yeast; Cerrado.

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

Figura 1 - Participação dos produtos de fabricação própria e revenda no setor de panificação.....	16
Figura 2 - Crescimento do setor de panificação ao longo dos anos	17
Figura 3 - Componentes do grão de trigo	18
Figura 4 - Açúcares disponíveis para a fermentação da levedura de padeiro provenientes da farinha de trigo e pela adição	19
Figura 5 - Formação da rede de glúten	20
Figura 6 - Mapa metabólico de uma levedura	24

PARTE 2: Artigo 1

Figura 1 - Cinética de crescimento das leveduras em cultivo estático com diferentes concentrações de substrato	34
Figura 2 - Cinética de crescimento das leveduras em cultivo estático e agitado com concentrações de substrato igual a 10g/L	36
Figura 3 - Acompanhamento do teor de sólidos solúveis e pH ao longo da propagação das leveduras em biorreator	37

PARTE 2: Artigo 2

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção dos pães.....	45
Figura 2 - Análise de produção de aminas biogênicas: formação de halo amarelo que tende a ficar roxo com o tempo, confirmando a não produção de aminas biogênicas	49

LISTA DE TABELAS

PARTE 1

Tabela 1 -	Enzimas presentes e aplicadas em farinha de trigo	20
Tabela 2 -	Ingredientes enriquecedores utilizados em panificação	22

PARTE 2: Artigo 1

Tabela 1 -	Relação das leveduras utilizadas	31
Tabela 2 -	Parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em cultivo estático com diferentes concentrações de substrato	34
Tabela 3-	Parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em cultivo estático e agitado com concentrações de substrato igual a 10g/L	36
Tabela 4 -	Viabilidade celular por grama da levedura úmida e liofilizada	38

PARTE 2: Artigo 2

Tabela 1 -	Parâmetros físico químicos dos pães comparados aos dados da literatura	49
Tabela 2-	Parâmetros de cor dos pães produzidos em comparação com a literatura	51
Tabela 3 -	Relação dos compostos voláteis identificados nos pães	53

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
PARTE 1	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 História da panificação	15
2.2 O Setor de panificação no Brasil	16
2.2 Os ingredientes da panificação	17
2.2.1 Leveduras	23
2.2.2 O bioma Cerrado	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	27
PARTE 2	28
4. ARTIGOS	28
4.1 Artigo 1:	28
Propagação e liofilização de leveduras autóctones do cerrado para obtenção de cultura iniciadora em panificação	28
Resumo	28
Palavras-chave	28
Abstract	28
Keywords:	29
Introdução	29
Materiais e Métodos	30
Resultados e Discussão	33
Conclusão	38
Referências	39
4.2 Artigo 2:	42
Impacto de leveduras autóctones do Cerrado nas características físico-químicas e aroma do pão.....	42

Resumo	42
Palavras-chave:	42
Abstract	42
Key-words:	43
Introdução	43
Materiais e Métodos	44
Resultados e Discussões	48
Conclusão	56
Referências	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

PARTE 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A história da panificação se confunde com a história da humanidade, pois ambas se desenvolveram e evoluíram de forma simultânea, sendo o pão e a cerveja considerados os primeiros processos fermentativos, tendo grande importância econômica e nutricional. À medida que os povos deixaram de ser nômades, entre os anos 9000 e 4000 a.C., e passaram a estabelecer comunidades às margens dos rios, surgiu então, o cultivo de cereais que permitiu o desenvolvimento do pão. Os primeiros pães não passavam pela etapa de fermentação, o que resultava em um pão seco e achatado, que era assado sobre pedras quentes. Acredita-se que os primeiros povos a assar pães fermentados foram os egípcios (VITTI, 2001; SEBESS, 2014; VILANOVA et al, 2015; ARAÚJO et al., 2015).

A etapa de fermentação tem um grande impacto sobre a vida útil, a textura e o sabor do pão. E diferentes leveduras são capazes de alterar de forma distinta a qualidade sensorial do pão, bem como o seu rendimento e a segurança microbiológica. No entanto, somente um número reduzido de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são atualmente utilizadas pelas indústrias de panificação, ao passo que grande parte da diversidade de leveduras permanece inexplorada. A utilização deste pequeno grupo relativamente homogêneo de *S. cerevisiae* tem como vantagens a melhora da consistência e maior velocidade de fermentação do pão, por outro lado, resultou em uma limitação da complexidade sensorial do produto (HEITMANN et al, 2015; ASLANKOOHI et al, 2016).

As tecnologias atuais permitem uma caracterização mais precisa dos produtos de panificação, levando ao desenvolvimento de técnicas para obtenção de produtos com características específicas, como o miolo mais regular, mais branco e com maior volume. Entretanto, o perfil dos consumidores tem mudado gradualmente ao longo do tempo, tendo o mercado exigido cada vez mais produtos singulares, tanto no que se refere aos valores nutricionais quanto às propriedades sensoriais. Assim, tem-se uma busca crescente por aditivos capazes de promover características únicas, bem como a investigação de novos microrganismos capazes de agregar sabor e aroma aos produtos fermentados (MAEQUÉS et al, 2007; MARTINBIANCO et al, 2013).

Aslankoohi et al (2016) e Heitmann et al. (2018) apontam que diferentemente do que tem ocorrido na indústria do vinho e da cerveja, nos processos de panificação a utilização de leveduras não-convencionais tem recebido pouca atenção. Segundo os autores, isso

provavelmente se deve a crença errônea de que a levedura, em um processo de panificação, tem como único papel a produção de gás carbônico, não se levando em consideração a conexão existente entre a levedura e a qualidade final do pão. Entretanto, os compostos orgânicos produzidos pela levedura durante a etapa de fermentação contribuem de forma significativa para o aroma do pão, estrutura, sabor, cor, rendimento, segurança microbiológica e vida útil do pão. Adicionalmente, leveduras selvagens podem apresentar tolerância ao congelamento, atividade de amilase e capacidade de fermentar açúcares complexos.

Assim, o presente trabalho busca investigar o potencial de leveduras selvagens, isoladas de frutos e casca de árvore do cerrado, como culturas iniciadoras para serem aplicadas em processos de panificação, além de avaliar seus impactos sobre as características físico-químicas e perfil aromático do pão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 História da panificação

O pão é o produto obtido da mistura da farinha de cereais e um líquido, podendo ser fermentado ou não e, posteriormente, assado. O pão pode conter outros ingredientes desde que não descaracterize o produto, dessa forma, os pães podem apresentar cobertura, recheio, formas e texturas variadas (BRASIL, 2005).

A introdução dos pães na dieta humana data de milhares de anos antes Cristo (a.C). Os primeiros pães eram feitos com glandes de carvalho e faias trituradas, necessitando passar por um processo de lavagem com água fervente para atenuar o amargor. Posteriormente, a massa obtida secava ao sol e moldava-se como pequenas broas de farinhas que eram cozidas sobre pedras quentes ou sobre cinzas (SDE, 2017).

Historiadores acreditam que os primeiros pães fermentados surgiram no Egito em torno de 3000 a.C. através do preparo de uma massa com farinha e água misturada a massa produzida no dia anterior. No Egito o pão constituía a base da alimentação e da economia – três pães e dois cântaros de cerveja correspondiam a um dia de trabalho, sendo os salários pagos com estes produtos. Também se atribui a civilização egípcia a criação dos primeiros fornos (SEBESS, 2014, SDE, 2017).

As trocas comerciais entre os egípcios e os gregos, e a expansão do Império Romano foram um dos principais responsáveis pela disseminação do pão pelo continente europeu. Os romanos foram responsáveis pelo aperfeiçoamento do cultivo de cereais, a construção de grandes moinhos movimentados por tração animal e a disseminação dos fornos públicos. A alimentação dos soldados romanos era à base de azeitonas e pão. As padarias começaram a ser organizadas no Império Romano, bem como as primeiras escolas de padeiro. O pão era tão habitual em Roma, que no ano 30 a.C. existiam 300 padarias no território que eram dirigidas por profissionais qualificados, sendo considerados profissionais de grande prestígio e com direito a privilégios, como a isenção de impostos (SEBESS, 2014; ABIP, 2015; SDE, 2017).

No entanto, a queda do império Romano provocou um grande retrocesso na história da panificação, pois nesta época as padarias europeias desapareceram e o pão retornou ao status de produto caseiro na maior parte da Europa. A retomada do desenvolvimento da panificação se deu em grande parte pelos franceses. A descoberta de novos processos de moagem contribuiu impulsionando o setor de panificação e, no século XVII a França foi considerada o centro da fabricação de pães de luxo (RAMOS, [1995 e 1999]; SEBESS, 2014, SDE, 2017).

Somente no século XIX o pão foi introduzido no Brasil e se expandiu graças aos imigrantes italianos. A porta de entrada para o pão no Brasil foi o Rio de Janeiro, antes disso os brasileiros faziam grande consumo de farinha de mandioca e biju. No estado de Minas Gerais surgiram os pioneiros da indústria de panificação no Brasil, e teve-se a proliferação de padarias nos grandes centros, sendo atualmente, o pão, um produto considerado indispensável na mesa do brasileiro (ABIP, 2015; SDE, 2017).

2.2 O Setor de panificação no Brasil

De acordo com o Sebrae (2017) o setor de panificação encontra-se entre os seis maiores segmentos da indústria no Brasil, com participação de 36% na indústria de produtos alimentares. Quase 95% dos estabelecimentos são micro e pequenas empresas, e além da comercialização de pão, os estabelecimentos também comercializam e participam de outras cadeias produtivas, como bebidas, congelados, laticínios, doces, etc. Assim, a diversidade de produtos comercializados nas padarias, só perde em quantidade comparativa para os super e hipermercados.

As padarias artesanais são responsáveis por 79% dos produtos do setor e, dos pães consumidos, 89% são pães artesanais e 52% é do tipo francês. O brasileiro consome em média 22,61kg de pães por ano e 98% dos brasileiros consomem produtos de panificação (SEBRAE, 2017).

Os estados brasileiros com maior número de padarias são: São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, e ao todo no Brasil existem 70.523 estabelecimentos de padaria cadastrados na Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria – ABIP. Os produtos de fabricação própria das padarias vêm tendo participação crescente e significativa no faturamento (Figura 1).



Figura 1 – Participação dos produtos de fabricação própria e revenda no setor de panificação.
Fonte: ABIP, 2018.

No ano de 2015 o setor de padarias e confeitarias teve o seu menor crescimento, mas desde 2016 observa-se uma melhora nos índices de crescimento, conforme Figura 2:

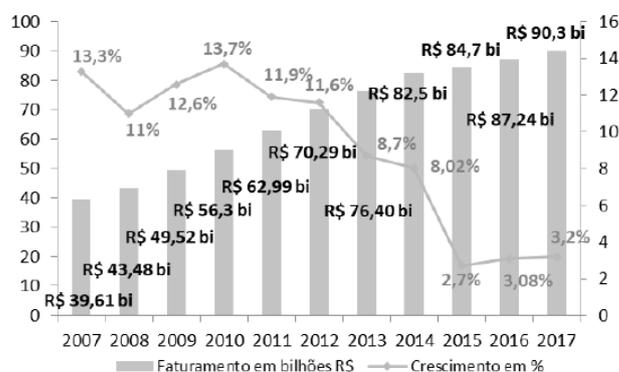


Figura 2 – Crescimento do setor de panificação ao longo dos anos
Fonte: ABIP, 2018.

De acordo a ABIP (2018) as tendências para o setor de panificação neste ano de 2019 são:

- Saudabilidade: O consumidor está cada vez mais preocupado com a sua saúde, por isso surge como tendência o uso de farinha de trigo orgânica, que além de mais saudável confere mais sabor ao pão e tem grande apelo no mercado, uso de corantes naturais, como os extraídos de frutos e ervas, em substituição aos corantes artificiais, pães com excesso de grãos não só na apresentação, mas também no miolo e ampliação de produtos celíacos, vegetarianos e veganos.
- Porção individual e menor, suficiente para atender as vontades do consumir sem deixar culpa, bem como o uso de produtos menos calóricos.
- Pães de fermentação longa com a utilização de massas madres.

2.2 Os ingredientes da panificação

Os ingredientes utilizados na panificação podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber: 1) Ingredientes básicos, que incluem a farinha de cereal, água, sal e fermento; e 2) Ingredientes enriquecedores, como açúcar, ovos, gordura, leite e aditivos.

A farinha é o principal ingrediente dos pães, este protagonismo se dá principalmente pela sua capacidade de formar uma massa elástica quando submetida à força mecânica na presença de um líquido de hidratação. Essa massa elástica retém os gases produzidos durante a fermentação, o que determina a estrutura e textura final do produto (GUERREIRO, 2006).

Por definição, farinha é o produto obtido da moagem de um cereal sendo constituída de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, minerais e água (ZANETTI et al, 2009). O sabor e a textura do pão são influenciados pelo tipo de farinha utilizado, sendo a farinha de trigo a mais comumente usada devido a seu alto teor de proteínas formadoras de glúten, estrutura essencial para a textura, leveza e maciez do pão (SDE, 2017).

As propriedades nutricionais do pão são provenientes em grande parte do trigo. O grão de trigo apresenta estrutura típica dividida em três partes: farelo, gérmen e endosperma (Figura 3). O farelo representa a parte externa, popularmente conhecida como casca do trigo, é rico em vitaminas do complexo B e minerais. O gérmen é rico em vitamina E, vitaminas do complexo B e gorduras. E o endosperma contém grande quantidade de amido e proteínas, sendo esta a fração utilizada para a produção de farinha de trigo branca (refinada) (SEBESS, 2014; SWAMI et al., 2015).

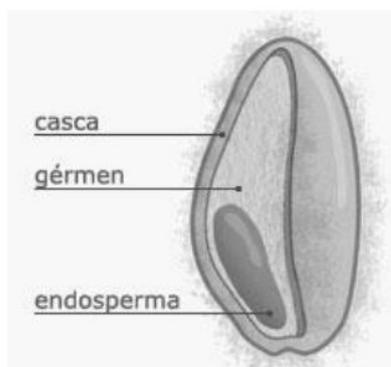


Figura 3 – Componentes do grão de trigo

A farinha de trigo refinada contém baixo teor de açúcar fermentescível, variando de aproximadamente 0,05% para a glicose, frutose e maltose a 0,2 - 0,3% para sacarose e rafinose. Já a farinha integral possui maior teor de sacarose (1,75 a 3,0%), uma vez que o farelo de trigo possui maior percentual deste dissacarídeo. Assim, a maior parte do açúcar fermentescível na massa de pão é proveniente da degradação enzimática do amido danificado (Figura 4) pelo processo de moagem, e em segunda instância, de frutanos, que correspondem a uma fração de cerca de 1,4 a 1,7% na farinha refinada e 3,4 a 4,0% no farelo de trigo (STRUYF et al., 2017).

O amido, considerado o principal carboidrato do trigo, além de prover açúcar fermentescível para a levedura também exerce influência sobre a estrutura do pão, pois auxilia na retenção dos gases produzidos durante a fermentação. Adicionalmente, a proporção de amilopectina e amilose, constituintes do amido que variam dependendo da espécie da planta e seu grau de maturação, influenciam na viscosidade e retrogradação do amido, tendo impacto direto sobre as características dos produtos de panificação. Após o amido, as arabinoxilanas

(AX) são consideradas os polissacarídeos de maior abundância (1,5 – 2,5%) na farinha de trigo e interferem na distribuição de umidade na massa, alterando as propriedades reológicas da massa e aumentando o tempo de mistura, além de interagir com as proteínas formadoras de glúten, tendo impacto no volume do pão (VITTI, 2001; MESSIAS et al., 2016).

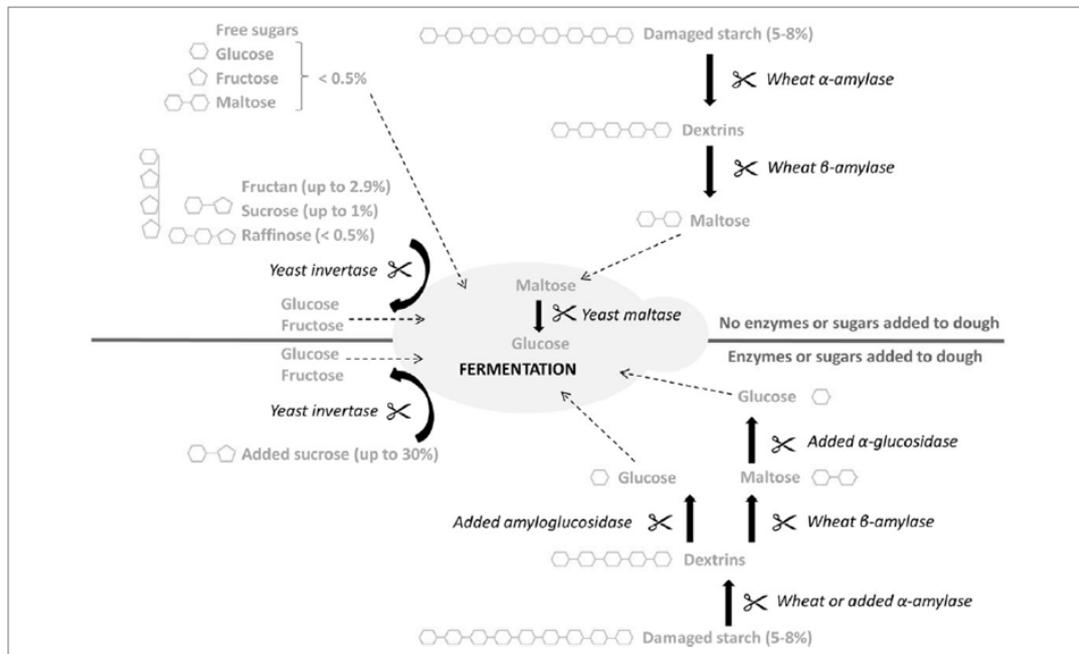


Figura 4 – Açúcares disponíveis para a fermentação da levedura de pão provenientes da farinha de trigo e pela adição
Fonte: STRUYF et al. (2017)

No entanto, é a composição protéica do trigo que atrai a atenção do setor de panificação. O trigo possui de 8 a 13% de proteínas, destas as albuminas e globulinas correspondem a 15% e os 85% restantes são constituídos de gluteninas e gliadinas, que ao serem hidratadas e submetidas à ação mecânica formam a rede de glúten (Figura 5), importante para a estrutura e qualidade do pão. As gluteninas conferem ao pão resistência à extensão e as gliadinas possuem características plastificantes, isto é, promovem fluxo viscoso e extensibilidade a massa, atuando no controle do volume do pão (ARAÚJO et al., 2015; BORGHT et al., 2005).

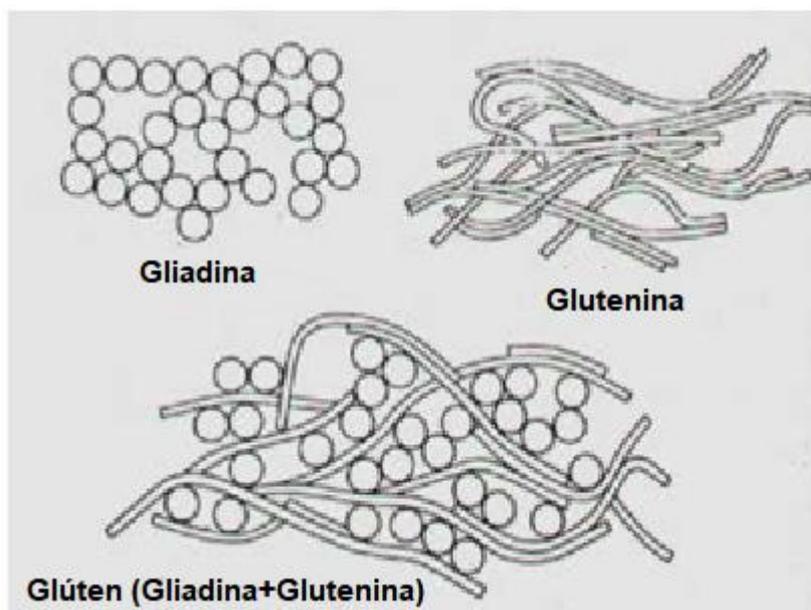


Figura 5 – Formação da rede de glúten

O glúten pode ser definido como uma rede tridimensional, viscoelástica, insolúvel em água, aderente e com capacidade de formar finas membranas que retêm os gases liberados durante a fermentação. Na etapa de cocção do pão, as proteínas constituintes do glúten se desnaturam e limitam os orifícios preenchidos pelo gás em expansão, formando os alvéolos do miolo do pão. No entanto, o glúten não é formado exclusivamente por proteínas; lipídios e carboidratos interagem com as gluteninas e gliadinas estabilizando a rede de glúten (SWAMI et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015).

Não somente o glúten necessita de água; a farinha de trigo apresenta enzimas que são ativadas quando hidratadas. As enzimas mais importantes presentes na farinha de trigo são as alfa-amilases, proveniente principalmente do pericarpo do trigo e com papel importante no que se refere à qualidade final dos produtos de panificação; proteases, que se concentram no endosperma e germe do trigo; oxidases e peroxidases (RANI et al., 2001). A tabela 1 mostra as principais enzimas e sua respectiva função no que tange os produtos de panificação.

Tabela 1 – Enzimas presentes e aplicadas em farinha de trigo

Enzimas	Função
Lipoxigenase	Responsável pelo branqueamento da massa e do miolo do pão, além de melhorar as propriedades reológicas da farinha de trigo.
Hemicelulases	Proporcionam pães com maior volume, uma vez que melhoram a maquinabilidade das massas.
Fosfolipases	Possui função emulsificante, resultando em pães mais uniformes, com maior volume e resistência a fermentação.
Glicose oxidase	Responsável pelo fortalecimento do glúten, melhora das propriedades reológicas da massa, auxilia no volume e crocância do pão.

Glicolipase	Melhora a textura do miolo e fornece maior resistência a variações dos parâmetros físicos ao longo do processo.
Hexose oxidase	Confere maior tolerância às variações dos parâmetros físicos ao longo do processo, diminui a pegajosidade da massa e auxilia no volume do pão.
Alfa – amilase	Melhora a maquinabilidade, aumenta a produção de gás e, conseqüentemente o volumedo pão, melhora a coloração da crosta e aroma, prolonga a vida útil do pão.
Proteases	Aumentam a extensibilidade da massa.

A água é essencial para a formação da massa do pão, pois propicia 1) a distribuição uniforme dos ingredientes na massa; 2) a atividade enzimática e, conseqüentemente, a fermentação; 3) hidrata as proteínas permitindo a formação do glúten; 4) controla a consistência da massa; 5) ajuda no controle da temperatura da massa; 6) permite a gelatinização do amido durante a cocção e 7) controla a maciez e a palatabilidade do pão. A água ideal para ser empregada em processos de panificação deve apresentar dureza média (50 a 100ppm de sais de cálcio e magnésio), pH levemente ácido, ser incolor, inodora e potável (GUERREIRO, 2006; ZANETTI et al, 2009; ALMEIDA et al, 2011).

Segundo os historiadores, o sal sempre foi utilizado no processo de obtenção de pães, no entanto sua eficácia como melhorador da estrutura da rede de glúten foi descoberta por acaso. Além de atuar na estrutura do glúten tornando-a mais firme e, conseqüentemente, melhorando a retenção de dióxido de carbono na massa, o sal também é fundamental para o 1) sabor do pão; 2) controle da fermentação; 3) resistência da massa; 4) conservação do pão; 5) manutenção da umidade do miolo e 6) permite melhor hidratação da massa (SEBESS, 2014; SDE, 2017).

Em panificação normalmente utiliza-se de 1 a 2% de sal, com base no peso de farinha, isto porque elevados teores de sal desencadeiam estresse osmótico e o acúmulo de íons Na^+ e Cl^- tem efeitos tóxicos para a levedura quando em altas concentrações. Assim, à medida que se aumenta o teor de sal, a produção de gás é afetada, bem como a viabilidade do fermento. Porém, baixo teor de sal resulta em uma rede de glúten fraca, incapaz de aprisionar o gás gerado durante a fermentação (STRUYF et al., 2017).

Os ingredientes enriquecedores são escolhidos de acordo com as características que se pretende dar ao pão. Os principais ingredientes enriquecedores são: gorduras, leite, ovos, açúcar e os aditivos, e possuem como finalidade o aumento da vida útil, melhora da textura, sabor e maciez (PIMENTEL et al., 2011). A tabela 2 discrimina os principais ingredientes enriquecedores utilizados na panificação e suas contribuições para o pão.

Tabela 2- Ingredientes enriquecedores utilizados em panificação.

Ingredientes	Função	
Açúcar	Facilita a adaptação da levedura; reforça o sabor e aroma; melhora a cor e a maciez do produto final; aumenta o volume do pão.	
Leite	Promove maior absorção de água pela farinha; aumenta a tolerância da massa a mistura, o volume e a vida útil; reforça o sabor, o aroma e a cor da crosta (mais avermelhada); influencia a cor do miolo (mais branco).	
Gordura	Manteiga e Margarina	Aumenta o volume e a vida útil; melhora a maciez do miolo e a crocância da crosta; fortalece a rede de glúten; reforça o sabor e o aroma.
	Banha bovina ou de porco refinada	
	Óleos vegetais	
Aditivos (Melhoradores)	Ácido Ascórbico ou vitamina C	Importante agente oxidante; protege a massa da ação de fermentos proteolíticos; aumenta a flexibilidade da massa; fortalece a rede de glúten; aumenta a tolerância à mistura e a capacidade de retenção de gases.
	Lecitina de soja	Melhora a textura, maciez e estabilidade da massa; deixa o miolo mais fino e suave; retarda a perda de umidade; aumenta a vida útil.
	Extrato de malte	Alimenta as leveduras, pois constitui uma fonte de açúcar, ativando a fermentação; realça o sabor e a cor do produto final.
	Amilases	As α -amilases hidrolisam o amido em dextrinas, ao passo que as β -amilases atuam na conversão de dextrinas em maltoses, contribuindo para aumentar o teor de açúcares fermentescíveis; aumenta a vida útil; realçam e uniformizam a cor (dourada) da crosta. Comumente a correção do teor de amilases na farinha se faz pela adição de malte diastático ou farinha de malte, mas também podem ser empregadas amilases fúngicas e bacterianas.
	Farinha de favas	Responsável por descorar os pigmentos da farinha de trigo, deixando o miolo mais branco.
	Farinha de glúten	Corrige o teor protéico de farinhas fracas, fortalecendo a rede de glúten e aumentando a retenção de gases.
	Propionato de Cálcio	Importante antimofa; aumenta a vida útil.

Fonte: BIANCHINI, 2016.

Atualmente, de forma majoritária, o fermento utilizado pelo setor de panificação é constituído de levedura *S. cerevisiae*. O uso de leveduras tem como objetivo a liberação de gases durante o processo de fermentação, produzindo uma massa crescida com alvéolos e texturas singulares. Além da produção de compostos orgânicos (álcoois, ácidos carboxílicos,

aldeídos, ésteres, etc.), também durante a etapa de fermentação contribuem para a formação do aroma e sabor do pão (SEBESS, 2014; ASLANKOOHI et al, 2016).

De acordo com Sebess (2014) e Guerreiro (2006), os gases liberados podem ser provenientes de dois tipos de fermentos:

- Fermentos biológicos – Utilizado nos pães que passam por processos de fermentação, este tipo de fermento compreende as leveduras. Estas são encontradas de três formas, a saber: 1) Levedura fresca prensada – Caracterizada pelo elevado teor de água (70% de umidade), é o tipo mais comumente encontrado em panificação industrial. Necessita ser armazenado sob refrigeração e possui duração de algumas semanas, podendo haver certa perda de atividade; 2) Levedura seca reidratável – Contém cerca de 90% de matéria seca, podendo ser armazenada por longos períodos em temperatura ambiente. No entanto, devido ao processo de secagem, sua atividade pode ser prejudicada, possuindo, em média, 70% da atividade da levedura fresca. Antes de utilizá-la é necessário reidratá-la, sendo recomendado a utilização de água açucarada em temperatura de 35-37°C seguida de repouso por 10min; 3) Levedura seca instantânea – Contém cerca de 90% de matéria seca, podendo ser armazenada por longos períodos em temperatura ambiente. Sua atividade é de 80-90% quando comparada à levedura fresca. Não necessita ser reidratada antes do uso, tendo sido cada vez mais empregada na panificação industrial devido sua praticidade e facilidade de conservação.
- Fermento químico – Empregado nos pães não fermentados, compreende substâncias químicas que liberam gás carbônico quando decompostas por ação do calor. Este tipo de fermento tem menor empregabilidade no setor de panificação.

2.2.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares que possuem crescimento vegetativo normal por brotamento ou cissiparidade. A maioria das leveduras fermentativas naturalmente adaptadas para processos de panificação, que se caracterizam por ser um ambiente estressante, com pH baixo, baixa tensão de oxigênio e presença de altas concentrações de carboidratos, principalmente maltose, pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae* (DE VUYST et al, 2016).

O habitat típico das leveduras compreende lugares ricos em açúcar, como frutas, flores e cascas de árvores, sendo estes organismos predominantemente aeróbios facultativos. As espécies de *Saccharomyces* são consideradas as leveduras comerciais mais importantes, e têm sido estudadas como modelos de organismo eucarioto há muitos anos, sendo o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (MADIGAN et al, 2016).

Durante o processo de fermentação, as leveduras metabolizam os açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose, frutose e maltose) presentes na massa, por meio da glicólise, produzindo o ácido pirúvico que em seguida é reduzido a álcool etílico e dióxido de carbono durante a fermentação alcoólica. A concentração de carboidratos fermentescíveis na farinha, principalmente maltose – fonte de energia preferencial da *S. cerevisiae*, depende da hidrólise do amido a partir de enzimas presentes na própria farinha e também provenientes da levedura. Adicionalmente, as leveduras também produzem uma diversidade de metabólitos (Figura 6) que contribuem para o aroma e sabor do pão, tais como álcoois superiores, aminoácidos, ésteres e ácidos orgânicos (DE VUYST et al, 2016).

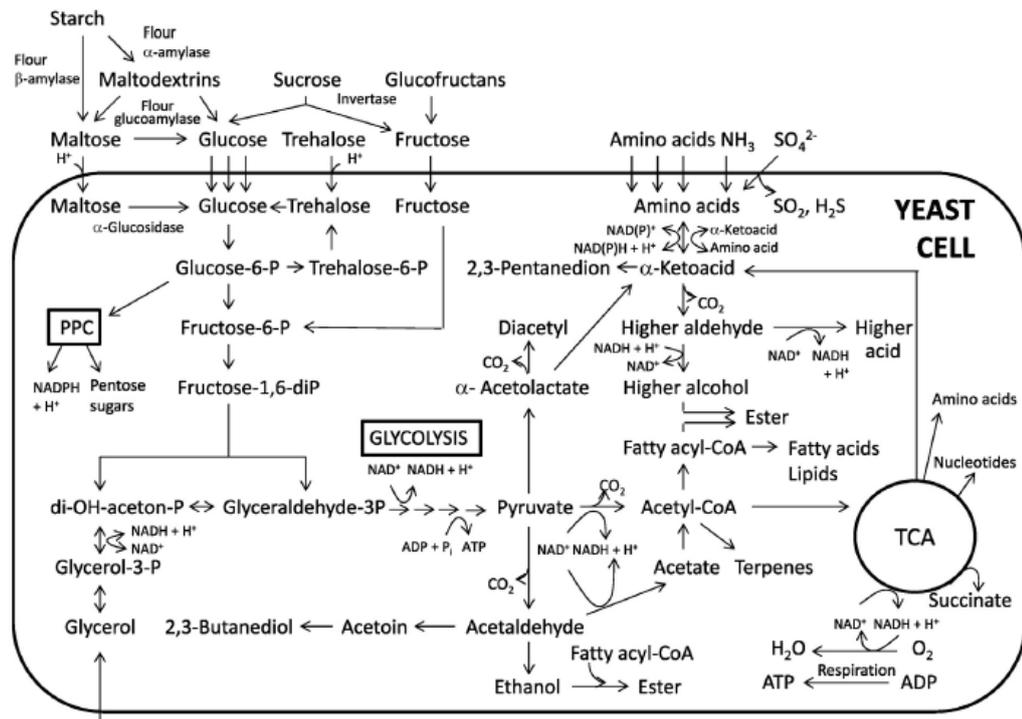


Figura 6 – Mapa metabólico de uma levedura.

Fonte: DE VUYST et al, 2016.

Os microrganismos em geral, após serem inoculados em meio de cultura favorável ao seu crescimento, exibem um comportamento típico nos valores de concentração celular,

expresso por meio da curva de crescimento que pode ser dividida, de forma simplificada, nas seguintes etapas (SCHMIDELL et al 2001; CARVALHO, 2010):

- Fase de latência ou lag – Imediatamente após a inoculação do microrganismo no meio de cultura tem-se o início desta fase. Durante a mesma o microrganismo adapta-se ao meio de cultivo e sintetiza as enzimas necessárias à metabolização dos componentes do meio de cultivo. A duração desta fase está intimamente relacionada com a concentração do inóculo, estado fisiológico das células, idade do microrganismo, tipo de microrganismo, as condições de cultivo (pH, oxigênio, temperatura, etc.) e as condições do pré-inóculo (meio de cultura, tempo de propagação, etc.);
- Fase logarítmica ou log – Caracteriza-se por possuir velocidade específica de crescimento constante e máxima, sendo esta velocidade proporcional à concentração de biomassa. Desta forma, tem-se o crescimento acelerado do microrganismo e predominância de células jovens que estão no auge do seu metabolismo;
- Fase estacionária – Nesta etapa a biomassa atinge sua concentração máxima e permanece constante, uma vez que a velocidade de crescimento e morte dos microrganismos se equiparam. Nesta etapa também ocorre modificações bioquímicas e estruturais na célula, tornando-as mais resistentes a condições adversas;
- Fase de declínio – A principal característica desta fase é o decaimento da concentração de células viáveis, uma vez que a velocidade de morte dos microrganismos excede a velocidade de produção de novas células. Observa-se nesta fase a autólise dos microrganismos, resultante da ação de enzimas intracelulares.

2.2.2 O bioma Cerrado

O Cerrado brasileiro é classificado como uma savana, isto é, sua vegetação possui aspecto xeromórfico, clima com estação seca definida, solo pobre, bem drenado e com altas concentrações de alumínio e ferro; sendo considerada uma das savanas mais ricas do mundo, devido à grande quantidade de recursos naturais renováveis. No entanto, parte dessa biodiversidade e recursos naturais encontra-se ameaçada, pois este bioma já perdeu cerca de 50% de sua cobertura vegetal nativa em virtude da expansão das fronteiras agrícolas

brasileiras, que tem utilizado áreas do cerrado para o cultivo, principalmente, de soja e milho alterando sua biodiversidade (UHLMANN et al. 1998; FARINHA et al., 2019).

Morandi et al. (2018) afirmam que as savanas da América do Sul abrigam cerca de 12.000 espécies de plantas e uma paisagem heterogênea, possibilitando uma alta riqueza de biodiversidade. No que tange ao Cerrado de forma específica, sua alta riqueza de espécies se deve a existência de diferentes padrões de diversidade dentro do mesmo bioma, uma vez que sua região central tem sido considerada uma área de dispersão de espécies e a região periférica, sofre influência de biomas adjacentes, como a Amazônia, contribuindo para o aumento da biodiversidade.

Apesar de toda esta biodiversidade, alguns autores (ARRUDA et al., 2013; RIBEIRO, RODRIGUES, 2006) têm apontado que o bioma Cerrado passou por um período de esquecimento, o que contribuiu para que fosse um bioma desconhecido e pouco explorado durante muitos anos. No entanto, esta realidade tem se modificado, e o bioma Cerrado tem sido descrito como tendo grande potencial para ser explorado, de forma sustentável, visando a incrementação de vários setores industriais, tais como alimentício, médico, madeireiro e agroindustrial, visto que possui uma biodiversidade peculiar, com grande qualidade e quantidade.

Especialmente, no que se referem aos frutos do Cerrado, estes são descritos como possuindo sabor '*sui generis*', grande quantidade de açúcar, sais minerais, vitaminas do complexo B, proteínas, ácidos graxos e carotenóides. O seu sabor peculiar tem atraído a atenção do setor alimentício, que já vem desenvolvendo diversos produtos com os mesmos. A alta concentração de açúcar simples nos frutos, juntamente com seu baixo pH e a presença de insetos em sua superfície, os tornam um habitat importante para um grande número de microrganismos, sendo considerados, atualmente, boas fontes de prospecção de microrganismos pelos cientistas, que tem buscado não apenas a identificação destes, mas também aplicações econômicas (SILVA, et al., 2008; ARRUDA et al., 2013; MAMBUSCAY et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial de leveduras selvagens, autóctones do cerrado, para serem aplicadas em processos de panificação como culturas iniciadoras.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial fermentativo das leveduras *S. cerevisiae* selvagem e levedura não-convencional *C. tropicalis* por meio da elaboração dos pães;
2. Avaliar o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* selvagem e levedura não-convencional *C. tropicalis* em biorreator;
3. Obter as leveduras liofilizadas e analisar a resistência das mesmas ao processo de liofilização;
4. Avaliar se as leveduras selecionadas produzem aminas biogênicas;
5. Analisar as características físico-químicas dos pães obtidos em comparação aos pães elaborados por levedura controle (fermento comercial Dona Benta), por meio de testes de pH, umidade, determinação do volume específico e cor da crosta e miolo;
6. Investigar a influência das leveduras sobre os compostos voláteis do pão e, conseqüentemente, seu aroma.

PARTE 2

4. ARTIGOS

4.1 Artigo 1:

Propagação e liofilização de leveduras autóctones do cerrado para obtenção de cultura iniciadora em panificação

CONDESSA, Bárbara Marques Bianchini; SILVA, Kamila Veloso da; SILVA, Juliana Fonseca Moreira da; BENEVIDES, Paula; SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral*

Resumo

A produção de fermento de padeiro geralmente é realizada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, contribuindo para que grande parte da diversidade de levedura existente permaneça inexplorada e sem aplicação na indústria. A prospecção e estudo de novos microrganismos capazes de agregar sabor e aroma aos produtos fermentados é uma forma de inovação no setor alimentício, sendo o estudo dos parâmetros cinéticos essencial para inferir sobre a aplicabilidade industrial das leveduras selvagens. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar os fatores cinéticos da propagação de leveduras selvagens com potencial de aplicação no setor de panificação e sua preservação por liofilização. Utilizou-se duas leveduras isoladas de fruta e casca de árvore do Cerrado, respectivamente: ART 101.3 (*Candida tropicalis*) e SC5952 (*Saccharomyces cerevisiae*) que foram cultivadas sem agitação em meio extrato de malte com concentração de 10g/L e 115g/L. Posteriormente, ambas foram cultivadas em biorreator mecanicamente agitado com meio extrato de malte (10g/L), seguido de liofilização e análise de viabilidade celular. As leveduras apresentaram maior capacidade de crescimento em meio com 10g/L de extrato de malte, mas também foram capazes de se desenvolver em meio com alta concentração de açúcar (115g/L de extrato de malte), mostrando que são osmoterantes, característica necessária às leveduras de panificação. O cultivo em biorreator otimizou os parâmetros cinéticos: produtividade de células e velocidade específica aumentaram e o tempo de geração foi reduzido pela metade, além de possibilitar a atenuação da fase de latência nas primeiras 4h. A liofilização mostrou-se um bom método para a preservação das mesmas, pois ambas obtiveram boa viabilidade celular após liofilização (acima de 9 log UFC/g), características desejáveis para as leveduras de padeiro.

Palavras-chave: Fermentação, cinética, fermento de padeiro, liofilização.

Abstract

Baker's yeast production is usually made from *Saccharomyces cerevisiae*, contributing to the fact that much of the existing yeast diversity remains untapped and unused in the industry. The prospecting and study of new microorganisms capable of adding flavor and aroma to fermented products is a form of innovation in the food sector, and the study of kinetic parameters is essential to infer the industrial applicability of wild yeast. Thus, the present work aimed to study the kinetic factors of wild yeast propagation with potential application in the bakery sector and its preservation by lyophilization. Two isolated yeasts from Cerrado fruit and tree bark, respectively, were used: ART 101.3 (*Candida tropicalis*) and SC5952 (*Saccharomyces cerevisiae*), which were cultivated without agitation in malt extract medium with concentration of 10g / L and 115g / L. Subsequently, both were cultivated in a mechanically shaken bioreactor with malt extract medium (10g / L), followed by lyophilization and cell viability analysis. Yeasts showed higher growth capacity in medium

with 10g / L malt extract, but were also able to grow in medium with high sugar concentration (115g / L malt extract), showing that they are osmotolerant, a necessary characteristic for baking yeasts. Bioreactor cultivation optimized the kinetic parameters: cell productivity and specific velocity increased and the generation time was halved and the latency phase attenuated in the first 4 hours. Lyophilization proved to be a good method for preservation, as both obtained good cell viability after lyophilization (above 9 log CFU / g), desirable characteristics for baker's yeast.

Keywords: Fermentation, kinetics, baker's yeast, bread.

Introdução

A levedura utilizada em panificação, comumente denominada de fermento de padeiro, é um dos componentes básicos e essenciais do pão, visto que contribui para o volume, textura, maciez, sabor e aroma do produto. A utilização de microrganismos como agentes de fermentação na panificação teve início no Egito há 6 mil anos, quando os padeiros começaram a utilizar uma porção de massa do pão anterior para inocular as massas subsequentes (BRANDÃO e LIRA, 2011).

A produção de fermento de padeiro envolve várias etapas de propagação da levedura selecionada, normalmente produzido a partir de pequenas quantidades de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada em meio de cultura líquido em condições adequadas. A produção de fermento a partir de *S. cerevisiae* representa a maior produção de biomassa a granel de microrganismo unicelular no mundo e, a taxa média de crescimento anual do mercado global é de 8,8% entre 2013 e 2018. Até 2022 estima-se que o mercado mundial de leveduras atinja 5,40 bilhões de dólares, com crescimento de 9,0%, principalmente devido ao crescimento da indústria de panificação. Anualmente milhões de toneladas de células de levedura fresca são produzidas para a utilização em alimentos, sendo o rendimento e a produtividade amplamente afetados pela concentração de biomassa, tipo de açúcar, disponibilidade de oxigênio e formação de etanol (SERIO et al, 2001; HEITMANN et al., 2018).

A utilização deste grupo reduzido e homogêneo de *S. cerevisiae* pela indústria de panificação apresenta como vantagens um sistema de produção de biomassa bem estabelecido e estudado, melhora na consistência, velocidade e padronização da fermentação do pão, quando comparada com a utilização de fermento natural, no entanto resulta em uma limitação da complexidade sensorial do produto e contribui para que grande parte da diversidade de levedura existente permaneça inexplorada e sem aplicação na indústria (HEITMANN et al, 2015; ASLANKOOHI et al, 2016).

Mudanças no perfil dos consumidores tem ocorrido de forma gradual ao longo dos anos, sendo cada vez mais exigido produtos diferenciados, tanto no que se refere aos valores nutricionais e as propriedades sensoriais. O setor de panificação tem buscado acompanhar essas mudanças, tendo aumentado o uso de ingredientes orgânicos e naturais em seus produtos, além do retorno da utilização de fermentações longas com utilização de massas madres (MAEQUÉS et al, 2007; MARTINBIANCO et al, 2013; ABIP, 2018).

Atualmente o fermento de padeiro é comercializado de três formas distintas: o biológico fresco, o seco e o seco instantâneo. A diferença entre eles está no teor de umidade, que impacta de forma direta a durabilidade e a forma de armazenamento. O fermento fresco é o mais utilizado atualmente na indústria de panificação, mas devido ao seu elevado teor de umidade necessita de armazenamento sob refrigeração e rápido consumo, visto que sua vida útil é de aproximadamente 12 dias. Por esse motivo, tem aumentado o interesse nos fermentos secos, pois possuem maior facilidade de transporte, estocagem e maior vida útil. Desta forma, é importante que as leveduras destinadas ao setor de panificação apresentem resistência aos processos de secagem, como a liofilização (VITTI, 2001; SEBESS, 2014; BRANDÃO e LIRA, 2011, HEITMANN et al., 2018).

A biotecnologia aplicada à indústria de alimentos pode contribuir com as mudanças exigidas pelos consumidores por meio da prospecção de novos microrganismos capazes de agregar sabor e aroma aos produtos fermentados (MARTINBIANCO et al, 2013). Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar os fatores cinéticos da propagação de leveduras autóctones do cerrado, previamente selecionadas como tendo potencial de serem aplicadas na indústria de panificação, e a sua preservação por meio de liofilização contribuindo para elaboração e inserção de novas culturas iniciadoras no setor de panificação.

Materiais e Métodos

Microrganismos e preservação

Foram utilizadas duas leveduras (Tabela 1) autóctones do cerrado que se encontram no banco de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFT-Palmas. Como controle utilizou-se a levedura comercial, *S. cerevisiae* (Dona Benta), adquirida no comércio local de Palmas.

Tabela 1– Relação das leveduras utilizadas

Leveduras	Origem	Espécie	Isolamento
ART 101.3	Araticum	<i>Candida tropicalis</i>	Conceição, 2014
SC 5952	Casca de Árvore	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prof ^a . Dr ^a . Paula Benevides, Laboratório de Análises Ambientais – UFT Palmas.

A escolha das leveduras utilizadas foi baseada em respostas obtidas em trabalho anterior (BIANCHINI, 2016), no qual realizou-se testes de fermentação de carboidratos, criotolerância, osmotolerância, crescimento em diferentes temperatura e produção do pão com a levedura úmida.

Cultivo estático

Inoculou-se duas alçadas de cultura jovem em dois tubos de 5mL contendo caldo extrato de malte (115g/L e 10g/L) com pH corrigido para 4,5 e incubou-se em estufa a 30°C. Após 24h o sobrenadante dos tubos foi descartado e a biomassa presente nos dois tubos foi transferida para 200mL de caldo extrato de malte novo que ficou incubado por 32h em estufa a 30°C. A cada 4h realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600nm. Adicionalmente, em intervalos de 4h fez-se a leitura de pH, teor de sólidos solúveis e contagem de células por plaqueamento com microgotas (LIN et al., 2015).

Cultivo com agitação

As leveduras selvagens, isoladamente, foram inoculadas em 5mL de caldo extrato de malte (10g/L) com pH=4,5, através de duas alçadas de cultura jovem e incubadas em estufa a 30°C. Após 24h o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi transferida para 100mL de caldo extrato de malte novo e incubadas em estufa a 30°C. Decorridas 24h, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi inoculada em biorreator mecanicamente agitado (STR) com aquecimento por camisa a 30°C e agitação de 180rpm sem incorporação de oxigênio e controle de pH ao longo da fermentação. Durante 32h teve-se a propagação da biomassa em biorreator e em intervalos de 4h retirou-se uma amostra para a determinação da viabilidade celular, medição de pH e do °Brix (MARTINBIANCO et al. 2013).

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com a metodologia adaptada de Santos et al. (2018) e Acourene et al (2007). Sendo o cálculo de produtividade em células expresso pela equação 1,

$$P_x = \frac{(X_m - X_0)}{t_f} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

P_x – Produtividade em células viáveis (cel/mL.h)

X_m – Concentração máxima da levedura (cel/mL)

X_0 – Valor inicial da concentração da levedura (cel/mL)

T_f – Tempo de fermentação

Para o cálculo da velocidade específica máxima (μ_x) plotou-se um gráfico $\ln DO$ versus tempo, na fase exponencial de crescimento, obtendo-se o μ_x através do coeficiente angular. A partir desse valor foi possível calcular o tempo de geração (Eq. 2).

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_x} \quad (\text{Eq. 2})$$

Liofilização das leveduras

Ao término da propagação o caldo obtido foi centrifugado em tubos falcons de 50mL a 4000rpm, por 10min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água destilada autoclavada para sua lavagem. Fez-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. Após o sobrenadante ser descartado, as células foram ressuspensas em leite desnatado à 10%, congeladas e liofilizadas a -50°C com vácuo de 2000mmHg (ABADIAS et al., 2001).

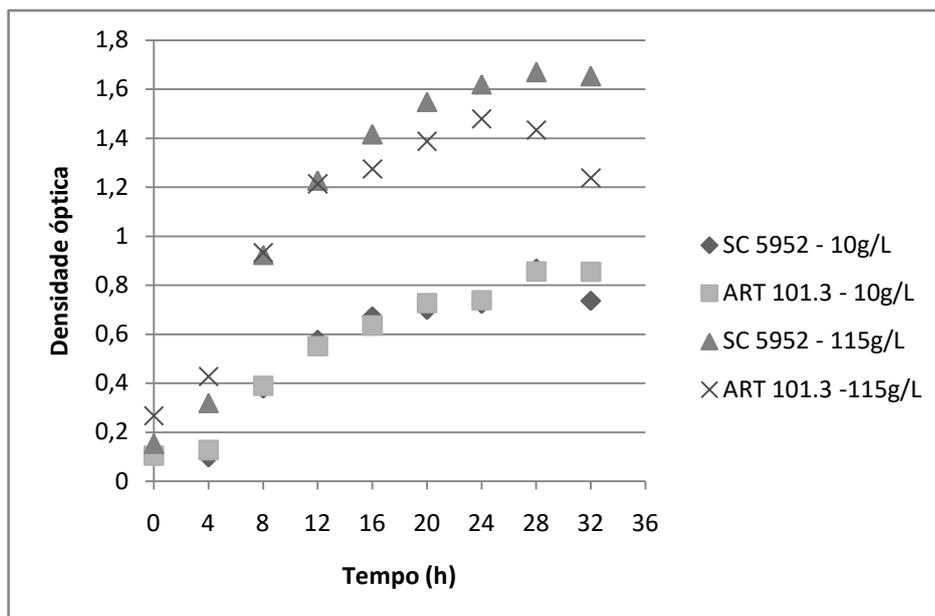
Avaliação da resistência à liofilização

Suspendeu-se 1g das leveduras úmidas em 9mL de solução salina 0,9% autoclavada, seguida do plaqueamento (diluições 10^{-4} a 10^{-12}) por microgota em meio YEPG sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glicose e 2% de ágar bacteriológico). Após 48h incubadas a 30°C , contou-se a quantidade de colônias em cada diluição para a determinação da viabilidade celular de cada inóculo (log UFC/g). Fez-se o mesmo procedimento para as leveduras após a liofilização. Para a avaliação da resistência ao método de liofilização comparou-se a viabilidade celular obtida antes e após a liofilização.

Resultados e Discussão

Após serem inoculados em um meio de cultivo, os microrganismos exibem um comportamento típico nos valores de concentração celular (Fig. 1), que de forma simplificada, pode ser dividido nas fases de latência, logarítmica, estacionária e declínio. A duração da fase de latência está intimamente relacionada com a concentração do inóculo, estado fisiológico das células, idade do microrganismo, tipo de microrganismo, condições de cultivo (pH, oxigênio, temperatura, substrato, etc.) e as condições do pré-inóculo (meio de cultura, tempo de propagação, etc.) (SCHMIDELL et al, 2001; CARVALHO, 2010).

O estudo comparado das curvas de crescimento obtidas para o cultivo estático (Figura 1) mostram que ambas as leveduras, quando cultivadas com concentração de substrato igual a 10g/L, apresentaram fase de latência nas primeiras 4h de cultivo seguida de uma fase exponencial até 28h, quando entraram na fase estacionária. Ao passo que o cultivo com concentração de substrato igual a 115g/L resultou em diminuição da fase de latência e da fase logarítmica para ambas as leveduras. Esta diminuição da fase logarítmica pode estar relacionada com uma maior concentração de etanol no meio, visto que a maior disponibilidade de carboidrato no meio propicia a maior conversão deste em etanol e outros metabólitos secundários (ácidos orgânicos) pela via de fermentação e ao acumular-se no meio de cultivo apresenta-se como fator inibitório do crescimento das leveduras, podendo ser letal (SCHMIDELL et al., 2001).



	Equação de ajuste	Coefficiente de correlação (R ²)
SC5952 – 10g/L	$y = -x^2 + 0,052x + 0,028$	0,941
ART101.3 – 10g/L	$y = -x^2 + 0,046x + 0,051$	0,974
SC5952 – 115g/L	$y = -0,002x^2 + 0,116x + 0,068$	0,981
ART101.3 – 115g/L	$y = -0,002x^2 + 0,107x + 0,186$	0,972

Figura 1- Cinética de crescimento das leveduras em cultivo estático com diferentes concentrações de substrato

As leveduras testadas no presente estudo apresentaram capacidade de crescimento em meio com alta concentração de açúcar (115g/L), conforme observado na Figura 1. Entretanto, apesar desta característica desejável as leveduras de panificação, e, da maior densidade óptica observada nesta condição, a produtividade em termos de células viáveis, em meio com alta concentração de açúcar, foi menor (Tabela 2). Este resultado pode estar relacionado com o efeito de inibição por etanol e ácidos orgânicos atuando sinergicamente com a regulação negativa dos fatores de resposta ao estresse.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em cultivo estático com diferentes concentrações de substrato

	SC 5952 -10g/L	ART 101.3 – 10g/L	SC 5952 -115g/L	ART 101.3 – 115g/L
Px (10 ⁵ cel/mL.h)	44	26,5	3,1	9,3
μx (h ⁻¹)	0,037	0,038	0,033	0,026
tg (h)	18,81	18,32	21,09	26,77

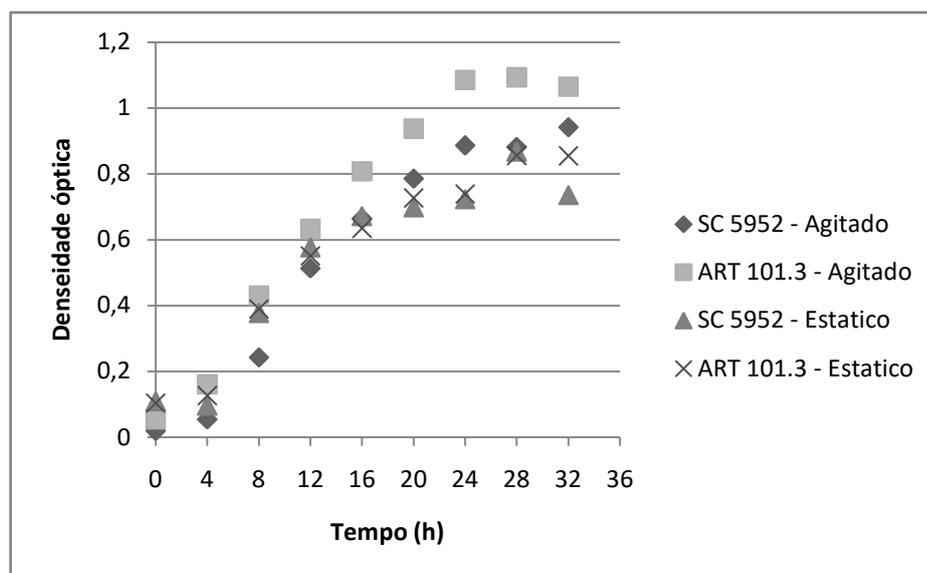
Sendo Px – Produtividade em células viáveis; μx – Velocidade específica máxima; tg – Tempo de geração.

Attfield (1997) relata que a presença de álcool e ácidos orgânicos gera uma condição de estresse para as leveduras, pois pode levar ao declínio do pH intracelular. Em resposta a este fenômeno, as células terão que expelir os prótons pela atividade das ATPases da membrana plasmática, com consumo de ATP, assim, a sobrevivência da levedura está condicionada ao equilíbrio dos níveis de ATP na célula, necessário tanto para o crescimento como para a homeostase do pH, e a regulação dos fatores de tolerância ao estresse. Entretanto, quando as células estão crescendo exponencialmente por fermentação, a ativação da proteína quinase e os eventos pós-traducionais que apoiam o crescimento e a proliferação leva a regulação negativa de fatores de tolerância ao estresse, o que pode ter interferido na viabilidade celular das leveduras crescidas em ambiente com maior teor de açúcar.

Tal hipótese pode ser testada futuramente pela quantificação do glicerol intracelular e análise das rotas bioquímicas durante cultivo. Isto por que as leveduras quando submetidas à condição hiperosmótica, tem sua adaptação ao meio interligada com a capacidade de produzir e acumular glicerol, sendo esta uma característica crítica para as leveduras empregadas no setor de panificação. Quando a levedura é submetida a grande concentração de açúcar, os fatores de regulação ao estresse gera como principais respostas hiperosmóticas a expressão de genes que codificam a síntese de glicerol e efluxo de cátions. A síntese e retenção intracelular de glicerol é crucial para a resposta hiperosmótica, pois auxilia na recuperação da pressão de turgor. Em condições normais o glicerol produzido é excretado, no entanto, sob condições hiperosmóticas, o glicerol é acumulado no meio intracelular (ATTFIELD, 1997; ATTFIELD e KLETSAS, 2000).

Adicionalmente, a análise dos parâmetros cinéticos (Tabela 1) evidenciou que o cultivo em meio com concentração de substrato igual a 10g/L permitiu o crescimento com velocidade específica maior e, conseqüentemente, levou a tempos de geração menor, sendo, portanto, mais indicado para a proliferação das leveduras em biorreator.

As leveduras foram cultivadas em biorreator, permitindo o escalonamento da produção e obtenção de maior quantidade de biomassa. O perfil de crescimento em biorreator em comparação com o cultivo estacionário é mostrado na Figura 2. Observou-se um comportamento semelhante de crescimento entre os dois modos de cultivo, com exceção da fase de latência que foi atenuada no cultivo agitado em biorreator.



	Equação de ajuste	Coefficiente de correlação (R ²)
SC5952 – Agitado	$y = -x^2 + 0,055x - 0,071$	0,973
ART101.3 - Agitado	$y = -0,001x^2 + 0,067x - 0,016$	0,986
SC5952 – Estático	$y = -x^2 + 0,052x + 0,028$	0,941
ART101.3 - Estático	$y = -x^2 + 0,046x + 0,051$	0,974

Figura 2 - Cinética de crescimento das leveduras em cultivo estático e agitado com concentrações de substrato igual a 10g/L

Os parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em cultivo estático e agitado com concentrações de substrato igual a 10g/L são mostrados na Tabela 3, evidenciando que o cultivo em biorreator favorece a propagação das leveduras, otimizando a cinética de produção devido às condições de cultivo serem melhoradas em biorreator, uma vez que a agitação constante favorece a maior homogeneidade do meio, temperatura melhor distribuída e maior disponibilidade de oxigênio. Mendes et al. (2013) relata que para otimização da propagação de leveduras, a aeração é um fator determinante, pois favorece o metabolismo respiratório quando se tem a predominância da reprodução celular e a minimização da formação de etanol.

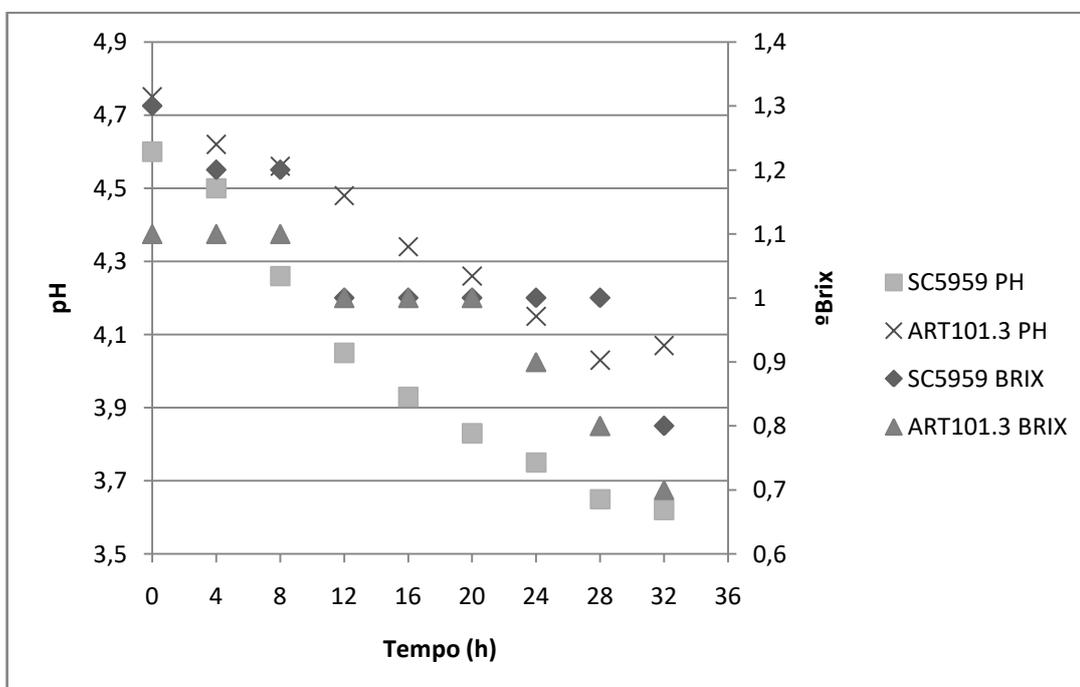
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em cultivo estático e agitado com concentrações de substrato igual a 10g/L

	SC 5952 - Estático	ART 101.3 – Estático	SC 5952 - Agitado	ART 101.3 Agitado
μ_x (h ⁻¹)	0,037	0,038	0,075	0,056
tg (h)	18,81	18,32	9,28	12,43

Apesar da velocidade específica de crescimento das leveduras estudadas serem semelhantes à de outras leveduras já comercializadas (SANTOS et al, 2018; TONIATO,

2013), este valor encontra-se abaixo dos relatados por Lopes et al. (2015) e Homem et al. (2017) para a levedura de panificação comercial, a saber: 0,18 e 0,12 respectivamente. A velocidade específica é influenciada por diversos fatores, tais como: condições de cultivo – pH, aeração e temperatura, bem como fatores nutricionais – tipo de substrato e concentração de substrato (SCHMIDELL et al 2001), desta forma, pode-se obter melhores taxas de crescimento ao se otimizar o meio de cultivo e condições de cultivo para favorecer o crescimento das leveduras estudadas.

Analisando o teor de sólidos solúveis no meio de cultivo ao longo da propagação das leveduras (Figura 3), observou-se um declínio no valor deste, isto se deve ao consumo dos açúcares por parte do microrganismo, que os utilizam para gerar energia e produzir biomassa. No entanto, observa-se que o açúcar não se esgotou ao final da fermentação o que indica a possibilidade de continuação da propagação do microrganismo a fim de se obter maior quantidade de biomassa. Adicionalmente, notou-se que a levedura SC5952 foi capaz de promover uma maior acidificação do meio, podendo ser indicativo de uma maior adaptabilidade ao meio de cultivo, permitindo um maior desenvolvimento e produção de compostos metabólitos secundários (ácidos orgânicos). Esta observação também é sustentada pelo menor tempo de geração observado na Tabela 3.



	Equação de ajuste	Coefficiente de correlação (R^2)
SC5952 – pH	$y = x^2 - 0,055x + 4,641$	0,992
ART101.3 - pH	$y = x^2 - 0,028x - 04,755$	0,981

SC5952 - °Brix	$y = x^2 - 0,018x + 1,281$	0,836
ART101.3 - °Brix	$y = -x^2 + 0,001x + 01,096$	0,965

Figura 3 – Acompanhamento do teor de sólidos solúveis e pH ao longo da propagação das leveduras em biorreator

Na Tabela 4 é apresentado o resultado para o processo de liofilização das leveduras SC5952 e ART101.3. Observou-se que a levedura SC5952 quando cultivada em meio com concentração de 115g/L teve uma queda considerável na viabilidade celular, ao passo que a levedura ART101.3 tem grande resistência ao processo de secagem. A menor viabilidade celular vista no cultivo em meio com alta concentração de açúcar pode estar relacionada às alterações metabólicas sofridas pelos microrganismos em resposta ao estresse hiperosmótico.

Quando cultivadas em meio com concentração de açúcar igual a 10g/L, ambas as leveduras apresentaram viabilidade celular maior do que a observada antes da liofilização, devido à concentração celular que ocorre após a retirada da água aliada com a baixa taxa de injúria celular. A levedura comercial apresenta concentração celular igual a 9,85 log UFC/g, tendo a levedura ART101.3 alcançado população superior ao controle.

Tabela 4 – Viabilidade celular por grama da levedura úmida e liofilizada

Levedura	Úmida (log UFC/g)	Seca (log UFC/g) - 115g/l	Seca (log UFC/g) 10g/l
SC 5952	8,91	5,09	9,16
ART 101.3	9,25	8,93	10,02

Conclusão

As leveduras testadas apresentaram capacidade de crescimento em meio com alta concentração de açúcar, desejável as leveduras de panificação. O cultivo com concentração de substrato igual a 10g/L permitiu o crescimento com velocidade específica maior e tempos de geração menor. Adicionalmente observou-se um comportamento de crescimento semelhante entre o cultivo estacionário e biorreator agitado mecanicamente. O cultivo em biorreator favoreceu a propagação das leveduras, otimizando a cinética de produção devido às condições de cultivo serem melhoradas em biorreator. A levedura SC5952 foi capaz de promover uma maior acidificação do meio fermentado, podendo ser indicativo de uma maior adaptabilidade ao meio de cultivo.

Após a liofilização ambas leveduras apresentaram diferença quanto a concentração celular. A levedura ART 101.3 alcançou população superior ao controle. Apesar da necessidade de maiores estudos para consolidação das leveduras como culturas iniciadoras, ambas possuem características importantes e desejáveis nos microrganismos empregados na indústria de panificação.

Referências

ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 65, P. 173-182. 2001.

ABIP – Associação Brasileira da Indústria de panificação e Confeitaria. **Balanco e tendências do mercado de panificação e confeitaria**. 2018.

ACOURENE, S.; KHALID, A. Kh.; BACHA, A.; TAMA, M.; TALEB, B. Optimization of bakery yeast production cultivated on musts of dates. **Journal of Applied Sciences Research**. v. 3, n. 10, p. 964-97. 2007.

ASLANKOOHI, E.; HERRERA-MALAVAR, B.; REZAEL, M. N.; STEENSELS, J.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Non-conventional yeasts strains increase the aroma complexity of bread. **PLOS ONE**. Outubro de 2016.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature**. v. 15, p. 1351 – 1357. 1997.

ATTFIELD, P. V.; KLETSAS, S. Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration médium. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 323-327. 2000.

AXEL, C.; ROCKER, B.; BROSNAN, B.; ZANNINI, E.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. **Food Microbiology**. n. 47, p. 36-44. 2015.

BIANCHINI, B. M. **Avaliação do potencial de leveduras selvagens, isoladas de frutos e casca de árvore do cerrado, para aplicação em processos de panificação**. 2016. 58f. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Fundação Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2016.

BRANDÃO, S. S.; LIRA, H. de L. **Tecnologia de Panificação e Confeitaria**. EDUFRPE, 2011.

CARVALHO, I. T. de; **Microbiologia básica**. EDUFRPE, 2010.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of different beer yeasts on wheat dough and bread quality. **Journal of Cereal Science**. v.63, p. 49-56. 2015.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. Impacto of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 7, p. 1152-1164. 2018.

HOMEM, C. L. G; COSTA, J. R. C.; PINHEIRO, I. R. Estudo da fermentação alcoólica do hidrolisado de bagaço de laranja por *Saccharomyces cerevisiae*. **V semana de engenharia química UFES**. 2017.

Lin, X.; ZHANG, C. Y.; BAI, X. W.; FENG, B.; XIAO, D. G. Improvement of stress tolerance and leavening ability under multiple baking-associated stress conditions by overexpression of the SNR84 gene in baker's yeast. **International Journal of Food Microbiology**. v. 197, p. 15-21. 2015.

LOPES, A. C. A.; PINTO, I. de O.; SOUZA, C. M. de; CANGUSSU, A. S. R.; OLIVEIRA, M. E. S. de. Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 10, n. 3, p. 06-10. 2015.

MARQUÉS, C. J. B.; ALBIÑANA, M. L. L.; LACUEVA, C. P. La masa madre: El secreto del pan. **Alimentaria**. v. 380, p. 51-62. 2007.

MARTINBIANCO, F.; MARTINS, A. R.; RECH, R.; FLÔRES, S. H.; AYUB, A. Z. Avaliação sensorial de pães de fermentação natural a partir de culturas starters inovadoras. **Ciência Rural**. v. 43, n. 9, p. 1701-1706. 2013.

MENDES, T. A. de O.; PINTO, L. M.; MENDES, D. de S. O.; MALTA, H. L.; OLIVEIRA, E. de S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16, n. 2, p. 81-89. 2013.

SANTOS, S. F. de M.; MORAES, F. da S.; FERNADES, L. M.; RIBEIRO, L. B.; FREIRE, K. R. de L. Análise cinética da fermentação das leveduras comerciais S-04 e S-33. **Revista Saúde e Ciência Online**. v. 7, n. 2, p. 197 – 2008. 2018.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol 2. Editora Edgard Blücher. 2001.

SEBESS, P. **Técnicas de Padaria Profissional**. Editora: SENAC, Rio de Janeiro: 2014.

SERIO, M. Di; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. A kinetic and mass transfer model to simulate the growth of baker's yeast in industrial bioreactors. **Chemical Engineering Journal**. v. 82, p. 347 – 354. 2001.

TONIATO, J. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos**. 2013. 50f. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2013.

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia na produção de alimentos**. Biotechnologia industrial, vol4, Ed. Edgar Blucher, p. 365-386, 2001.

4.2 Artigo 2:

Impacto de leveduras autóctones do Cerrado nas características físico-químicas e aroma do pão

CONDESSA, Bárbara Marques Bianchini; SILVA, Kamila Veloso da; NICULAU, Edenilson dos Santos; BENEVIDES, Paula; SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral*

Resumo

O aroma do miolo do pão é fortemente influenciado pelos microrganismos utilizados durante a fermentação. Atualmente tem crescido o interesse pelo isolamento de novos microrganismos capazes de agregar sabor e aroma ao pão. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de leveduras selvagens (*Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*) sobre as características físico-químicas e aroma do pão. Para isto verificou-se se as leveduras selvagens eram produtoras de amins biogênicas. Em seguida preparou-se os pães com as leveduras liofilizadas e frescas e avaliou-se os principais parâmetros físicos-químicos dos pães: pH, volume específico, umidade, cor do miolo e casca. Realizou-se também a análise microbiológica e de perfil aromático do pão utilizando CG-MS. Observou-se que as leveduras estudadas não são produtoras de amins biogênicas. O pH do pão produzido com a levedura controle foi de 5,75, ao passo que dos pães produzidos com as leveduras selvagens variaram entre 6,00-6,28. As leveduras frescas produziram pães com o mesmo volume específico (2,3mL/g), porém inferior ao controle (4,0mL/g). Quanto à umidade somente o pão produzido com a levedura SC5952 fresca apresentou umidade diferente do pão controle. A levedura ART101.3 destacou-se na produção de compostos voláteis, apresentando 24 dos 30 compostos identificados, destes sete não foram identificados no pão controle ou no pão produzido com *S. cerevisiae* selvagem. Os dados do presente artigo podem servir para agregar conhecimento no que se refere aos padrões de identidade e qualidade de pães, bem como da influência de leveduras comerciais e selvagens sobre o perfil sensorial do pão.

Palavras-chave: Fermentação, aroma, levedura de padeiro, padrão de qualidade.

Abstract

The aroma of bread crumb is strongly influenced by the microorganisms used during fermentation. Interest in the isolation of new microorganisms capable of adding flavor and aroma to bread has grown. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of wild yeast (*Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on the physicochemical characteristics and aroma of bread. For this it verified if the wild yeasts were producers of biogenic amines. Then the breads were prepared with the lyophilized and fresh yeasts and the main physical-chemical parameters of the breads were evaluated: pH, specific volume, humidity, crumb color and peel. Microbiological and aromatic profile analysis of bread was also performed using CG-MS. It was observed that the yeasts studied are not biogenic amine producers. The pH of bread produced with the control yeast was 5.75, while the bread produced with wild yeast ranged from 6.00 to 6.28. Fresh yeasts produced breads with the same specific volume (2.3mL / g), but lower than the control (4.0mL / g). As for moisture, only bread produced with fresh SC5952 yeast presented different moisture than control bread. The yeast ART101.3 stood out in the production of volatile compounds, presenting 24 of the

30 compounds identified, of these seven were not identified in control bread or bread produced with wild *S. cerevisiae*. The data from this article can serve to aggregate knowledge regarding bread identity and quality standards, as well as the influence of commercial and wild yeasts on the bread's sensory profile.

Key-words: Fermentation, aroma, baker's yeast, quality standard

Introdução

A fermentação de pão é um dos processos biotecnológicos mais antigos do mundo, no entanto, sua correlação com os parâmetros de qualidade destes produtos ainda não são bem estabelecidos e compreendidos, visto que comparado aos processos de produção de vinho e cerveja, a levedura de panificação recebeu menor atenção. Assim, grande esforço tem sido realizado para investigar o desempenho tecnológico de *Saccharomyces cerevisiae* em aplicações de panificação, tendo-se investido poucos recursos no estudo de diferentes leveduras, de forma a subestimar o papel central da levedura de padeiro, responsável não somente pelo crescimento da massa, mas capaz de influenciar toda a complexidade sensorial do produto, bem como impactar a vida útil do produto (HEITMANN et al., 2015; ASLANKOOHI et al., 2016).

As leveduras empregadas na indústria de panificação devem possuir adequada produção de gás, visando a produção de uma massa uniforme, tolerância a uma ampla faixa de pH, a temperatura e a altas concentrações de sal e açúcar; bem como a produção de compostos aromáticos. Por muito tempo os estudos se concentraram em aperfeiçoar a textura do pão e a capacidade de desprendimento de CO₂ pela levedura, proporcionando maior volume e uniformidade ao pão, mas recentemente tanto os pesquisadores como a indústria tem focado em investigar o aroma como um critério de qualidade do pão (HEITMANN et al., 2018; BIRCH et al., 2014).

S. cerevisiae reúne características desejáveis como a fermentação de meio contendo alta concentração de açúcar de forma eficiente e completa, produção de sabor desejável, alta tolerância ao etanol e ausência de produção de toxinas. Muitas leveduras não convencionais não possuem todas essas características e a maioria não atingem uma velocidade de fermentação desejável, no entanto podem apresentar outras características desejáveis, como tolerância ao congelamento, atividade de amilase e capacidade de fermentar açúcares complexos, bem como a produção de uma vasta gama de compostos voláteis capazes de alterar o aroma do pão (ASLANKOOHI et al., 2016). De Vuyst e Neysens (2005) relatam que *Pichia* e *Candida* são leveduras que podem ser aplicadas em processos de panificação.

Adicionalmente, Heitmann et al. (2018) relata que *Debaromyces*, *Kluyveromyces* e *Schizosaccharomyces* são leveduras interessantes para substituírem *Saccharomyces cerevisiae* na indústria de panificação.

Existe um interesse crescente no isolamento de novas leveduras que possam atuar como cultura iniciadoras em processos de produção bebidas fermentadas e panificação, aumentando a diversidade de sabores e aromas nestes produtos (VARELA, 2016, ASLANKOOHI et al., 2016). Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência de duas leveduras selvagens, autóctones do Cerrado, sobre as características físico-químicas e o perfil aromático do pão, contribuindo para o conhecimento de como leveduras não convencionais e *Saccharomyces* selvagens podem impactar os produtos de panificação, além de verificar a possibilidade de aumentar a diversidade de culturas iniciadoras alternativas em processos de panificação.

Materiais e Métodos

Cepas e preservação

Foram utilizadas duas leveduras selvagens, uma isolada de casca de árvore do cerrado (*S. cerevisiae* – SC5952) e a outra do fruto de Araticum – *Annona squamosa* (*C. tropicalis* – ART 101.3), típico do cerrado. Ambas se encontram no banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) –UFT, Câmpus Palmas. Como controle utilizou-se a levedura comercial, *S. cerevisiae* (Dona Benta).

A escolha das leveduras utilizadas foi baseada em respostas obtidas em trabalho anterior (BIANCHINI, 2016), no qual realizou-se testes de fermentação de carboidratos, criotolerância, osmotolerância, crescimento em diferentes temperatura e análise sensorial.

Produção de amins biogênicas

A metodologia de Aslankoohi et al. (2016) foi utilizada para investigar a produção de amins biogênicas, sendo 10^6 células/mL inoculadas em meio YEPG sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glicose e 2% de ágar bacteriológico) suplementado com 0,006% de púrpura de bromocresol e 1% de mix de aminoácidos. Os aminoácidos presentes no mix são tirosina, histidina, fenilalanina, leucina, triptofano, arginina e lisina em proporções iguais.

As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias observando-se diariamente as alterações no meio. Para interpretação dos resultados considerou-se: Positivo, a presença de halo roxo que

tende a aumentar e escurecer com o tempo e, negativo, presença de halo amarelo que tende a virar roxo com o tempo.

Padronização dos inóculos

Suspendeu-se 1g das leveduras previamente liofilizadas (-50°C com vácuo de 2000mmHg, usando-se como crioprotetor leite desnatado 10%) em 9mL de solução salina 0,9% autoclavada (121°C, 15min.), seguida da contagem em câmara de Neubauer para a determinação da viabilidade celular de cada inóculo (UFC/g) (BIO-RAD LABORATORIES, 1992). Para a padronização do inóculo, os pães foram elaborados com quantidade suficiente de levedura que correspondesse a 3g do fermento padrão (*Saccharomyces cerevisiae* comercial), conforme metodologia adaptada de Heitmann et al (2015).

Elaboração dos pães

Os insumos necessários para a formulação dos pães – farinha de trigo (Paulista), sal (Cisne), óleo (Sinhá), açúcar (Cristal) - foram adquiridos no comércio local de Palmas, Tocantins. Foram elaborados cinco pães, em três repetições, utilizando-se a mesma formulação, sendo a diferença dos mesmos o fermento empregado, a saber: SC5952 liofilizada, ART101.3 liofilizada, SC5952 fresca, ART101.3 fresca e controle (*S. cerevisiae* comercial). Os pães foram produzidos seguindo o fluxograma abaixo (Fig. 1), e armazenados em fatias de 1,5cm envoltos em papel alumínio, agrupados em sacos de polipropileno, sob refrigeração (7°C) por 12 dias.

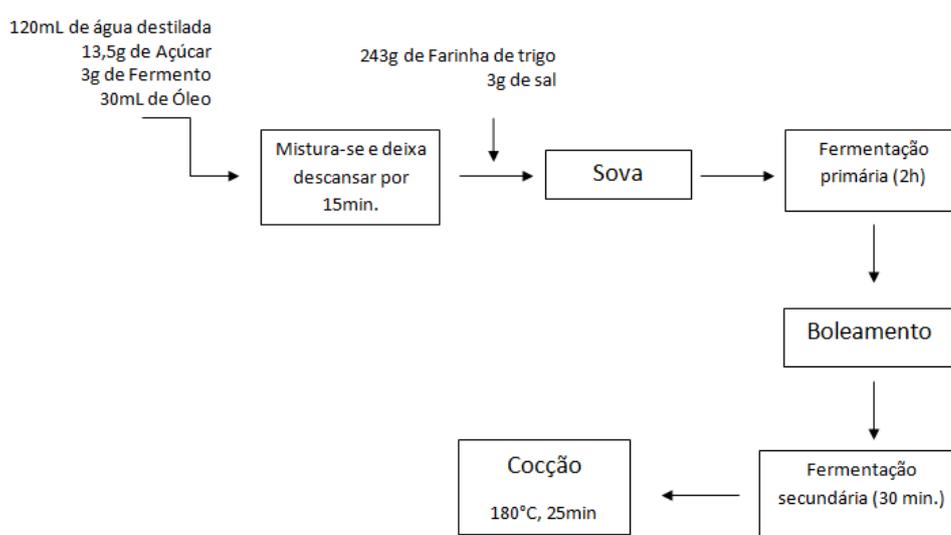


Figura 1 – Fluxograma do processo de produção dos pães.

Determinação do pH e Volume específico

Para análise do pH foi utilizado um pHmetro digital seguindo a metodologia adaptada de Rizzello et al. (2014). Para isso 10g de amostra foram homogeneizadas em 90mL de solução de cloreto de sódio estéril (0,9%).

O volume do pão foi obtido pela técnica de deslocamento de sementes. Para isto, um recipiente de plástico foi preenchido com as sementes de milho e nivelado com o auxílio de uma régua, as sementes foram transferidas para uma proveta para se determinar o volume do recipiente (V). Em seguida, colocou-se o pão dentro do recipiente e preencheu-o com as sementes, dando leves batidas no recipiente a fim de que as sementes se organizem e preencham todos os espaços vazios, mediu-se novamente o volume das sementes (Vs). O volume do pão (Vp) foi calculado conforme equação abaixo (Eq. 1) e o volume específico é dado pela razão entre o volume do pão e sua massa (Eq. 2) :

$$Vp = V - Vs \quad (\text{Eq.1})$$

$$\rho = Vp / m \quad (\text{Eq. 2})$$

Umidade

O teor de umidade do pão foi analisado utilizando o método de secagem em estufa. Dez gramas de pão foi partido em pequenas porções e colocados em estufa de secagem em placas de Petri abertas, previamente secas e pesadas, a 105°C até atingir peso constante. Após a secagem, as placas foram mantidas dentro de um dessecador por 1h ou até o completo resfriamento. O conteúdo de umidade em base úmida foi calculado usando a Eq. 3.

$$U (\%) = \frac{(M1-M2)}{(M1-M)} 100\% \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: U= Teor de umidade M1= Massa da amostra + placa de Petri; M2= Massa da amostra após secagem + placa de Petri; M= Massa do placa de Petri.

Cor da crosta e do miolo do pão

Os parâmetros L* (luminosidade) que varia de 0 (preto) a 100 (branco), a* e b*(coordenadas de cromaticidade) que flutuam de - a* (verde) até + a* (vermelho) e -b* (azul) até + b* (amarelo), foram determinados utilizando-se um colorímetro conforme metodologia adaptada de Gutkoski e Neto (2002). Os valores obtidos representam a média de três medidas: as duas extremidades e ponto central do pão.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas dos pães foram realizadas após 1, 3, 6, 9 e 12 dias, sendo analisada a presença de coliformes totais, *Salmonella* spp. e bolores e leveduras. Para a inoculação dos meios, 25g do pão sem casca foi homogeneizado em 225mL de solução de cloreto de sódio estéril (0,9%), seguido do preparo de diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-3}).

A análise de coliformes foi feita utilizando-se caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) da Kasvi. Inicialmente separou-se nove tubos de ensaio, contendo 10 mL do meio e tubo de Durhan invertido, os três primeiros tubos foram inoculados, cada um, com 1mL de amostra na diluição 10^{-1} , os outros três tubos seguintes, foram inoculados, cada um, com 1mL de amostra na diluição 10^{-2} , e os últimos três tubos com 1mL de amostra na diluição 10^{-3} . Os tubos foram incubados a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Decorridas 48h os tubos que apresentaram bolhas ou meio turvo tiveram uma alíquota retirada e inoculada em novos tubos contendo caldo EC e verde brilhante (VB) para a confirmação do resultado. Os resultados foram expressos de acordo com a tabela de Número Mais Provável (SILVA et al., 2007).

Para determinação de *Salmonella* spp. realizou-se o pré-enriquecimento incubando-se a amostra em condições não seletivas, por 18h à 35°C , para isto utilizou-se a diluição 10^{-1} . O enriquecimento seletivo foi realizado inoculando-se 1 mL da amostra pré-enriquecida em caldos seletivos Rappaport Vassilidis (RV) e Tetrionato (TT), por 18 a 24h à 35°C . O plaqueamento diferencial foi realizado nos meios Ágar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), a fim de se detectar colônias com morfologias indicativas de *Salmonella* sp. A confirmação da presença de *Salmonella* sp. foi realizada através de provas bioquímicas (SILVA et al., 2007). Os resultados foram expressos como ausência ou presença em 25 g.

A presença de bolores e leveduras foi analisada pela técnica de plaqueamento por em superfície (100 μL), nas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} , em meio Ágar Batata Dextrose, da Himedia, preparado e esterilizado de acordo com o fabricante. A incubação foi realizada a 30°C , 48h. Os resultados foram expressos em UFC/mL, tendo-se utilizado o método de contagem padrão em placas (SILVA et al., 2007).

Análise dos compostos voláteis

Para análise dos compostos voláteis do pão fez-se uma microextração em fase sólida no modo *Headspace* (HS-SPME) seguida de análise em CG-MS Agilent Technologies 7890B hifenizado a um espectrômetro de massas 5977B do tipo Quadrupolo simples operando com fonte de ionização por impacto eletrônico e uma coluna capilar HP-5MS, L = 30 m, DI = 0,25

mm e filme = 0,25 μm . Para a micro extração utilizou-se 0,3g de pão colocadas em um *vial* de 1,5mL que foi aquecido a 90°C em chapa aquecedora e exposta a fibra PDMS/DVB por 30min. As temperaturas do injetor, linha de transferência de massas, quadrupolo e da fonte foram mantidas a 250°C, 250°C, 150°C, 230°C, respectivamente.

Empregou-se gás hélio como fase móvel com um caudal de 1,2mL/min. A injeção foi realizada no modo *Splitless*, sendo a temperatura mantida a 40°C durante 3 min. e depois aumentou-se até 125°C a uma taxa de 2,5°C /min., finalizando-se com a temperatura de 245°C, com incremento de 10°C/min. Uma mistura de n-alcenos lineares (C₈ a C₁₈) foi injeta nas mesmas condições para servir como padrão de retenção. A detecção por massas foi realizada em um intervalo de 40 – 500Da. Posteriormente, os índices de retenção foram calculados utilizando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963), e os compostos foram identificados por meio de comparação do espectro de massas com espectros da literatura (ADAMS, 2007) e utilizando banco de dados (NIST2014).

Delineamento e análise estatística

O Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC foi utilizado, levando-se em consideração somente os princípios da repetição e da casualidade, não havendo controle local. Três repetições independentes foram realizadas e as análises conduzidas em duplicata, sendo os valores apresentados em termos das médias \pm desvio padrão. Foi realizado teste de variância (ANOVA) seguido da comparação entre as médias obtidas pelo teste Tukey ($p < 0,05$), para verificação da diferença estatística entre os resultados obtidos.

Resultados e Discussões

Produção de aminas biogênicas

A figura 2 mostra o resultado do teste investigativo de produção de aminas biogênicas pelas leveduras estudadas. As leveduras não são produtoras de aminas biogênicas, característica desejável ao fermento de padeiro, visto que o consumo de alimentos contendo grande quantidade de aminas biogênicas são responsáveis por quadros toxicológicos graves, pois as mesmas funcionam como neurotoxinas quando absorvidas em altas concentrações (GOMES et al., 2014; ASLANKOOHI et al., 2016).



Figura 2 – Análise de produção de aminas biogênicas: formação de halo amarelo que tende a ficar roxo com o tempo, confirmando a não produção de aminas biogênicas.

O termo aminas biogênicas se refere ao grupo de substâncias orgânicas derivadas da descarboxilação de aminoácidos resultante de uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos em ambiente ácido ou como forma alternativa de obtenção de energia em condições desfavoráveis. Vários países possuem um limite de teor de aminas biogênicas permitidas nos alimentos. No Brasil, a Portaria nº185 de 1997 é a única legislação referente ao assunto e estabelece um limite máximo de 100ppm para substâncias formadoras de histamina em pescados (GOMES et al 2014).

Análises Físico-químicas e microbiológicas

Os pães produzidos no presente estudo apresentaram umidade dentro dos padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 2000) e volume específico abaixo do valor comum de mercado, com exceção do pão controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos pães comparados aos dados da literatura

	pH	Volume específico(mL/g)	Umidade (%)
SC5952 fresca	6,14±0,03 ^a	2,36±0,08 ^b	30,32±1,36 ^a
ART101.3 fresca	6,00±0,11 ^b	2,33±0,06 ^b	27,06±2,16 ^{a,b}
SC5952 seca	6,28±0,09 ^a	1,00±0,01 ^c	22,58±2,43 ^c
ART101.3 seca	6,18±0,04 ^a	0,91±0,05 ^c	28,55±1,97 ^{a,b}
Controle	5,75±0,05 ^c	4,02±0,18 ^a	25,64±3,02 ^{b,c}
Referência*	---	4,10	< 38

*Volume específico - ESTELLER E LANNES (2005) tendo como objeto de estudo o pão de forma; Umidade – RDC nº90/2000. Letras iguais na mesma coluna: não há diferença entre os valores segundo Teste de Tukey com significância de 5%.

A umidade dos pães produzidos não foi afetada pelas leveduras ou tipo do fermento, visto que os pães produzidos com a levedura ART101.3 fresca, SC5952 seca e ART101.3 seca apresentaram umidade igual ao pão controle ($p > 0,5$) (Tabela 1). O pão produzido com a levedura SC5952 fresca apresentou teor de umidade maior (aprox. 5%) comparada ao pão controle.

A umidade dos pães, de acordo com Esteller e Lannes (2005) e Guerreiro (2006) deve estar dentro do limite máximo de 30%, com exceção dos pães que possuem recheio e coberturas. Segundo a RDC n° 90 (2000), a umidade do pão não deve ultrapassar 38%, considerando massas sem recheio ou cobertura. Assim, os pães produzidos apresentaram umidade dentro dos limites estabelecidos pela RDC n°90/2000 (BRASIL, 2000).

A determinação da umidade do pão está entre os principais parâmetros a serem analisados, pois tem íntima relação com a estabilidade, qualidade e composição. Umidade em excesso, combinada com outros fatores como a temperatura acelera a deterioração dos alimentos por atividade microbiológica, adicionalmente impacta de forma prejudicial na textura dos pães, leva à perda de crocância da crosta, aumento da dureza, tendência ao esfarelamento e modificações no aroma e sabor (ESTELLER e LANNES, 2005; PIMENTEL et al., 2011).

No estudo realizado por Esteller e Lannes (2005) foi observado que os pães de forma disponíveis no mercado apresentam volume específico médio de 4,10mL/g. O pão controle produzido no presente estudo apresentou volume específico igual a $4,02 \pm 0,18$ mL/g, sendo compatível com os pães de forma comercializados. No entanto, os pães produzidos com as leveduras selvagens ficaram abaixo deste valor (Tabela 1). Provavelmente o menor volume específico esteja relacionado com uma menor produção de gás carbônico. Marqués et al. (2007) relata que leveduras selvagens normalmente produzem menos gás carbônico do que as leveduras domésticas empregadas industrialmente, adicionalmente, costumam ser acidotolerantes e nem sempre são capazes de fermentar a maltose. As leveduras empregadas no presente trabalho foram previamente selecionadas (BIANCHINI, 2016) pela capacidade de assimilação e fermentação de maltose, bem como pela osmo e criotolerância, características desejáveis as leveduras de panificação.

Os pães produzidos com as leveduras secas apresentaram os menores volumes específicos (aprox. 4 vezes menor que o pão controle), provavelmente devido a danos sofridos durante o processo de secagem pelos microrganismos. Kets et al. (1996) e Barber et al. (1988) relataram que os microrganismos são afetados pelo processo de secagem, não somente no que tange a perda da viabilidade celular, sendo necessário compreender a resposta fisiológica dos

microrganismos durante o processo, uma vez que os mesmos podem perder características desejáveis, como, por exemplo, *Lactobacillus* que tem como principal parâmetro afetado pela liofilização a capacidade de produção de ácidos.

O volume específico de um pão está intimamente relacionado com o teor de sólidos existentes na massa e fração de ar na mesma. Quando o volume específico é muito baixo o pão possui aspecto desagradável ao consumidor e, normalmente, este é associado à alta umidade, mastigação dificultada, sabor impróprio, pouca aeração e baixa conservação. Ao passo que volume específico alto pode estar relacionado à fermentação excessiva, pouco sal, farinha com baixo teor de glúten ou maltose, baixa hidratação da massa, excesso de aditivos ou temperatura inadequada de cocção (FERREIRA, 2001; ESTELLER e LANNES, 2005; PIMENTEL et al 2011).

De acordo com Guerreiro (2006), a massa de pão não fermentada apresenta valores de pH próximos a 6,2 e sofre uma ligeira redução, visto que os ácidos formados pelas leveduras e o ácido carbônico são ácidos fracos, possuindo baixo grau de ionização. Os pães produzidos com as leveduras selvagens apresentaram pH próximos ao valor, relatado por Guerreiro (2006), da massa de pão não fermentada. Ao passo que o pão controle apresentou uma maior acidificação, apresentando o valor de pH mais baixo dentre os pães produzidos ($5,75 \pm 0,05$). Estes dados estão de acordo com a hipótese de que as leveduras selvagens produzem menos CO_2 , levando a um menor volume específico, conforme já discutido, e menor acidificação, visto que parte do CO_2 se dissolve em água produzindo ácido carbônico que contribui para a acidificação da massa de pão fermentada, juntamente com os ácidos produzidos durante a fermentação (VITTI, 2001; DE VUYST et al., 2016).

O pão produzido com a levedura ART101.3 fresca teve padrão de cor igual ao pão controle (Tabela 2) e compatível que os valores relatos por Esteller e Lannes (2005), para pão de forma comercial, nos parâmetros de luminosidade (*L) e coordenada de cromaticidade (*b: amarelo – azul). Os pães produzidos com a levedura SC5952 obtiveram padrão de cor mais destoante do pão controle.

Tabela 2 – Parâmetros de cor dos pães produzidos em comparação com a literatura

	Casca do pão		
	*L	*a	*b
SC5952 fresca	25,18±5,97 ^c	4,02±1,13 ^c	10,21±1,93 ^c
ART101.3 fresca	51,46±4,59 ^b	6,81±2,01 ^b	27,11±2,17 ^b
SC5952 seca	61,71±1,97 ^a	4,26±1,93 ^c	30,59±2,71 ^a
ART101.3 seca	65,34±2,42 ^a	2,73±1,09 ^c	28,67±1,86 ^{a,b}
Controle	48,11±4,23 ^b	10,58±1,50 ^a	29,38±1,59 ^{a,b}

Referência*	48,14±0,94	17,19±0,13	29,01±0,66
Miolo do pão			
	*L	*a	*b
SC5952 fresca	28,15±4,33 ^d	0,12±0,11 ^c	6,43±0,88 ^d
ART101.3 fresca	53,39±3,78 ^{a,b}	-0,06±0,16 ^c	13,45±0,84 ^c
SC5952 seca	47,61±4,70 ^{b,c}	0,97±0,23 ^a	18,85±1,84 ^a
ART101.3 seca	46,67±1,70 ^c	0,63±0,26 ^b	16,84±0,47 ^b
Controle	56,54±4,14 ^a	-1,16±0,17 ^d	13,78±0,88 ^c
Referência*	62,32±2,05	1,14±0,07	10,88±0,63

* Estudo de ESTELLER E LANNES (2005) tendo como objeto de estudo o pão de forma. Letras iguais na mesma coluna: não há diferença entre os valores segundo Teste de Tukey com significância de 5%.

A cor dos produtos de panificação é um parâmetro de extrema relevância, visto que pães com crostas muito claras ou muito escuras normalmente estão associados à falha no processamento. Com exceção dos pães “flat bread” – pão sírio, pita, pizzas e esfihas - que são assados em temperaturas superiores; a temperatura de cocção dos pães situa-se dentro do intervalo de 190 a 250°C. Pães com coloração clara, pouca quantidade de açúcar ou com a presença de farinha na casca, apresentam maior reflectância da luz, que são traduzidos em maiores valores de L. Os pães com crosta mais escura e grandes quantidades de açúcar apresentam maiores valores de a. Ao passo que altos valores de b estão normalmente associados a pães com coloração amarelada ou dourada, ricos em proteínas, açúcares redutores e ovos (ESTELLER e LANNES, 2005).

As variações nos valores de *a e *b podem estar associados com o grau de porosidade da massa, o tipo e intensidade da luz incidente sobre a superfície do pão, bem como, principalmente na coloração do miolo, as interações entre os ingredientes ativados pelo calor, a umidade, a acidez do pão e a qualidade da farinha utilizada (FERREIRA et al, 2001; ESTELLER e LANNES, 2005).

De acordo com a RDC n°12 (BRASIL, 2001), o padrão microbiológico para pão sem recheio e sem cobertura e produtos de panificação é: 1) Coliformes – No máximo 10² UFC/g e 2) *Salmonella* – Ausente. No entanto, de acordo com o dossiê técnico de panificação (GUERREIRO, 2006) os parâmetros microbiológicos para pão são: 1) Coliformes – Ausentes. 2) Bolores e leveduras – No máximo 5x10³ UFC/g; 3) *Salmonella* – Ausente; 4) *Clostrídios sulfitos redutores* – Ausente; 5) *Staphylococcus aureus* NMP (máximo) – 10³ UFC/g. No presente trabalho fez-se análise microbiológica para investigação de Coliformes, *Salmonella*, bolores e leveduras. Os pães obtidos obtiveram padrões microbiológicos dentro dos preconizados pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Análise dos compostos voláteis do pão

Após analisar os pães no CG-MS foi possível identificar 30 compostos voláteis diferentes (Tabela 3) das seguintes classes: alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, furanos, terpenos, pirazinas, alcanos e alquenos. A presença de decanal e decano, só foi observada no pão produzido com *Saccharomyces cerevisiae* selvagem (SC5952). O pão produzido com a levedura *Candida tropicalis* (ART101.3) apresentou 24 dos 30 compostos identificados, sendo que dos 24 compostos produzidos, sete não foram identificados no pão controle ou no pão produzido com *S. cerevisiae* selvagem (álcool benzílico, acetato de hexila, naftaleno, m-cimeno, α -tujene, β -pineno e dodecano). 2-acetilfurano, 5-metilfurfural e 2-etil, 5-metilpirazina foram detectados nos pães produzidos pelas leveduras selvagens, mas não no pão controle. Já no pão controle foram identificados 4 compostos que não estavam presentes nos pães produzidos com as leveduras selvagens, a saber: 2,4-decadienal, acetofenona, octanoato de etila e tetradecano.

Tabela 3- Relação dos compostos voláteis identificados nos pães elaborados com as leveduras frescas

Grupo químico	Substância	Odor*	IR lit.**	IR exp***	CG-MS %	Controle	SC5952	ART101.3
Alcoóis	Etanol	Forte, álcool, etéreo, medicinal	427 ¹ ; 448 ⁶	---	25,01 ^a 22,61 ^b 9,39 ^c 30,91 ^a	X	X	X
	1-Butanol, 3-methyl-	Balsâmico, alcoólico	731	---	18,02 ^b 12,13 ^c 2,02 ^a	X	X	X
	1-Hexanol	Floral, grama verde	863; 874 ⁷ ; 886 ¹⁰	877	3,90 ^b 5,17 ^c	X	X	X
	Phenylethyl Alcohol	Floral	1109 ⁵	1108	1,26 ^a 1,37 ^b	X	X	
	Benzenemethanol (Benzyl alcohol)	Floral, rosa, fenólico, vinagre	1026 ⁹	1032	0,84 ^c			X
Aldeídos	Hexanal	Grama verde, fresco	812 ²	829	2,66 ² 2,22 ³ 3,29 ^a	X	X	X
	Benzaldehyde	Amêndoa	952	955	1,68 ^b 1,51 ^c 0,45 ^a	X	X	X
	Benzeneacetaldehyde	Doce, floral, cacau, ceroso, verde	1036	1040	1,01 ^b 1,12 ^c	X	X	X
	Nonanal	Fruta, sabonete, cítrico	1100	1104	1,31 ^a 1,82 ^c 0,39 ^a	X		X
	2-Nonenal, (E)-	Gordura, pepino, verde	1157	1159	0,46 ^b 0,45 ^c	X	X	X
	Decanal	Sabonete, casca de laranja, doce	1201	1206	0,12 ^b		X	
Cetonas	2,4-Decadienal	Gordura, sebo	1315	1314	0,14 ^a	X		
	Acetophenone	Floral, amêndoa	1059	1062	0,36 ^a	X		
Ésteres	Acetic acid, hexyl Ester (Hexyl acetate)	Fruta, verde, doce, maçã, banana.	1007	1015	1,78 ^c			X
	Octanoic acid, ethyl Ester (Ethyl octanoate)	Frutado, vinho, ceroso, damasco, pêra	1196	1200	0,71 ^a	X		
Benzenos	Styrene	Doce, floral, plástico	890 ⁸	891	2,05 ^a 1,14 ^c	X		X
	Naphthalene		1178	1174	0,29 ^c			X
Terpenos	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	Fresco, especiarias, amadeirado, cítrico.	1020	1021	0,31 ^c			X

(m-Cymene)								
Limonene	Cítrico, limão, hortelã, cânfora	1024	1025	4,13 ^a 0,85 ^b 12,04 ^c	X	X	X	
α -Thujene		924	929	1,13 ^c				X
β -Pinene	Fresco, Cânfora, doce, verde, amadeirado, terroso	974	970	2,78 ^c				X
γ -Terpinene		1054	1056	1,40 ^a 4,33 ^c	X			X
Furanos				4,91 ^a 10,27 ^b 9,30 ^c	X	X		X
Furfural	Pão, amêndoa, doce	828	848	0,82 ^a 1,67 ^b 1,51 ^c	X	X		X
2-Furanmethanol	Óleo quente, queimado	864 ³	867	1,66 ^b 1,52 ^c		X		X
Ethanone,1-(2-furanyl)-(2-acetyl-furan)		909	911	3,95 ^b 3,00 ^c		X		X
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-(5-methylfurfural)	Picante, caramelo, amêndoa	957	961	1,66 ^b 1,52 ^c		X		X
Furan, 2-pentyl-	Fruta, flor, terroso, feijão, metálico	984	991	1,03 ^a 1,80 ^b 2,99 ^c	X	X		X
Pirazina				0,60 ^b 0,26 ^c		X		X
Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	Café, feijão, noz	1001 ⁴	1002					
Alcanos e alquenos				2,29 ^b		X		
Decane		1100	1103					
Dodecane		1200	1200	0,21 ^c				X
Tetradecane		1400	1400	0,49 ^a	X			

a – Controle; b- SC5952; c – ART101.3

* ASLANKOOHI et al. (2016); BIRCH et al. (2014); PÉTEL et al. (2017)

*** = Índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

1= Nist- webbook: Shoemakers, P.J.; Oomen, J.L.M.M.; Blomberg, J.; Genuit, W.; van Velzen, G., Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures, J. Chromatogr. A, 2000, 892, 1-2, 29-46, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00744-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00744-5)

2= Nist- webbook: Cho, I.H.; Namgung, H.-J.; Choi, H.-K.; Kim, Y.-S., Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.), Food Chem., 2008, 106, 1, 71-76, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.047>

3= Nist- webbook: Bonaiti, C.; Irlinger, F.; Spinnler, HE; Engel, E., Um procedimento sensorial iterativo para selecionar associações ativas ao odor em consórcios complexos de microrganismos: aplicação na construção de um modelo de queijo, J. Dairy Sci., 2005, 88, 5, 1671-1684, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72839-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72839-3).

4= Nist- webbook: Wan Aida, WM; Ho, CW; Maskat, MEU; Osman, H., Relacionando análise sensorial descritiva à cromatografia gasosa / espectrometria de massa de açúcares de palma usando regressão parcial de mínimos quadrados, ASEAN Food J., 2008, 15, 1, 35-45.

5= Nist- webbook: Kim, T.H.; Shin, J.H.; Baek, H.H.; Lee, H.J., Volatile flavour compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* Kuntze (Korean mint), J. Sci. Food Agric., 2001, 81, 6, 569-575, <https://doi.org/10.1002/jsfa.845>.

6= Nist- webbook: Kotowska, U.; Zalikowski, M.; Análise de Isidorov, VA, HS-SPME / GC-MS de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis emitidos pelo lodo de esgoto municipal, Environ. Monit. Jumentos., 2012, 184, 5, 2893-2907, <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2158-8>.

7= Nist- webbook: Weissbecker, B.; Holighaus, G.; Schütz, S., Cromatografia gasosa com detecção espectrométrica e eletroantegráfica de massa: análise de odores de madeira por acoplamento direto de olfação e espectrometria de massa de insetos, J. Chromatogr. A, 2004, 1056, 1-2, 209-216, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.120>.

8= Nist- webbook: Pino, JA; Mesa, J.; Muñoz, Y.; Martí, MP; Marbot, R., Componentes voláteis de cultivares de manga (*Mangifera indica* L.), J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 6, 2213-2223, <https://doi.org/10.1021/jf0402633>.

9= Nist- webbook: Zhao CX; Li, XN; Liang YZ; Fang HZ; Huang LF; Guo FQ, Análise comparativa de componentes químicos de óleos essenciais de diferentes amostras de rododendro com a ajuda de métodos quimiométricos, Chemom. Intell. Lab. Syst., 2006, 82, 1-2, 218-228, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.08.008>.

10= Nist- webbook: Ansorena, D.; Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J., Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona, Food Res. Int., 2001, 34, 1, 67-75, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00133-2).

A qualidade de um pão normalmente é definida por seu volume, textura, cor e sabor. Mas a combinação de sabor e aroma é, sem dúvida, o mais importante atributo no que diz respeito ao consumo de pães e sua aceitabilidade pelos consumidores. Diferenças entre o perfil de compostos voláteis (*headspace*) de pães é resultante dos diferentes ingredientes

utilizados, condições de fermentação (como tempo e temperatura), condições de cozimento, métodos de preparação do pão e da amostra para análise de compostos voláteis, bem como utilização de diferentes microrganismos, quantidade empregada e atividade de água; assim alterando-se o ambiente de fermentação consegue-se alterar de maneira conveniente a produção de aromas por leveduras, sem a necessidade de procedimentos biotecnológicos mais complexos (YING, et al., 2012; BIRCH et al., 2014; ASLANKOOHI et al., 2016; PÉTEL et al., 2017; STRUYF et al., 2017).

As leveduras produzem inicialmente compostos químicos de sabor, mas os compostos aromáticos também possuem importância fisiológica para as leveduras, recentemente, as pesquisas elucidaram que compostos aromáticos atuam como reguladores de crescimento fúngico, na comunicação entre células e colônias de leveduras e sinalizadores a vetores animais, como exemplo, temos a atração de insetos por frutos sendo mediada por compostos voláteis produzidos pelas leveduras e não pelo próprio fruto (DZIALO et al., 2017).

O aroma do miolo do pão é formado principalmente pela atividade fermentativa da levedura de padeiro e a oxidação dos lipídios da farinha. Já o aroma da crosta do pão está diretamente relacionado com a reação de Maillard durante a cocção do pão. Assim, alterações no fermento impactam no aroma do miolo do pão e podem ser uma ferramenta para auxiliar os padeiros na criação de novos perfis sensoriais para o pão (BIRCH et al., 2014).

Mais de 540 compostos já foram descritos como parte do complexo aromático de pães, destes, compostos das classes dos alcoóis, aldeídos, ésteres, cetonas, ácidos, pirazinas e pirrolinas são os que têm se destacado (YING, et al., 2012). A maior parte destas classes de compostos orgânicos foram detectadas nos pães produzidos com as leveduras selvagens estudadas no presente trabalho, tendo-se como exceção os ácidos carboxílicos e as pirrolinas.

O etanol é um dos mais importantes metabólitos produzidos por leveduras, sendo este o composto que em primeira instância despertou o interesse para os processos fermentativos. No que tange aos produtos de panificação, o etanol é responsável por melhorar a digestibilidade, prolongar o prazo de validade e é um composto aromático. Durante a cocção, atua principalmente na extensibilidade da massa e na aglomeração da rede de glúten (DZIALO et al., 2017). Birch et al. (2014) afirma que o etanol, apesar de ser formado em grandes concentrações, por ser uma molécula polar pequena, é evaporado durante o cozimento. Ao passo que De Vuyst et al. (2016) aponta o etanol como um dos principais responsáveis pelo aroma característico do pão e, adicionalmente, contribui para a expansão da massa durante a cocção. No presente trabalho o etanol e o 3-metil-1-butanol foram os compostos aromáticos encontrados em maior percentual.

Os metabólitos secundários produzidos pelas leveduras através da via de Ehrlich por meio da desaminação e descarboxilação de aminoácidos, tais como alcoóis superiores, aldeídos e ésteres, também exercem importante papel no aroma e sabor do pão. Em miolo de pão o 3-metil-1-butanol, álcool feniletílico (2-feniletanol), 2(E)-nonenal, hexanal, nonanal, 2,4-decadienal estão entre os alcoóis e aldeídos mais influentes no que se refere ao aroma (BIRCH et al., 2014; DE VUYST et al., 2016).

Benzaldeído e 2-pentil furano, encontrado nos três pães, são provenientes da degradação lipídica e atividade fermentativa. Adicionalmente, o 2-pentil furano é relatado como o furano mais importante do pão, sendo também produzido nas reações de Maillard (ASLANKOOHI et al., 2016).

Naftaleno, m-cimeno, α -tujene e β -pineno são compostos aromáticos normalmente associados a folhas e óleos vegetais, sendo estes compostos identificados somente no pão produzido com a levedura ART101.3, mostrando sua capacidade de agregar aromas ao pão contribuindo para a complexidade sensorial do mesmo.

Estudos como este buscam agregar na indústria de panificação, tanto no que diz respeito aos parâmetros de qualidade e identidade de pães, quanto à busca por novas culturas iniciadoras e protocolos de avaliação de microrganismos com potencial de serem usados em processos de panificação.

Conclusão

Ainda existe uma lacuna no que se refere aos padrões de identidade e qualidade de pães, necessários para uma melhor avaliação dos produtos produzidos, comercializados e também para servir de base ao desenvolvimento de novos produtos.

Após emprego das leveduras selvagens em pães e análises físico-químicas dos mesmos, observou-se que a levedura ART101.3 possui características interessantes para compor fermentos empregados em panificação, uma vez que foi capaz de produzir pães com coloração semelhante ao pão controle, umidade dentro dos padrões estabelecido pela legislação, não é produtora de aminas biogênicas e, adicionalmente, possui capacidade de produção de uma ampla gama de compostos voláteis que pode gerar um melhor aroma ao pão. Tendo potencial de substituir ou ser empregada juntamente com *S. cerevisiae* para produzir pães com maior complexidade sensorial.

Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured: Carol Stream, 2007. 804 p.

ASLANKOOHI, E.; HERRERA-MALAVAR, B.; REZAEL, M. N.; STEENSELS, J.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Non-conventional yeasts strains increase the aroma complexity of bread. **PLOS ONE**. Outubro de 2016.

BARBER, S.; TORNER, M. J.; MARTINEZ-ANAYA, M. A.; BARBER, B. Microflora de la massa madre panaria. VI Efectos de La liofilización sobre La viabilidad y propiedades funcionales de lactobacilos de La fermentación panaria. **Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.** v. 28, n. 1, p. 79-89,1988.

BIANCHINI, B. M. **Avaliação do potencial de leveduras selvagens, isoladas de frutos e casca de árvore do cerrado, para aplicação em processos de panificação**. 2016. 58f. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Fundação Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2016.

BIO-RAD. Pulsed field electrophoreses systems: instructions manual and application guide. United States of America: **Bio-rad Laboratories**, (catalog numbers 170-3612 through 170-3729), 1992.

BIRCH, A. N.; PETERSEN, M. A.; HANSEN, A. S. Aroma of wheat bread crumb. **Cereal Chemistry**. v. 91, n. 2, p.105-114. 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2000.

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

DZIALO, M. C.; PARK, R.; STEENSELS, J.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**. V. 41, p. S95 – S128. 2017.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. da S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 802-806. 2005.

FERREIRA, S. M. R.; OLIVEIRA, P. V. de; PRETTO, D. Parâmetros de qualidade do pão francês. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v. 19, n. 2, p. 301-318. 2001.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciência e saúde coletiva**. v. 19, n. 4, p. 1123-1134. 2014.

GUERREIRO, L. **Dossiê Técnico: Panificação**. p. 34. 2006.

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

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of different beer yeasts on wheat dough and bread quality. **Journal of Cereal Science**. v.63, p. 49-56. 2015.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. Impacto of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 7, p. 1152-1164. 2018.

KETS, E. P. W.; TEUNISSEN, P. J. M.; BONT, J. A. M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 259-261. 1996.

PIMENTEL, C. M.; BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; PEREIRA, S. M de F. Avaliação da qualidade dos pães para hambúrguer fabricados em Campos dos Goytacazes –RJ. **Perspectivas online**. v. 1, n. 2, p. 18-25. 2011.

RIZZELLO, C. G.; CALASSO, M. CAMPANELLA, D. ANGELIS, M. de; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread Intern. **Journal of Food Microbiology**. v. 180, p. 78-87. 2014.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Logomarca Varela, 3º Ed. São Paulo, 2007.

STRUYF, N. MAELEN, E. V. der; HEMDANE, S. VERSPREET, J.; VERSTREPEN, K. J.; COURTIN, C. M. Bread dough and baker's yeast: Na uplifting synergy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 16, p. 850-867. 2017.

VAN DEN DOOL, H. & KRATZ, P. D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11: 463-471, 1963.

VARELA, C. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 100, p. 9861-9874. 2016.

YING, S.; LASEKAN, O.; NAIDU, K. R. M.; LASEKAN, S. Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Olfactometry Analysis of Volatile Compounds in Pineapple Breads. **Molecules**. v. 17, p. 13795-13812. 2012.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições do presente estudo pode-se inferir que:

- 1) O crescimento em biorreator, conforme esperado, aumentou a produção de biomassa e diminuiu, pela metade, o tempo de geração das leveduras, no entanto otimização dos parâmetros de cultivo podem resultar em maior crescimento e melhores parâmetros cinéticos;
- 2) As leveduras investigadas possuem potencial de serem aplicadas em processos industriais de produção de cultura iniciadora, visto que possuem parâmetros cinéticos compatíveis com outras leveduras comerciais;
- 3) O pão produzido com a levedura comercial possui parâmetros físico-químicos e microbiológicos dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente;
- 4) As leveduras não são produtoras de amins biogênicas, sendo este um dos parâmetros avaliados para torná-las seguras e próprias para a utilização na indústria de alimentos;
- 5) A levedura ART101.3 possui capacidade de produzir uma gama de compostos voláteis diferentes da levedura controle, o que pode resultar em pães com maior complexidade sensorial, o que é interessante do ponto de vista industrial e tecnológico;
- 6) A liofilização mostrou-se um método adequado para a preservação da viabilidade celular, no entanto, afetou a capacidade de produção de gás carbônico e ácidos orgânicos, podendo-se avaliar a utilização de diferentes crioprotetores para a preservação das características desejáveis. No entanto, este não é um gargalo para a utilização das leveduras como cultura iniciadora, visto que grande parte do fermento utilizado atualmente na indústria de panificação são as leveduras úmidas.

REFERÊNCIAS

- ABIP - Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria. **Qual a origem das padarias?**, 2015. Disponível em: <<http://www.abip.org.br/site/qual-a-origem-das-padarias/>>. Acesso em: 01 ago. 2016.
- ABIP – Associação Brasileira da Indústria de panificação e Confeitaria. **Balanco e tendências do mercado de panificação e confeitaria**. 2018.
- ALMEIDA, C. P. de; ROCHA, J. C.; CARITÁ, J. S.; SOUZA, T. M. de A.; SOUZA, P. V dos S. **Biologia na produção de alimentos**. Universidade de São Paulo. 2011.
- ARAÚJO, H. M, C.; RAMOS, K. L.; MONTEBELLO, N. di P.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P.; GINANI, V. C.; ARAÚJO, W. M. C. Transformação dos alimentos: Cereais e Leguminosas. In: ARAÚJO, H. M, C.; MONTEBELLO, N. di P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGO, L. A. **Alquimia dos Alimentos**. 3ed., Brasília: SENAC, p. 179 -209. 2015.
- ARRUDA, I. N. Q. de; JÚNIOR, V. A. P.; GOULART, G. A. S. Produção de cerveja com adição de polpa de muruci (*Byrsonimassp.*). **Revista Eletrônica da Univar**. n. 10, v. 2, p. 129-136. 2013.
- ASLANKOOHI, E.; HERRERA-MALAVAR, B.; REZAEL, M. N.; STEENSELS, J.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Non-conventional yeasts strains increase the aroma complexity of bread. **PLOS ONE**. Outubro de 2016.
- BIANCHINI, B. M. **Avaliação do potencial de leveduras selvagens, isoladas de frutos e casca de árvore do cerrado, para aplicação em processos de panificação**. 2016. 58f. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Fundação Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2016.
- BORGHT, A. V. D.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved, **Journal of Cereal Science**. v. 41, p. 221-237. 2005.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.
- CARVALHO, I. T. de; **Microbiologia básica**. EDUFRPE, 2010.
- DE VUYST, L.; HARTH, H.; KERREBROECK, S. V.; LEROY, F. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. **International Journal of Food Microbiology**. 2016.
- GUERREIRO, L. **Dossiê Técnico: Panificação**. p. 34. 2006.
- HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of different beer yeasts on wheat dough and bread quality. **Journal of Cereal Science**. v.63, p. 49-56. 2015.

HEITMANN 2018

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAMBUSCAY, M. L. A; LÓPEZ, A. W. A; CUERVO, M. R. A; ARGOTE, V. F. E; CADAVID, E. O. Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**. Ed. Especial. n. 2, p. 136-144,. 2013.

MARQUÉS, C. J. B.; ALBIÑANA, M. L. L.; LACUEVA, C. P. La masa madre: El secreto del pan. **Alimentaria**. v. 380, p. 51-62. 2007.

MARTINBIANCO, F.; MARTINS, A. R.; RECH, R.; FLÔRES, S. H.; AYUB, A. Z. Avaliação sensorial de pães de fermentação natural a partir de culturas starters inovadoras. **Ciência Rural**. v. 43, n. 9, p. 1701-1706. 2013.

MESSIA, M.C.; REALE, A.; MAIURO, L.; CANDIGLIOTA, T.; SORRENTINO, E.; MARCONI, E. Effects of pre-fermented wheat bran on dough and Bread characteristics. **Journal of Cereal Science**. v. 69, p. 138-144. 2016.

MORANDI, P. S.; MARIMON, B. S.; MARIMON JUNIOR, B. H.; RATTER, J. A.; FELDPAUSCH, T. R.; COLLI, G. R.; et al. Tree diversity and above-ground biomass in the South America Cerrado biome and their conservation implications. **Biodiversity and Conservation**. 2018.

PIMENTEL, C. M.; BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; PEREIRA, S. M de F. Avaliação da qualidade dos pães para hambúrguer fabricados em Campos dos Goytacazes –RJ. **Perspectivas online**. v. 1, n. 2, p. 18-25. 2011.

RAMOS, M. **O pão nosso de cada dia**. [1995 e 1999]. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/>>. Acesso em : 10 ago. 2016.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 5, n. 3, p. 253-260. 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol 2. Editora Edgard Blücher. 2001.

SDE – Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo de Goiás. **Caderno Didático: Panificação**. 2017.

SEBESS, P. **Técnicas de Padaria Profissional**. Editora: SENAC, Rio de Janeiro: 2014.

SEBRAE – Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudo de Mercado: Indústria de panificação**. 2017.

SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**. v. 38, n. 6, p. 1790-1793. 2008.

STRUYF, N. MAELEN, E. V. der; HEMDANE, S. VERSPREET, J.; VERSTREPEN, K. J.; COURTIN, C. M. Bread dough and baker's yeast: Na uplifting synergy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 16, p. 850-867. 2017.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. J.; MURUDKAR, P.R. Effect of yeast concentration and baking temperature on quality of slice bread. **Journal of Food Research and Technology**. v. 3, n. 4, p. 131-141. 2015.

UHLMANN. A.; GALVÃO, F.; SILVA, S. M. Análise da estrutura de duas unidades fitofisionômicas de savana (Cerrado) no sul do Brasil. **Acta Bot. Bras.** v. 13, n. 3, p. 231-147. 1998.

FARINHA, M. J. U. S.; BERNADO, L. V. M.; SOARES FILHO, A.; BEREZUK, A. G.; SILVA, L. F. da; RUVIARO, C. F. Opportunity cost of a private reserve of natural heritage, Cerrado biome – Brazil. **Land Use Policy**. v. 81, p. 49-57. 2019.

RANI, K. U.; RAO, U. J. S. P.; LEELAVATHI, K.; RAO, P. H. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. **Journal of Cereal Science**. v. 34, p. 233-242. 2001.

VILANOVA, M. G.; DÍEZ, C.; QUIRINO, B.; ÁLAVA, J. I. Microbiota distribution in sourdough: Influence of high sucrose resistant strains. **International Journal of Gastronomy and Food Science**. v. 2, p. 98-102. 2015.

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Biotecnologia industrial, vol4, Ed. Edgar Blucher, p. 365-386, 2001.

ZANETTI, B.; SCHMITZ, F.; APLEVICZ, K.; SCHEUER, P. M. **Apostila de Panificação**. 2009.