

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Mariana Lenzi Nodari

Elaboração de um *Levain* Comercial a Partir de Leveduras Obtidas de Frutas Orgânicas

2014

Mariana Lenzi Nodari

Elaboração de um *Levain* Comercial a Partir de Leveduras Obtidas de Frutas Orgânicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jeverson Frazzon

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Nodari, Mariana Lenzi

Elaboração de um Levain Comercial a partir de
Leveduras Obtidas de Frutas Orgânicas / Mariana Lenzi
Nodari. -- 2014.

62 f.

Orientador: Jeverson Frazzon.

Coorientadora: Roberta Cruz Silveira Thys.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. panificação. 2. fermentação natural. 3.
leveduras. 4. levain. 5. planejamento de misturas.
I. Frazzon, Jeverson, orient. II. Thys, Roberta Cruz
Silveira, coorient. III. Título.

Mariana Lenzi Nodari
Engenheira de Alimentos – Universidade do Vale do Rio Dos Sinos – UNISINOS

DISSERTAÇÃO

Submetida como um dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora.

Homologada em:
Por:

Prof. Dr. Jeverson Frazzon
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Roberta Thys
Co-orientadora – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub
Coordenador do Programa de Pós- graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA

Banca: Prof. Dr. Caciano Noreña
PPGCTA/UFRGS

Banca: Profa. Dra. Carolina Kechinski
UFCSPA

Prof. Dr. Vitor Mafroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos (ICTA/UFRGS)

Banca: Profa. Dra. Myriam de Las Mercedes Sallas Mellado
FURG

Porto Alegre
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu orientador Jeverson Frazzon, pela paciência, amizade, compreensão, ensinamentos transmitidos e pelas várias receitas e dicas culinárias trocadas.

A minha co-orientadora Roberta Thys, pela dedicação, incentivo, atenção, amizade e lembrança para ministrar as aulas de panificação.

Aos meus pais pelo incentivo e empenho nesta minha caminhada. Muito obrigada por tudo que me ensinaram, pelo amor e carinho que fez com que tudo isso fosse possível.

As minhas irmãs, que sempre quando precisei, estavam perto mesmo estando longe, me dando força, incentivo e muito carinho.

As colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos Luiza e Roberta, pela troca de conhecimentos, experiências e pela inigualável amizade. A Beta, em especial por sempre me dar a força que por vezes faltou e por falar aquilo que precisava escutar nos momentos certos.

A Elena, que me ajudou com as referências, com os dogs e que sempre que precisei esteve ao meu lado para dar ânimo e um novo fôlego até a finalização deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Marisa da Costa, pela ajuda com a liofilização de minhas amostras e a Prof^a Ana Cláudia Franco e ao Fabrício do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pela utilização do ultracongelador.

A Granotec do Brasil, especialmente a Fernanda Siqueira e Lílian Paz pelo imenso auxílio na realização das análises de Reofermentografia.

A Prof^a Helen Treichel pela disponibilidade no auxílio da análise estatística do planejamento de misturas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Resumo	8
Abstract	9
Capítulo I	10
1. Introdução	11
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 Leveduras.....	13
2.1.1 Características gerais	13
2.1.2 Importância econômica das leveduras.....	15
2.2 O Pão e suas particularidades.....	17
2.3 Fermentação natural ou espontânea.....	23
2.3.1 Reofermentografia.....	25
2.4 A importância dos produtos orgânicos no mundo.....	26
2.5 Planejamento de misturas.....	28
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivos gerais.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
Capítulo II	30
Resultados	31
Isolamento e Seleção de Leveduras de frutas orgânicas para a Elaboração de <i>Levain</i> Comercial	32
Capítulo III	54
Considerações finais	55
Referencias bibliográficas	56

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1:** Estrutura do glúten: gliadina e glutenina.....18
- Figura 2:** Diferenças físicas apresentadas pela glutenina pura (direita), gliadina pura (centro), e pelo glúten (esquerda), após hidratação.18
- Figura 3:** Representação da gelatinização do amido.....20
- Figura 4:** Rota glicolítica envolvida na reação de diversos microrganismos e seus produtos.....21
- Figura 5:** Gráfico resposta análise Reofermentômetro F3.....26
- Figura 6:** Distribuição dos pontos experimentais em um *simplex*.....28

Capítulo II

- Figura 1:** Sobrevivência das leveduras liofilizados em log UFC/ g.....42
- Figura 2:** Diagrama triangular dos parâmetros (a) parâmetro L* (cor), (b) textura da crosta e (c) textura do miolo, resultantes do delineamento experimental.....49
- Figura 3:** Diagrama triangular dos parâmetros (a) espessura da crosta superior e (b) espessura da crosta inferior, resultantes do delineamento experimental.....50

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Fração mássica dos componentes Levedura X1, Levedura X2 e Levedura X3 que compõem o delineamento da mistura Simplex-centroide.....39

Tabela 2: Volumes de CO₂ gerados pelas leveduras analisadas em reofermentógrafo.....43

Tabela 3: Volume específico dos pães produzidos com 3% de cada levedura analisada.....44

Tabela 4: Volume específico, cor (L*), textura da crosta e miolo e espessura da crosta dos pães produzidos com as leveduras N5, N6 e N7, nas concentrações de 2, 4 e 6%.....45

Tabela 5: Média e desvio padrão resultantes do delineamento Simplex-Centróide, utilizado para avaliar o efeito das leveduras X1, X2 e X3 sobre o volume específico, cor (L*), textura da crosta, textura do miolo e espessura da crosta.....47

Tabela 6: Média e desvio padrão resultantes do delineamento Simplex-Centróide, utilizado para avaliar o efeito das leveduras X1, X2 e X3 sobre o volume específico.....48

RESUMO

De grande importância para o preparo dos produtos panificáveis, a levedura utilizada na panificação ganhou relevante interesse comercial e tecnológico nos últimos anos, através de produtos elaborados com fermentação natural. Este fermento é um sistema natural formado por leveduras e bactérias lácticas, que convivem numa associação complexa, gerando um fermento natural que pode ser desenvolvido por fermentação espontânea ou iniciado através da adição de cultura *starter*. O objetivo principal deste estudo foi isolar, selecionar e liofilizar leveduras de frutas orgânicas a fim de obter uma alternativa mais prática e rápida à produção de pão francês de fermentação natural (*levain*). Foram isoladas 7 leveduras de frutas orgânicas e destas, 3 foram selecionadas por apresentarem maior volume específico nos pães formulados (X1, maçã gala, X2, figo roxo e X3, uva moscato). Foi realizado planejamento de misturas envolvendo as 3 leveduras selecionadas em porcentagens pré-determinadas e as análises realizadas foram o volume específico, cor, textura da crosta e do miolo e espessura da crosta. As leveduras apresentaram boa estabilidade após a liofilização, sendo que a levedura N5 (maçã gala) obteve a menor porcentagem de redução microbiana. Para a análise de cor, os pães elaborados com a mistura ternária (X1, X2, X3) e a mistura binária com as frações X1 e X3 corresponderam a melhor resposta. Para a textura da crosta, os melhores resultados foram obtidos para a mistura binária de X2 e X3 e para a textura do miolo os melhores resultados foram verificados para a fração unitária da levedura X1 e para a mistura ternária (X1, X2, X3). A fração unitária da levedura X1 e a mistura binária entre X1 e X3 e X2 e X3 representam os melhores resultados para a espessura da crosta. Conclui-se com o presente estudo que é possível a utilização de leveduras isoladas a partir de frutas orgânicas formando um *levain* natural comercial, para a elaboração de pães com características similares aos elaborados através de fermentação natural, entretanto, de forma mais prática e rápida.

Palavras-chave: panificação, fermentação natural, *levain*, planejamento de misturas.

ABSTRACT

Having great importance to the preparation of bread products, the yeast used in bread making has gained significant commercial and technological interest in recent years through products made from natural fermentation. This yeast is a natural system formed by yeasts and lactic acid bacteria, which inhabit a complex association, creating natural yeast that can be developed by spontaneous fermentation or initiated by the addition of a starter culture. The main objective of this study was to isolate, select and freeze-dry yeast made with organic fruit in order to get a more practical and rapid alternative to the production of natural fermentation (*levain*) french bread. For this, 7 organic fruit yeasts were isolated, and 3 of those were selected for having higher specific volume in the breads that were prepared (X1, Gala apple, X2 purple fig, X3, moscato grape). Also, mixture plans were made, involving the 3 selected yeasts in pre-determined percentages, and the analysis performed was related to specific volume, color, texture of crust and crumb and crust thickness. The yeasts showed good stability after freeze-drying, and the yeast N5 (Gala apple) obtained the lowest percentage of microbial reduction. Regarding the color analysis, breads prepared with the ternary mixture (X1 , X2 , X3) and the binary mixture with the fractions X1 and X3 corresponded to the best answer. In relation to the texture of the crust, the best results were obtained by the binary mixture of X2 and X3, and the best results of crumb texture were observed in the yeast fraction of the unitary X1 and the ternary mixture (X1, X2, X3). The unitary fraction of the X1 yeast and the binary mixture between X1 and X3 and between X2 and X3 represented the best results regarding the thickness of the crust. In conclusion, this study shows that it is possible to use yeasts isolated from organic fruits to form a commercial natural *levain* for the preparation of breads with similar characteristics of those made through natural fermentation, in a faster and more practical way, though.

Keywords: baking, natural fermentation, *levain*, planning mixtures.

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

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

De grande importância para o preparo dos produtos panificáveis, a levedura utilizada para a panificação ganhou relevante interesse comercial e tecnológico nos últimos anos. Isso se deu principalmente devido ao desenvolvimento gerado pela biotecnologia, o que propiciou a redução do seu custo produtivo, assim como a maior facilidade no preparo dos pães, agregando qualidade, preço e acesso aos nutrientes. Entretanto, a busca pela oferta de um produto diferenciado leva muitos estabelecimentos do setor de panificação a utilizarem técnicas antigas de fermentação natural, passadas de geração em geração. Estas técnicas consistem em um sistema natural formado por leveduras e bactérias lácticas, que convivem numa associação complexa, gerando um fermento natural (APLEVICS, 2013).

Fermento natural é uma mistura de farinha de cereais composta por uma população heterogênea de bactérias lácticas e leveduras, desenvolvida por fermentação espontânea ou iniciada através da adição de cultura *starter*. (DE VUYST; NEYSENS, 2005; CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). Embora de forte apelo comercial devido à diversidade e singularidade dos produtos que origina, o fermento natural acarreta gastos extras para a sua manutenção, pois é necessário o emprego diário de mão de obra e insumos para a sua conservação, o que acaba por aumentar o custo do produto final (APLEVICZ, 2013). Além disso, os requerimentos necessários para manter um fermento natural acabam inviabilizando o seu uso.

Desta forma, o desenvolvimento de um fermento natural seco padronizado pode eliminar a manutenção diária do fermento natural fresco, visto que, segundo Bianchini (2004), a secagem o manterá ativo e sem alterações por mais tempo do que um fermento natural mantido refrigerado.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho visa o isolamento, a seleção e o cultivo de leveduras a partir de frutas orgânicas, sua estabilização através da secagem por liofilização e a posterior aplicação das mesmas no processamento de pães do tipo francês.

Este trabalho está dividido na forma de capítulos, com os seguintes tópicos: Capítulo I – Revisão Bibliográfica; Capítulo II – Artigo Isolamento e Seleção de Leveduras de frutas orgânicas para a Elaboração de Levain Natural Orgânico e Capítulo III – Considerações Finais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leveduras

2.1.1 Características gerais

Presentes em praticamente todos os habitats da terra, as leveduras são fundamentais em processos biológicos como: decomposição de vegetais e animais, fermentação de carboidratos e ciclo de nutrientes. Microrganismos heterotróficos, sapróbios e parasitas são encontrados associados aos vegetais, aos insetos, ao húmus e a maioria dos substratos fornecedores de açúcar. Algumas espécies são patogênicas às plantas, aos animais e ao homem. Em florestas tropicais, as leveduras que fermentam frutas possuem uma distribuição de acordo com os seus recursos alimentares (PHAFF, 1990; LACERDA, 2002). Características de crescimento, onde apenas poucos microrganismos podem desenvolver-se, além da sua existência em diferentes habitats, facilitam seu isolamento e sua manutenção em culturas (PHAFF & STAMER, 1987; LACERDA, 2002).

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Entretanto, a forma da levedura não é indício para a identificação de espécies, assim como a variedade de formas de um mesmo cultivo não é indício de contaminação. As leveduras não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Suas dimensões variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade, entre outros fatores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

De acordo com os mesmos autores, as leveduras se caracterizam por uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação. A esporulação em leveduras é um fator importante por constituir a base de um método de reprodução, desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. Quanto à sua composição química, as leveduras apresentam de 68% a 83% de água, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais.

Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos, os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados pela maioria das espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Mesmo que os açúcares sejam considerados como fonte de carbono, existe diferença entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; VIEIRA, 2011).

O conteúdo genético das leveduras encontra-se compartimentalizado em um núcleo bem definido, sendo a regulação da expressão gênica e os mecanismos de transcrição e tradução próprios de organismos eucariontes. Ainda, possuem cromossomos lineares com diferentes tamanhos, formados por cadeias de dupla fita de DNA associadas às histonas H2, H3 e H4 com ausência da H1 (PEREZ-ORTIN *et al.*, 1989; LACERDA, 2002). Segundo os mesmos autores, as leveduras podem existir nas formas diplóide ou haplóide. Nas células diplóides, enquanto as condições estiverem favoráveis, o ciclo vital das leveduras é vegetativo. A reprodução vegetativa ou assexuada ocorre por mitose, fase em que novas células são formadas a partir da célula mãe pelo

processo de brotamento ou fissão. No ciclo meiótico as leveduras se reproduzem sexuadamente por esporos endógenos (Ascósporos), contidos no interior da célula-mãe. Os ascósporos são geralmente em número de 4 a 8, variando de acordo com a espécie envolvida. O ciclo meiótico corre em condições de estresse como, por exemplo, na escassez de nutrientes.

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (WALT; YARROW, 1984; OLIVEIRA, 2009).

As populações mais densas de leveduras em ambientes naturais estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis, como flores, frutos, exsudados de árvores, etc. As espécies frequentemente isoladas a partir de flores e frutos são *Hanseniaspora uvarum*, o seu estado anamórfico *Kloeckera apiculata* e *Metshnikowia* spp., entre outras, vulgarmente de afinidade ascomiceta. Por vezes, as leveduras colonizadoras de flores e frutos ocorrem também em insetos, por exemplo; *Drosophila* spp., que poderá constituir vetores para a sua propagação. São exemplos *Ambrosiozyma* spp., *Candida entomophila* e *Candida insectarum* (FERNANDES, 2008).

2.1.2 Importância econômica das leveduras

O conhecimento empírico da fermentação por leveduras vem desde o período paleolítico. A capacidade destes microrganismos em produzir álcool na forma de cerveja já era conhecida pelos povos Babilônicos acerca de 6000 a. C.. Em 4000 a.C., os egípcios já conheciam empiricamente a capacidade das leveduras para a elaboração do pão, enquanto relatos sobre a fermentação do vinho podem ser encontrados no livro de Gênesis (DEMAIN; SOLOMON, 1981).

Quando a prática agrícola se estabeleceu, as colheitas eram processadas em bebidas e alimentos, onde as leveduras constituíam parte essencial do processo. Modelos de panificadoras e casas de fermentação estão registrados em papiros e esculturas do Antigo Egito (CORSETTI; SETTANNI, 2007).

Atualmente, as leveduras possuem diversas aplicações biotecnológicas e estão presentes na tecnologia ambiental como tratamentos e/ou remediação de resíduos como esgotos domésticos e lixo, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais. Outras utilizações práticas das leveduras são na destilação, indústrias de vinho e cerveja, produção de enzimas, aminoácidos, vitaminas e substâncias com fins terapêuticos, como hormônios, antibióticos e vacinas (REALE et al., 2013).

Segundo PRETORIUS; TOIT; RENSBURG (2003), a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irá continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação, em termos de tonelagem mundial por ano, isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (*SCP – single cell protein*) e 600.000 toneladas de fermento de pão.

Um estudo realizado por GIRAFFA (2004) relata que o consumo de alimentos fermentados vem aumentando desde 1970, onde se incluem alimentos como iogurtes, queijos, soro de leite, salsichas, bebidas fermentadas alcoólicas, vegetais, frutas, molhos, entre outros. Segundo o mesmo autor, um dos motivos do aumento do consumo é o fato dos mesmos serem considerados naturais e saudáveis.

Nos últimos anos, uma única espécie de levedura, a *S. cerevisiae*, tem sido o centro da investigação científica, tornando-se, desta forma, um sinônimo para o microrganismo designado de levedura. Este panorama tem mudado progressivamente e atualmente, uma grande diversidade deste grupo de microrganismos já é reconhecida (BARNETT et al., 2000, KURTZMAN, et al, 2011.). Espécies de leveduras não-*Saccharomyces* tornaram-se alvo da

atenção por diferentes razões. Alguns exemplos são: *Kluyveromyces lactis*, pela possibilidade de produção da lactase; *Yarrowia lipolitica*, pela sua capacidade de crescimento em alcanos; *Pichia pastoris*, pela sua capacidade de produção de proteína heterólogas; e leveduras com relevância clínica, como são o caso de *Candida albicans* e de *Cryptococcus neoformans*, como muitos outros (FLORES *et al.*, 2000, FERNANDES, 2008).

2.2 O Pão e suas particularidades

Segundo a Resolução RDC n.º 263 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2005) o pão “(...) é o produto obtido da farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionado de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto, e pode apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos”.

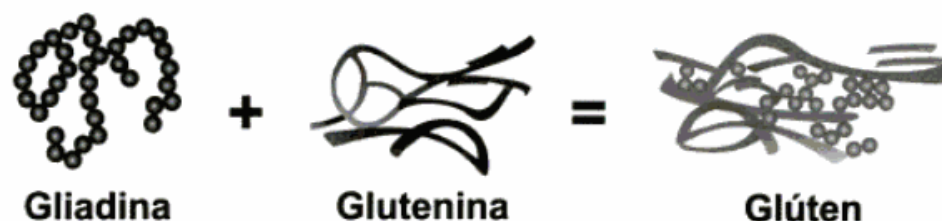
A composição mínima do pão, ou seja, os ingredientes essenciais para obtenção do pão são: farinha de trigo, água, sal e fermento biológico.

A farinha de trigo é definida como um produto obtido da moagem do grão de trigo *Triticum aestivum*, ou de outras espécies do gênero *Triticum* (exceto *Triticum durum*). É o componente estrutural da massa, e constitui o ingrediente fundamental para obtenção do pão. Suas proteínas, gliadina e glutenina apresentam características funcionais únicas, capazes de formar uma rede extensível e elástica, denominada glúten, responsável por reter o gás carbônico formado durante a fermentação dos produtos de panificação (OSÓRIO; WENDT, 1995).

O glúten não é um componente que faz parte diretamente da formulação de produtos de panificação. O glúten é formado quando a farinha de trigo, a água e os demais ingredientes do pão são misturados e sofrem a ação de um trabalho mecânico. À medida que a água começa a interagir com as proteínas insolúveis da farinha de trigo (glutenina e gliadina) a rede de glúten começa a ser formada (FIGURA 1). Sendo assim, o glúten é formado pela interação entre moléculas de gliadina e glutenina que, ao se hidratarem, formam uma rede. O interesse do glúten nos processos de panificação está basicamente ligado a

sua capacidade de dar extensibilidade e consistência a massa, além de reter o gás carbônico proveniente da fermentação, promovendo o aumento de volume desejado (OSÓRIO; WENDT, 1995).

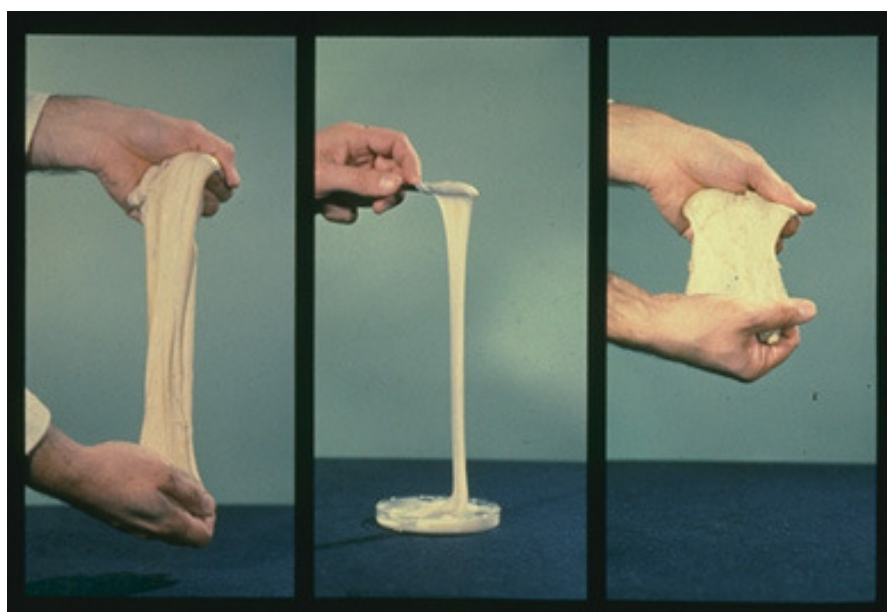
Figura 1. Estrutura do glúten: gliadina e glutenina



Fonte: (ARAÚJO et al., 2008)

A gliadina tem peso molecular na faixa de 25.000 a 100.000 U é caracterizada pela alta extensibilidade e baixa elasticidade, sendo solúvel em etanol 80%. Já a glutenina tem peso molecular de 40.000 a milhões de U, apresenta baixa extensibilidade e alta elasticidade e é solúvel em álcali ou ácido. (FIGURA 2) (EL-DASH et al., 1983).

Figura 2. Diferenças físicas apresentadas pela glutenina pura (direita), gliadina pura (centro), e pelo glúten (esquerda), após hidratação.



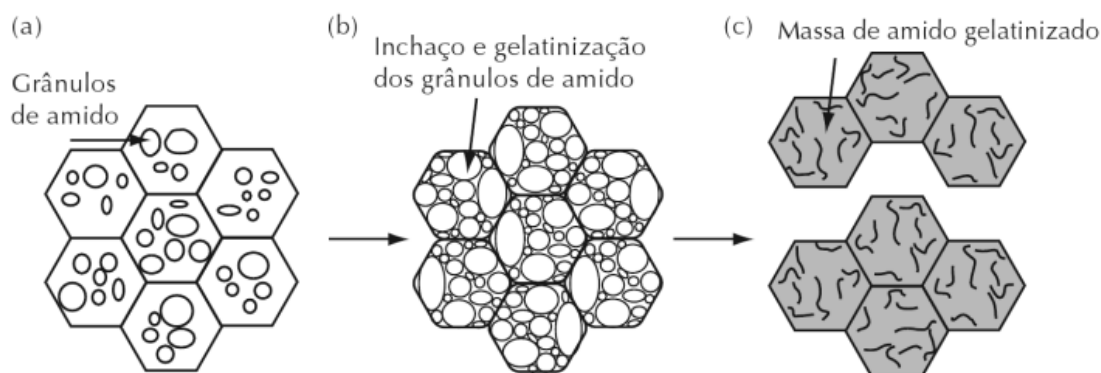
Fonte: PYLER; GORTON, 2008.

A gliadina e a glutenina são ricas em asparagina, prolina e aminoácidos sulfurados. A cistina e a cisteína (aminoácidos sulfurados) são os principais responsáveis pela característica de estrutura elástica e extensível das proteínas do glúten. A gliadina apresenta apenas ligações intramoleculares, o que resulta no seu baixo peso molecular e na sua baixa elasticidade. Por outro lado, além das ligações intramoleculares, a glutenina apresenta ligações intermoleculares que justificam seu alto peso molecular e sua alta elasticidade. Ambas representam 85% das proteínas presentes no trigo (EL-DASH et al., 1983).

A água possui a função de hidratar a farinha, dissolver parte das proteínas, inchar o grão de amido assegurando a união das proteínas que darão origem à rede de glúten na qual se insere o amido. Ao mesmo tempo promove a formação de um meio úmido favorável às atividades fermentativas e enzimáticas (SCHMIDT-HEBBEL, 1981; MATUDA, 2008). Sua dosagem nas formulações é determinante na consistência final da massa, contribuindo para a maciez e textura do pão. A insuficiência de água provoca uma baixa hidratação do glúten, que não desenvolve adequadamente sua elasticidade, enquanto, uma quantidade excessiva de água resulta em uma massa com aspecto pegajoso e com baixa resistência à extensão (CARR, 2003). Ainda, a água atua como solvente e plastificante e permite que, durante o processo de cozimento do pão, ocorra o fenômeno denominado gelatinização do amido (QUAGLIA, 1991).

A gelatinização do amido é uma reação irreversível que ocorre através do aquecimento de suspensões de amido em excesso de água (>60%) (FRANCO et al., 2002). Este fenômeno dá-se quando o grânulo de amido, nestas condições, intumescer com gradual hidratação (FIGURA 3), devido ao rompimento das pontes de hidrogênio mais fracas das áreas amorfas (National Starch and Chemical Industrial Ltda, 1995). Nestas condições, os grupamentos hidroxila são liberados, ficando prontamente disponíveis para as ligações com as moléculas de água e em consequência disto ocorre a expansão ou inchamento dos grânulos de amido (RICKARD et al., 1991).

Figura 3. Representação da gelatinização do amido



Fonte: DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010.

Fisicamente, este inchaço é observado através do aumento da viscosidade, ficando a dispersão de amido transparente, devido à maior incorporação de água, após certo período de tempo. A temperatura na qual este fenômeno ocorre é chamada de temperatura de gelatinização do amido (MARCON et al., 2007).

O sal é indispensável em qualquer formulação de pão, pois exerce basicamente duas funções principais: contribuir para o sabor do pão e aumentar a resistência à extensão do glúten, o que se dá graças a interação com as proteínas do glúten formando ligações dissulfídicas (PAVANELLI, 2000).

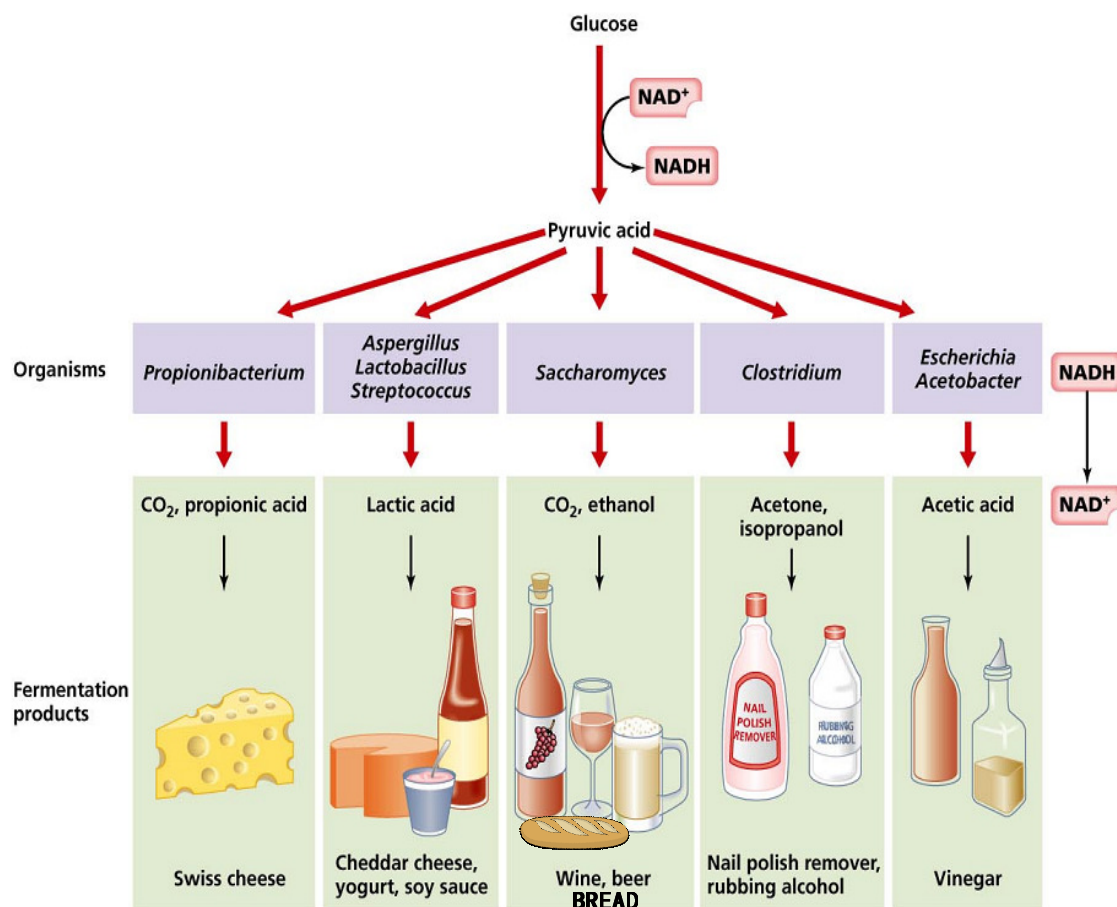
O sal atua principalmente sobre a formação do glúten. A gliadina, um de seus componentes, tem baixa solubilidade em água com sal. Uma massa obtida com água e sal resulta em uma maior quantidade de glúten formado com fibras curtas, por consequência das forças de atração eletrostáticas que ocorrem na rede formada com o sal, apresentando uma massa rígida e mais compacta (QUAGLIA, 1991)

O sal tem propriedade anti-séptica e atua também durante a fermentação, retardando especialmente as fermentações secundárias dos microrganismos produtores de ácidos. Ele diminui o desenvolvimento de dióxido de carbono, com uma relativa diminuição da porosidade do produto final. Também favorece a coloração da superfície do pão, dando a casca uma coloração mais viva e confere aroma mais intenso, comparado a pães sem sal (KENT; EVERS, 1994).

Segunda a ANVISA (BRASIL, 2005b) “fermento biológico” ou “levedura ativa” é o produto obtido de culturas puras de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por procedimento tecnológico e empregado para dar sabor próprio e aumentar o volume e a porosidade dos produtos forneados.

A levedura tem a função de converter os açúcares fermentescíveis, presentes na massa em CO₂ e etanol (FIGURA 4). Em panificação, o gás carbônico tem a propriedade de conferir ao pão a estrutura responsável pela leveza e volume e o álcool contribui para a expansão da massa durante o assamento, sendo ainda responsável por grande parte do aroma do pão (CANELLA-RAWLS, 2009). Ainda, Pavanelli (2000) relata que a levedura também exerce influência sobre as propriedades reológicas da massa, tornando-a mais elástica e macia.

Figura 4: Rota glicolítica envolvida na reação de diversos microrganismos e seus produtos.



Fonte: Pearson Education, 2006.

Existem matérias-primas como as gorduras e os açúcares que são complementares para a fabricação dos pães, visto que, de maneira geral, melhoram aspectos de maciez e textura dos produtos, aumentam a vida de prateleira e ainda alteram o sabor e o valor nutricional.

Açúcar é a sacarose obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou de beterraba (*Beta alba* L.). São considerados açúcares os monossacarídeos e demais dissacarídeos, podendo se apresentar em diversas granulometrias e formas (BRASIL, 2005b).

Os açúcares mais utilizados no processo de fermentação são sacarose, glicose e frutose, pré-existentes na farinha, normalmente entre 1% a 2%. Estes açúcares são resultantes da degradação do amido pelas enzimas amilases e também da adição de açúcares à formulação (CANELLA-RAWLS, 2009).

Durante a fermentação, o açúcar é transformado em gás carbônico e álcool, conferindo volume ao pão, além de proporcionar a cor dourada característica da crosta e contribuir para o desenvolvimento do sabor e aroma do pão (EL-DASH, CAMPOS e GERMANI, 1994).

Os triglicerídeos, conhecidos como gorduras, vêm sendo utilizados a séculos na culinária e podem estar na forma sólida, como margarina, manteiga, gordura hidrogenada; ou na forma líquida como os óleos (CANELLA-RAWLS, 2009).

Quando se adiciona gordura à massa de pão, ocorre o seu “encurtamento”, pois o glúten torna-se menos desenvolvido. Ao mesmo tempo, os cristais de lipídios presentes na gordura contribuem para a estabilização das bolhas de ar que ali foram incorporadas (PAREYT et al, 2011).

De acordo com Ribotta; Tadini (2009), se introduz uma quantidade mínima de gordura (entre 1 e 6%) na formulação de certo pães com a finalidade de obter massas mais extensíveis, mais estáveis na fermentação e com maior aumento de volume após forneamento (em torno de 10%). Os produtos obtidos apresentam além do maior volume, textura mais suave, alvéolo mais fino e maior vida útil.

2.3 Fermentação natural ou espontânea

O processo tradicional de fermentação é chamado de fermentação não espontânea e se caracteriza pela adição de uma cultura starter selecionada e desidratada antes do uso, à uma mistura de farinha de cereais e água (DE VUYST; NEYSENS, 2005; CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST; VANCANNEYT, 2007).

Na última década, a constante busca pela oferta de produtos diferenciados, tem levado muitas padarias a utilizarem a forma não tradicional para a produção de pães, chamada de fermentação natural ou espontânea. As fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, ou seja, realizadas pelas leveduras provenientes de cascas de frutas, principalmente, sem nenhum tipo de inoculação externa (TORIJA, 2003). Este tipo de fermentação é geralmente realizado através de técnicas passadas de geração em geração, e por isso, possui um forte apelo comercial devido à diversidade e singularidade dos produtos que origina (APLEVICS, 2013).

O fermento natural ou *levain*, como também é conhecido, é usado na produção de pães comuns, pães fermentados com a levedura de panificação (como realçador de sabor, para melhorar a qualidade do pão, ou em preparações de massa ácida) e pães especiais artesanais (uso do fermento natural como agente levedante para a melhoria da qualidade sensorial). Também, bolos e *crackers*, pizzas e vários pães doces são produzidos através de fermentação natural (GOBBETTI et al., 2005; ARENDT et al., 2007; CORSETTI; SETTANNI, 2007; GÄNZLE et al., 2007; DE VUYST et al., 2009).

Segundo Lahtinen et al. (2012), aproximadamente 30% da Europa utiliza a fermentação espontânea como técnica no preparo de pães. Já no Brasil, ocorre o contrário, a maioria dos pães são produzidos através do método direto de fabricação ou fermentação não espontânea, que consiste basicamente em adicionar todos os ingredientes no início ou durante a etapa de mistura, sem adicionar massa previamente fermentada (CANELLA-RAWLS, 2009).

De acordo com os parâmetros tecnológicos aplicados, o fermento natural é classificado em três tipos. O *levain* tipo I, tradicionalmente preparado à temperatura ambiente (30 °C) e continuamente alimentado; o tipo II, obtido do

processo industrial onde a fermentação é realizada com a presença de alto teor de água, em temperatura superior a 30 °C, durante aproximadamente 5 dias, e o tipo III, iniciado por culturas *starters* selecionadas e desidratadas antes do uso (DE VUYST; NEYSENS, 2005; HAMMES et al., 2005; CORSETTI; SETTANNI, 2007). Valmorri et al. (2010) relatam que o fermento natural deve ser continuamente alimentado com uma mistura de farinha e água ou como semi-líquido usado em preparações com longos períodos de fermentação.

Na preparação do *levain* para fabricação do pão, a seleção funcional de cepas é o principal requisito. A escolha dos “starters”, que segundo McGuire, (2010) é uma preparação constituída por um número elevado de células de pelo menos um microrganismo, baseia-se principalmente nas propriedades de acidificação e proteólise, e síntese de compostos voláteis durante a fermentação (HAMMES e GÄNZLE, 1998). No entanto, starters funcionais também devem se adaptar ao ambiente e ao processo da fermentação natural para garantir sua permanência estável na massa. Apesar de espécies pertencentes a Gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* ou *Weissella* terem sido isoladas do *levain*, a maioria das cepas autóctones presentes, pertencem ao gênero *Lactobacillus*. Dentre as mais de 150 espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, um grande número foi isolado pela primeira vez no *levain* ou a partir de fermentação espontânea de cereais (DE VUYST e NEYSENS, 2005). Portanto, potenciais starters para o *levain* são mais convenientes dentro do gênero dos *Lactobacillus*. Em particular, no *levain* tipo I são freqüentemente selecionados *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. Paralimentarius* e *L. plantarum* (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007).

Segundo HAMMES e GÄNZLE (1998), mais de 20 espécies de leveduras são encontradas em formulações de *levain*. A levedura *S. cerevisiae* está freqüentemente presente e geralmente, *S. Exiguus* (*T. Holmii* ou *C. holmii* ou *S. Minor*), *C. humilis* (*C. milleri*) e *I. Orientalis* (*C. Krisei*) são as leveduras normalmente associadas às bactérias ácido lácticas presentes no fermento natural (DE VUYST et al, 2014).

A grande variabilidade do número e do tipo de espécies encontradas depende de diversos fatores, incluindo o grau de hidratação da massa, o tipo de cereal usado, a temperatura de fermentação e a temperatura de manutenção do *levain* (DE VUYST; NEYSENS, 2005).

Quanto à característica do produto gerado, APLEVICS (2013) descreve que o uso de fermento natural em conjunto com a técnica da fermentação espontânea acarreta em falta de padronização, devido à falta de controle sobre o desenvolvimento das culturas microbianas presentes no fermento, com o possível surgimento de micro-organismos indesejáveis. Além disso, a técnica acarreta em gastos extras, visto a necessidade de utilização de mão de obra e insumos diários para a conservação do fermento, o que acaba por aumentar o custo do produto final e, muitas vezes, inviabiliza o seu uso (APLEVICS, 2013).

Entretanto, Dewettinck et al. (2008) relatam que o conhecimento científico pode ser aplicado no desenvolvimento de novos processos para a produção de fermentos naturais comerciais, o que viabilizaria o uso dos fermentos naturais em escala industrial. Sendo assim, muitas formulações e processos variados vem sendo utilizados para a produção de fermento natural em todo o mundo (HÄGGMAN; SALOVAARA, 2008) e uma das técnicas mais utilizadas para a avaliação da capacidade fermentativa destes fermentos é a reofermentografia.

2.3.1 Reofermentografia

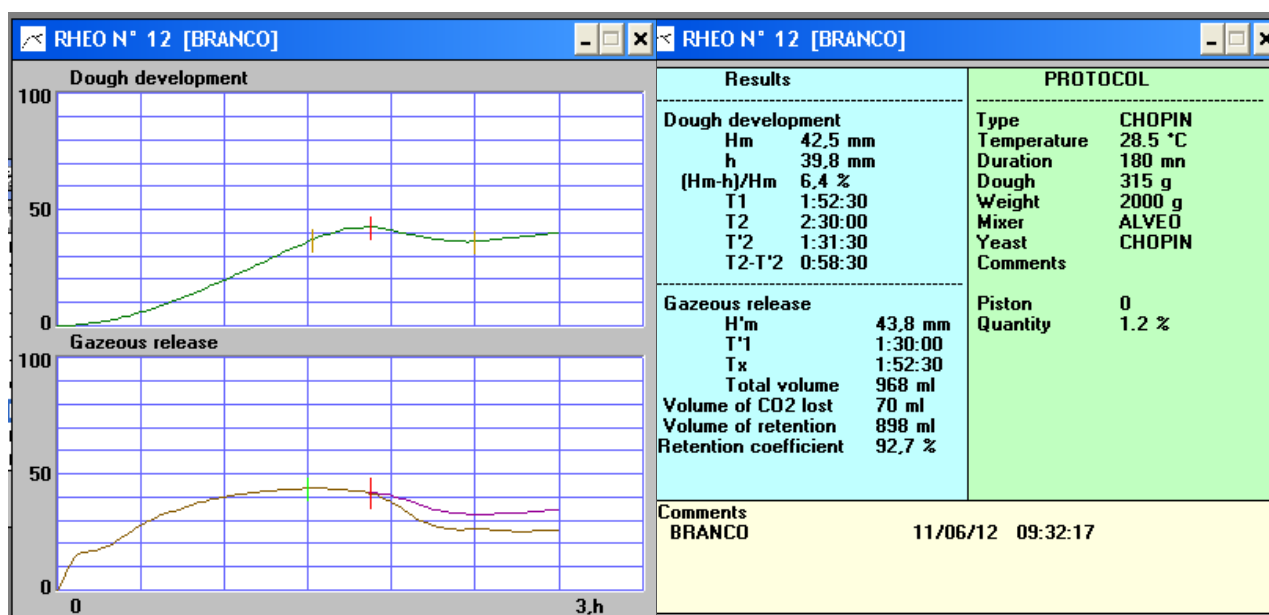
O Reofermentômetro F3 (Chopin Rheofermentometer F3 Tripette & Renaud, França) é o equipamento que realiza um estudo completo do comportamento da massa durante a fermentação analisando o desenvolvimento da massa durante o processo fermentativo sob condições controladas, sendo possível avaliar a capacidade fermentativa da farinha e/ou fermento, qualidade da rede protéica, porosidade, volume e tolerância da massa durante a fermentação (GRANOTEC, 2012).

No equipamento, a fermentação da massa é conduzida em temperatura controlada dentro de um recipiente hermético, ligado a um sensor de pressão. Um pistão colocado sobre a massa, mede as variações de volume desta massa durante o teste. À medida que a massa aumenta de volume, o movimento do pistão é medido para determinar a taxa de expansão e a força da massa. Ao mesmo tempo, a quantidade total de gás produzido pela levedura é medida juntamente com a quantidade que escapa da massa para a câmara. Os

parâmetros obtidos usando o reofermentômetro são: Vt (mL da produção total de CO₂); Vr (mL de CO₂ total retido pela massa); Hm (altura máxima em mm de desenvolvimento da massa); Hm' (altura máxima em mm de CO₂ liberado) (REALE et al, 2013).

Abaixo, a figura 5 demonstra um gráfico com os resultados da análise realizada em um Reofermentômetro F3.

Figura 5. Gráfico resposta da análise obtida por um Reofermentômetro F3.



FONTE: Granotec Brasil, 2012.

2.4 A importância dos produtos orgânicos no mundo

O crescente interesse pelo consumo de alimentos com maior valor nutritivo e menor teor de contaminantes, além da busca por hábitos de vida mais saudáveis, tem contribuído para impulsionar o consumo de alimentos orgânicos. O mercado de produtos orgânicos cresceu em torno de 20% ao ano, nos últimos anos (SCIALABBA, 2005; HOEFKENS et al., 2009).

Um produto orgânico é muito mais que um alimento sem agrotóxicos e sem aditivos químicos, visto que é o resultado de um sistema de produção agrícola que busca manejar, de forma equilibrada, o solo e os demais recursos

naturais (água, plantas, animais, insetos), conservando-os a longo prazo e mantendo a harmonia desses elementos entre si e os seres humanos (KATHOUNIAN, 2001). Por isso, segundo Primavesi (2001) um produto orgânico não deveria ser visto apenas como uma oportunidade de mercado.

Os alimentos orgânicos são definidos como aqueles alimentos *in natura* ou processados, oriundos de um sistema no qual se adotam técnicas que buscam a oferta de alimentos livres de contaminantes intencionais, que respeitam e protegem o meio ambiente, visando a sustentabilidade ecológica e a maximização dos benefícios sociais e econômicos (BRASIL, 2003; BRASIL, 2007). Esses alimentos tendem a ser livres de contaminantes intencionais, pelo não uso de: agrotóxicos (pesticidas), fertilizantes sintéticos, organismos geneticamente modificados, aditivos alimentares, radiações ionizantes e hormônios. Além disso, estes alimentos se caracterizam também pelo uso estritamente controlado de drogas veterinárias (BRASIL, 2003; BRASIL, 2007). Assim, pode-se afirmar que esses alimentos são menos contaminados quimicamente que os convencionais (FAO, 2000).

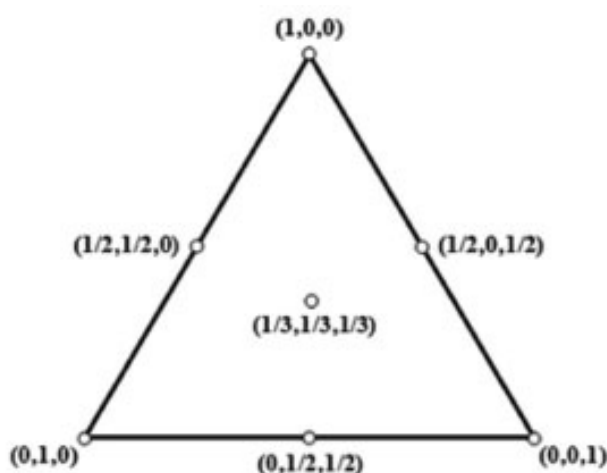
Diversos pesquisadores descobriram que a preocupação com a saúde pessoal, o meio ambiente e o bem estar animal estão associados com a compra de produtos orgânicos. Além disso, descobriram que o sabor dos alimentos e restrições na dieta (particularmente no caso de veganos e vegetarianos) eram motivações para o consumo destes produtos. Enquanto restrições na dieta motivavam a compra de orgânicos, a falta de familiaridade e de confiança nas marcas destes produtos eram grandes barreiras ao seu consumo. Concluiu-se que a maior propensão de compra de orgânicos estava entre os consumidores que acreditavam haver efeitos pessoais (na saúde, sabor e frescor do alimento) tal como efeitos externos (preservação ambiental e animal) (ZEPEDA; LI, 2007). Neste cenário do orgânico, o desenvolvimento de insumos que possam ser utilizados na produção e fabrico destes alimentos é essencial, visto que a literatura não reporta o isolamento de leveduras orgânicas para a elaboração de produtos de panificação.

2.5 Planejamento de misturas

O propósito geral em um planejamento de misturas é tornar possíveis as estimativas das propriedades de um sistema multicomponente, a partir de um número limitado de observações. Essas observações são obtidas de combinações pré-selecionadas dos componentes, na tentativa de determinar quais delas otimizam uma resposta (NEPOMUCENA; SILVA; CIRILLO, 2013).

Tratando-se da representação de um planejamento de mistura, define-se que uma mistura é composta por q ingredientes, na qual, geometricamente o espaço viável para a região experimental consiste de uma figura regular de dimensão $q - 1$, denominada *simplex*. Os pontos correspondem a misturas puras (um único componente), misturas binárias (dois componentes), até consistir de misturas formadas por todos os ingredientes em quantidades proporcionais. O centróide do *simplex* é o ponto que representa a mistura composta pelos q ingredientes distribuídos na mesma proporção (FIGURA 6). Os pontos de um *simplex* devem garantir que para qualquer ponto, a soma dos três componentes é unitária (NEPOMUCENA; SILVA; CIRILLO, 2013).

Figura 6. Distribuição dos pontos experimentais em um *simplex*



Fonte: (NEPOMUCENA; SILVA; CIRILLO, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é isolar, selecionar e liofilizar leveduras de frutas orgânicas a fim de obter uma alternativa mais prática e rápida à produção de pão francês de fermentação natural (levain).

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e selecionar leveduras nativas, a partir de frutas orgânicas;
- Selecionar as melhores leveduras através da avaliação de análise reofermentográfica e do volume específico do pão produzido com a utilização das mesmas;
- Cultivar as leveduras selecionadas;
- Liofilizar as leveduras selecionadas visando o mantimento do maior número possível de células viáveis;
- Produzir pães, com as leveduras selecionadas, através de um planejamento de misturas, visando alcançar as características de qualidade do pão francês obtido por de fermentação natural, através da determinação de cor, volume específico, textura da crosta e do miolo e espessura da crosta.

Capítulo II

RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo, já formatado de acordo com as normas, a ser submetido para publicação na revista Trends in Food Science and Technology.

Development of a Commercial Levain from yeast Obtained from Organic Fruits

Development of a Commercial Levain from yeast Obtained from Organic Fruits

Mariana Lenzi Nodari^{1*}, Roberta Cruz Silveira Thys¹, Jeverson Frazzon¹, Helen Treichel²

1 Institute of Food Science and Technology (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Federal University of Southern Frontier (UFFS), Erechim, RS, Brazil.

Abstract

Having great importance to the preparation of bread products, the yeast used in bread making has gained significant commercial and technological interest in recent years through products made from natural fermentation. This yeast is a natural system formed by yeasts and lactic acid bacteria, which inhabit a complex association, creating natural yeast that can be developed by spontaneous fermentation or initiated by the addition of a starter culture. The main objective of this study was to isolate, select and freeze-dry yeast made with organic fruit in order to get a more practical and rapid alternative to the production of natural fermentation (*levain*) french bread. For this, 7 organic fruit yeasts were isolated, and 3 of those were selected for having higher specific volume in the breads that were prepared (X1, apple, X2 "Isabel grape", X3, 'purple grape'). Also, mixture plans were made, involving the 3 selected yeasts in pre-determined percentages, and the analysis performed was related to specific volume, color, texture of crust and crumb and crust thickness. The yeasts showed good stability after freeze-drying, and the yeast N5 ('Gala apple') obtained the lowest percentage of microbial reduction. Regarding the color analysis, breads prepared with the ternary mixture (X1, X2, X) and the binary mixture with the fractions X1 and X3 corresponded to the best answer. In relation to the texture of the crust, the best results were obtained by the binary mixture of X2 and X3, and the best results of crumb texture were observed in the yeast fraction of the unitary X1 and the ternary mixture (X1, X2, X). The unitary fraction of the X1 yeast and the binary mixture between X1 and X3 and between X2 and X3 represented the best results regarding the thickness of the crust. In conclusion, this study shows that it is possible to use yeasts isolated from organic fruits to form a commercial natural *levain* for the preparation of breads with similar characteristics of those made through natural fermentation, in a faster and more practical way, though.

Keywords: baking, natural fermentation, *levain*, planning mixtures.

Corresponding Author: M Nodari (marilnodari@gmail.com) Institute of Science and Food Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Postal zip code: 15095, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone +55 51 33087115; Fax +55 51 33087048.

Introduction

In the last decade, natural or spontaneous fermentation has been shown as an interesting alternative for the production of bread, since the growing concern from bakeries to constant offer differentiated products. Spontaneous fermentation is produced in a natural way, by yeasts mainly from fruit peels, without any external inoculation (TORIJA, 2003). This type of fermentation is usually conducted through empirical techniques, passed down from generation to generation and is characterized by the diversity and uniqueness of the products it originates. Thus, currently, natural fermentation has a strong commercial appeal (APLEVICS, 2013).

Two main factors distinguish the traditional from the spontaneous fermentation. First, the presence of lactic acid bacteria, and secondly, the long fermentation time, which generates a substantial contribution of endogenous enzymes related to biochemical conversion (DECOCK; CAPELLE, 2005; GÄNZLE, 2014). Despite being a slow process, using natural yeast in bread making has increased in recent years due to the demand for the consumption of foods without the addition of chemical preservatives. Various starter cultures have been applied in the processing of natural yeast, in order to increase the shelf life of bread and to improve their sensory characteristics (PLESSAS et al., 2011).

The use of natural fermentation strongly influences aspects of bread quality, being that the technological effects on texture, shelf life, flavor and nutritional quality of bread are extremely dependent on the bioconversion of flour components by natural yeast (DECOCK; CAPELLE, 2005).

Natural yeast production can be initiated with the mixture of wheat flour and water, stored in a warm place and, after some propagation, the yeast is formed. However, the technique entails extra costs, because the need of manpower and of daily inputs to preserve the yeast, besides the long time required for the fermentation stage, which ultimately increases the cost of the the final product and often precludes their use (APLEVICS, 2013). Thereby, this study aims to isolate, select and lyophilize (freeze-dry) organic fruit yeast in

order to obtain a fast and convenient alternative to the production of bread with similar characteristics of the bread produced through natural fermentation technique (*levain*).

Materials and methods

Feedstock

Varieties of grape, apple, fig and persimmon were purchased in the local organic trade in Porto Alegre (RS, Brazil).

The wheat flour was acquired from Moinho Prifal Ltda in Porto Alegre (RS, Brazil) and had the following characteristics: 14.5 g/100g of moisture, 0.674 g/100g of ashes, falling number of 366 seconds, color (Minolta) 92.17 L (0-100), 29.2 g/100g of wet gluten and 10.0 g/100g of dry gluten. The data obtained by the farinogram are: 56.3% (14% moisture basis), development time of 11 minutes, stability of 15 minutes and tolerance index of 35 Brabender Units.

Refined salt (Cisne brand) and refined sugar (União brand) were purchased from the local market in Porto Alegre (RS).

Isolation of yeasts

First, the organic fruits were cleaned with running water. The solid medium YP (1% peptone from casein - Himedia brand, 1% yeast extract - Himedia and 2% agar - Himedia) was supplemented with 2 g% (w/v) of glucose (Sigma-Aldrich brand) (YPG 2%) and placed in Petri dishes. Grape berries, pieces of apple, fig and persimmon peel were, individually, set in contact with the solid medium in a zigzag form, with the help of tweezers. Next, the plates were incubated at 30°C for 72 hours to obtain isolated colonies of yeasts and possible bacteria. All cultures were made in triplicate.

Aiming to obtain pure yeast strains, the isolated colonies, after observation under a microscope using the fresh technique (BIER, 1980), were

seeded in Petri dishes in a potato dextrose agar medium (Merck brand) (3.9% potato agar, addition of 2,0 v/v aqueous solution of tartaric acid (Merck) 10% (w/v)), which only allows the growth of yeasts, incubated at 30 °C for 72 hours. Posteriorly, the existing yeasts in potato agar medium were transferred to test tubes containing YP medium broth at 30 °C for 24 hours.

After growth, the yeast colonies were placed on some Petri dishes containing potato agar medium and other Petri dishes containing solid YPG 2% medium, allowing to observe the purity of the colonies by comparing the potato agar plates with the YPG plates of 2%.

At the end of this process, 7 samples of pure isolated yeasts were obtained, called N1 (Niagara pink grape), N2 (Niagara white grape), N3 (Niagara dark grape), N4 (chocolate persimmon), N5 (Gala apple), N6 (purple fig) and N7 (Muscat grape). The yeasts were stored at ambient temperature, for a period of six months in inclined test tubes containing solid YPG 2% medium, covered with sterile mineral oil.

Growth of yeast dough

Isolated yeast colonies were grown on dishes of solid medium YPG 2% and seeded in 90 mL of YP medium (1% peptone from casein, 1% yeast extract) supplemented with 10 ml of glucose solution (Sigma-Aldrich) 20 g% (w/v) and then incubated at 28 °C for 9 hours under agitation (50 rpm).

From this culture, 1 mL was removed and added to flasks of the Erlenmeyer type containing 359 mL of YP medium, with added 40 mL of glucose 20 g% (w/v) and subsequent incubation at 28 °C under agitation (50 rpm) around 9 hours (time for the culture to reach optical density - OD - equal to 1.0).

Lyophilization

The yeast dough to be lyophilized and then separated by centrifugation at 4000G for 20 minutes was resuspended in autoclaved distilled water to reach an optical density of 2.5, for subsequent addition of skim milk 10 g% (w/v) (cryoprotectant agent) and vortex-agitated for 3 minutes. The mixture was

fractionated (5 mL) in glass bottles suitable for freeze-drying. The vials containing the yeast with the cryoprotectant solution were frozen overnight at 80 degrees Celsius and afterwards lyophilized, following procedures described by Kirsop (1984) and Chang & Elander (1986), at a temperature of $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a vacuum of approximately 100 mm of mercury for 24 hours. The device used was the Liotop (model L 101). After lyophilization, the vials were sealed and stored under refrigeration of 0 to $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Cell viability was determined after lyophilization.

Cell viability test

For the determination of cell viability, the lyophilized cells were diluted and seeded on Petri dishes containing solid YPG 2% medium and incubated for 48 hours at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. After this period the counting of the colonies was made (VIGANÓ et al, 2012).

Selection of yeasts

In order to select the yeasts that were to be used in Mixtures Planning, loaves of french type bread, with the 7 samples derived from the isolation and lyophilization process, were prepared. The analysis performed to select the best yeasts were of the specific volume ($\text{cm}^3\text{ G}^{-1}$) and rheofermentography, which is an analysis that measures the fermentative capacity of the yeast in a device called Rheofermentograph.

Production of bread

Wheat flour (100%), water (60%), sugar (2.5%), salt (2%) and freeze-dried yeast (3%), according to a formulation proposed by CANELLA-RAWLS (2009), were mixed in a domestic mixer (Britânia brand, model MultiPane) for 20 minutes. The dough was fractionated (100 g), shaped and placed in trays. The fermentation was carried out in a digital environmental chamber, with humidity of 80% (Venâncio brand, model AC40T) at a temperature of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 hours.

After fermentation, the dough was put in an turbo oven (Tedesco brand, model FTT150E) for 10 min at 200 °C, with the turbine turned on and steam injection of 5 seconds. The cooling occurred at room temperature for 1 hour.

Specific volume

The specific volume of the produced breads was calculated from the ratio between the volume of baked bread, determined by the millet-seed displacement method (STIKIC et al., 2012) and its weight, obtained through the use of a semi-analytical balance, measured one hour after baking. The tests were performed in triplicate and values expressed in $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.

Rheofermentography

The rheofermentography was performed in a Rheofermentograph F3 (Chopin brand), where the dough (made with wheat flour, yeast and sodium chloride solution) was placed in a fermentation basket and over it was placed a piston and 4 discs, weighting 500g each. The piston was connected directly to the displacement sensor, and the basket of the rheofermentograph was directly connected to a pneumatic circuit for the calculation of the gas production during fermentation, by AACC's method 89-01.01.

The analysis of the rheofermentography was held in partnership with the laboratory of guarantee and quality control of Granotec do Brasil (Curitiba, PR).

Determination of optimal concentration of each yeast

The previously selected yeasts were tested at concentrations of 2, 4 and 6% on flour weight, using the same formulation of French bread presented earlier. The breads were evaluated by their specific volume, color (parameters $L^* a^* b^*$), texture of crumb and crust and thickness of the crust.

Experimental design

Simplex-centroid mixtures planning (MONTGOMERY, 2001) was used to assess the effect of the proportion of each of the selected yeasts on the following aspects of french bread: specific volume, color (parameters L^* , a^* , b^*), texture of the crust and crumb and crust thickness. Table 1 shows the experimental design. The proportions of the components are expressed as a mass fraction of the mixture and the concentration of yeast in the bread formulation was 4% on flour weight (20g). X1, X2 and X3 were the codes granted to selected yeasts in the previous item.

Table 1. Mass fraction of Yeast X1, Yeast X2 and Yeast X3, which compose the design of the Simplex-centroid mixture.

Mixture	Yeast X1	Yeast X2	Yeast X3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0	0,5	0,5
5	0,5	0	0,5
6	0,5	0,5	0
7	0,33	0,33	0,33

Color Analysis

The color evaluation of the bread loaves was performed in its crust, using a Minolta® brand colorimeter, model Chroma Meter CR 200b, with the L^* , a^* , b^* system (MCGUIRE, 1992). The colorimeter measures the color using three parameters: L^* , ranging from 100 (white) to zero (black); b^* , ranging from blue (negative) to yellow (positive) and a^* , that varies from green (negative) to red (positive). The results expressed were the average of three readings.

Texture analysis

The texture profile of the bread loaves was performed with the support of a texturometer, model TA-XT2i (Stable Micro Systems brand, Surrey, UK) equipped with a cylindrical compression probe of 2 mm in diameter for the crust, and a cylindrical compression probe of 35 mm in diameter for the crumb. The texture parameter given was firmness (N).

The evaluation of this parameter consists in the submission of the sample to compression and to analyze its curve relating force and time. The firmness is the force required to perform this deformation (SZCZESNIAK, 1998; CARR et al., 2006).

The instrumental analysis of texture was performed under the following conditions: speed of the test (1.0 mm/s for the crust and 1.7 mm/s for the crumb) and post test (10.0 mm/s for the crust and 10.0 mm/s for the crumb) respectively; with 9.5 mm of distance for the crust and of 6.0 mm for the crumb. To analyze the crust, the bread was kept whole, and for the analysis of the crumb it was used a central slice of bread with 2.5 cm thick (CARR, 2003).

Crust thickness

The crust thickness was determined by measuring the central slice of the bread, using a caliper. Measures were collected at four different spots, two in the upper crust and two on the bottom. Subsequently, it was performed a simple arithmetic mean of these determinations (DOS SANTOS, 2012).

Results and Discussion

Cell viability test

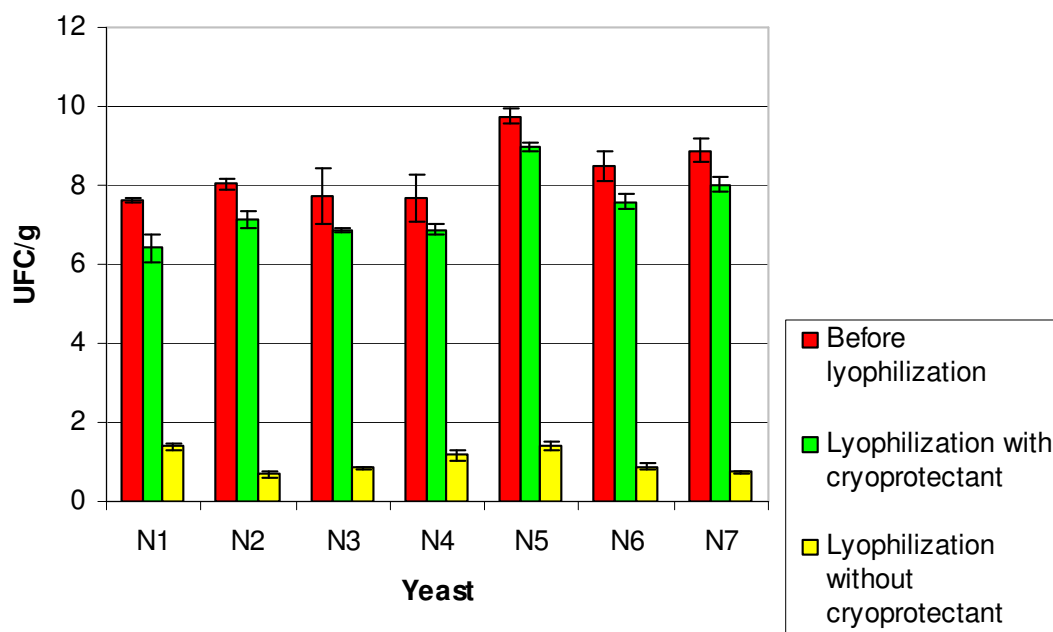
The first graphic, figure 1, shows the results of the yeast survival after lyophilization with and without the use of a cryoprotectant agent. As it can be observed, all freeze-dried yeast without the presence of the cryoprotectant agent showed inferior viability results post lyophilization, in comparison to freeze-dried yeast protected by the use of skim milk. The percentages in

reduction of cell viability when lyophilization was made without cryoprotectants were: N1 (81.91%), N2 (91.53%), N3 (89.11%), N4 (84.79%), N5 (85.33%), N6 (89.49%), and N7 (91.68%).

With the use of the cryoprotective agent, the reduction of cell viability after lyophilization was lower. In this case, the percentage in cell reduction after lyophilization were as follow: N1 (15.99%), N2 (11.08%), N3 (11.15%), N4 (10.66%), N5 (8.00%) N6 (10.39%), and N7 (9.79%).

These results indicate that the yeasts used in this study showed good stability after lyophilization. Similar result was found by Carvalho et al. (2004), where powdered skim milk was able to prevent cellular injury by stabilizing the cell membrane, providing a protective coating to the cells.

Figure 1. Survival of lyophilized yeast in log CFU/g.



Other factors that assist in maintaining cell viability after lyophilization are the velocity and temperature of freezing the yeast cells. Zhang and Zhao (2005) reported in a study that the higher survival of *L. brevis* and *Oenococcus oeni* were obtained when their cells were quickly frozen (-65 °C) showing increased viability after lyophilization than when slowly frozen (-20 °C). In both cases, skim milk powder was used as cryoprotective agent.

Yeasts Selection

The results obtained for rheofermentography analysis showed no formation of CO₂ by the yeast analyzed (Table 2). As it can be seen in the table, the formation of gas by the standard yeast was far superior to the gas formation generated by the yeast with the most fermentative power of this study (N5).

Table 2. CO₂ volumes generated by yeasts analyzed through rheofermentography.

Analized yeast	Generated CO ₂ volume (mL)
Pattern	928,0 ± 0,67 ^a
N1	14,0 ± 0,22 ^d
N2	15,0 ± 0,81 ^d
N3	16,0 ± 0,58 ^d
N4	22,0 ± 0,13 ^c
N5	38,0 ± 0,69 ^b
N6	30,0 ± 0,59 ^b
N7	25,0 ± 0,56 ^b

Results as mean ± standard deviation. ^{a-c} different superscript letters between samples in the same column indicate significant differences (*Tukey* test, $p < 0.05$).

The non-formation of gas may have been generated by the analysis protocol of rheofermentography. In the present study the standard procedure was used for the analysis, accordingly to AACC's 89-01.01 method, because of the use of lyophilized yeast. Thus, the freeze-dried yeast was mixed with the flour and placed in the equipment, and after addition of salt and water, the dough was fermented inside the equipment. On the other hand, in studies performed with natural *levain*, the dough is fermented prior to analysis, as reported in the study by Hou and Hsu (2013), which compared the production of gas between natural wheat and apple *levains*. In this study, two fermentations were held prior to analysis, the first with 25g of starter (apple or wheat), 95g of HRW flour, 5g of rye flour and 50g of tap water, for 12-24h at 28°C. The second, with a part of 50g of the first fermentation mixed with the remaining

ingredients (100g of HRW flour, 74g of tap water, 0.1 g instant yeast and 2.4 g salt) for 2 hours at 28 °C.

Another factor that may have contributed to the low gas production was the non-use of chemical acids along with the yeasts under study. Clarke et al. (2002) reported that the required time for maximum production of gas by the natural yeast, in the presence of chemical acids, is greatly reduced. According to the authors, acidification creates the ideal pH level for activation of α - and β -amylase endogenous enzymes, causing the release of fermentable sugars in the flour, which increases the fermentative activity of the yeast.

In a study by Goesaert et al. (2005) and Rosell et al. (2001), the addition of chemicals acids to *levain* made of buckwheat resulted in higher amounts of CO₂ produced in a significantly shorter time than in the control wheat dough. The Table 3 shows the results obtained for the analysis of the specific volume of the breads made with yeasts N1, N2, N3, N4, N5, N6 and N7 with the concentration of 3% (on flour weight).

Table 3. Specific volume of the breads made with 3% of each analyzed yeast.

Yeast	Specific volume (cm ³ .g ⁻¹)
N1 (Niágara pink grape)	2,08 ± 0,24 ^b
N2 (Niágara white grape)	1,84 ± 0,06 ^{bc}
N3 (Niágara black grape)	1,62 ± 0,07 ^c
N4 (chocolate persimmon)	1,74 ± 0,07 ^c
N5 (Gala apple)	2,81 ± 0,06 ^a
N6 (Purple fig)	2,50 ± 0,11 ^{ab}
N7 (Moscato grape)	2,73 ± 0,09 ^a

Results as mean ± standard deviation. ^{a-c} different superscript letters between samples in the same column indicate significant differences (*Tukey* test, $p < 0.05$).

It can be observed that yeasts directly influenced the specific volume of breads. Those which originated a bread with higher specific volume were N5, N6 and N7, without statistically significant differences between them.

Plessas et al (2007) found specific volume values of 1.9 cm³ / g for breads made with commercial yeast and 2.1 cm³ / g for bread made with *kefir*, values which are present in the range of specific volume found at this stage of this present experiment. It is noteworthy that the gas production during

fermentation is a parameter essential for the formation of the structure of the bread.

According to Gutkoski and Dos Santos (2004), french bread can be classified by the specific volume in a range of 4 to 8 cm³. g⁻¹, where the lower value indicates a regular bread and higher value indicates a very good bread. Even obtaining results of specific volume below the minimum considered value, the chosen yeasts had the greatest results for the matter (N5, N6 and N7).

Determination of optimal concentration of each yeast

The Table 4 shows the results obtained for the analysis of specific volume, color, texture of crust and crumb and thickness of the crust of breads produced with N5, N6 and N7 yeasts, at concentrations of 2, 4 and 6%.

Table 4. Specific volume, color (L^{*}), texture of the crust and crumb and thickness of the crust of breads produced with N5, N6 and N7 yeasts, at concentrations of 2, 4 and 6%.

Yeast (%)	Specific volume (cm ³ .g ⁻¹)	Color L [*]	Crust firmness (N)	Crumb firmness (N)	Crust thickness (mm)
N5 (2%)	2,84 ± 0,11 ^b	64,63 ± 3,53 ^a	248,75 ± 1,58 ^b	1031,35 ± 51,26 ^a	2,67 ± 0,58 ^a
N5 (4%)	2,57 ± 0,06 ^c	62,14 ± 1,03 ^{ab}	234,69 ± 22,21 ^b	745,83 ± 13,24 ^b	1,67 ± 0,58 ^c
N5 (6%)	3,27 ± 0,04 ^a	58,48 ± 0,67 ^c	227,99 ± 4,89 ^b	693,12 ± 38,74 ^b	1,67 ± 0,58 ^c
N6 (2%)	2,63 ± 0,12 ^c	61,83 ± 2,65 ^{ab}	342,38 ± 15,34 ^a	662,17 ± 18,09 ^b	2,33 ± 0,58 ^{ab}
N6 (4%)	2,81 ± 0,13 ^b	65,28 ± 2,58 ^a	251,52 ± 21,87 ^b	488,26 ± 26,65 ^c	2,38 ± 0,48 ^a
N6 (6%)	3,57 ± 0,25 ^a	65,34 ± 2,89 ^a	183,97 ± 21,13 ^c	316,07 ± 1,64 ^{cd}	1,47 ± 0,90 ^c
N7 (2%)	2,35 ± 0,06 ^c	69,71 ± 4,51 ^a	267,25 ± 7,06 ^{ab}	491,49 ± 39,55 ^{bc}	1,83 ± 0,50 ^c
N7(4%)	2,88 ± 0,06 ^b	59,61 ± 2,16 ^c	203,95 ± 8,71 ^b	385,08 ± 10,29 ^c	2,00 ± 0,50 ^{bc}
N7 (6%)	3,18 ± 0,11 ^a	60,46 ± 0,82 ^{bc}	140,03 ± 22,99 ^c	296,34 ± 38,70 ^d	1,83 ± 0,29 ^c

Results as mean ± standard deviation. ^{a-c} different superscript letters between samples in the same column indicate significant differences (*Tukey* test, *p* < 0.05).

In general, it can be seen that the higher the yeast concentration, the higher the specific volume of the bread, with the exception of yeast N5. The same is also observed for the L^{*} parameter in yeast N5 and N7. Concerning the texture of the crumb and the crust, it is observed that the higher the yeast

concentration, the lower the texture. The thickness did not follow a logical trend, with the increase of the yeast concentration.

It is inexistent in literature a quality parameter set for a french bread obtained by natural fermentation, however it is known that this product has a thicker crust, darker color (due to the long fermentation time), increased texture and lower specific volume, when compared to a bread originating from traditional fermentation, which according Gutkoski and Dos Santos (2004) is of 4 to 8 cm³ / g. Therefore, for determining the concentration to be used for each yeast in mixtures planning, the bread which is prioritized is the one with the highest values for the crust thickness and texture and with intermediate values of specific volume of (between 2.5 and 3.0 cm³ / g). As a result, the 2% yeast N5 and the 4% N6 and N7 had satisfactory results.

The brightness of the french bread crust varied in the range of 58-69, which is considered satisfactory (PURLIS; SALVADORI, 2009). There were no significant differences in the L * parameter of color analysis for the yeasts N5 at 2% and N6 at 4 %, tough both differed significantly from N7 at 4%. According to Purlis (2011), breads with brightness around 70 have good sensorial acceptability. However, values below 60 result in excessive browning, and above 78 in a much lighter coloration, indicative of insufficient cooking. For Komlenic et al. (2010) adding dry natural yeast to the dough influences in the reduction of its brightness.

The final texture and appearance of bread depend on the bubbles formed in the dough, which are created during the process of rest and cooking (MARTIN, 2004). Thus, for the texture of the crust, there was no statistical difference compared to results for the percentages of the 3 selected yeasts. The values of the force required to accomplish deformation in the crust of the loaves ranged between 203 and 251 N. The N5 yeast (2%) had the highest value for the crumb texture (firmer), being statistically different from the other two yeasts. Softer crumbs were observed in the results obtained for N6 (4%) and N7 (4%), which did not differ significantly from each other.

The thicker crusts were obtained with N5 yeast (2%) and N6 (4%), which does not vary significantly between them. Of the 3 yeasts, the one which provided a thinner crust was N7 (4%), varying significantly from the other two selected yeasts.

Due to the necessity of choosing a single concentration of yeast to perform the mixtures planning, it was used the concentration of 4%, as ideal, since it was the better concentration according to the analyzed aspects for the two selected yeasts, N6 and N7. In mixtures planning, the yeast N5 is called X1, yeast N6 is called X2 and yeast N7 is called X3.

Experimental design

The results of the experimental design are presented in Table 5.

Table 5. Mean and standard deviation resulting of the Simplex-Centroid design, used to evaluate the effect of yeast X1, X2 and X3 on specific volume, color (L *), crust texture, crumb texture and crust thickness.

Mixture	X1	X2	X3	Specific volume (cm ³ .g ⁻¹)	Color L*	Crust firmness (N)	Crumb firmness (N)	Crust thickness (mm)
1	1	0	0	2,84 ± 0,11	62,14 ± 1,03	234,69 ± 22,21	745,82 ± 13,24	1,67 ± 0,58
2	0	1	0	2,81 ± 0,12	65,28 ± 2,57	251,52 ± 21,87	488,26 ± 26,65	2,33 ± 0,57
3	0	0	1	2,88 ± 0,06	59,61 ± 2,16	203,95 ± 8,70	385,08 ± 10,29	2,00 ± 0,50
4	0	0,5	0,5	2,76 ± 0,07	55,45 ± 2,74	291,39 ± 19,27	961,91 ± 42,18	2,43 ± 0,32
5	0,5	0	0,5	2,46 ± 0,06	52,92 ± 1,24	267,25 ± 7,06	876,29 ± 72,46	2,53 ± 0,06
6	0,5	0,5	0	2,69 ± 0,13	49,34 ± 0,52	297,04 ± 3,14	833,57 ± 27,75	2,60 ± 0,36
7	0,33	0,33	0,33	2,42 ± 0,06	51,22 ± 0,45	237,57 ± 8,57	881,23 ± 78,09	2,27 ± 0,31

Results as the mean ± standard deviation.

Specific volume

The specific volume of the bread depends on two factors: the amount of gas produced and the capacity of gas retention in the dough system, which depends on the degree of hydration of the insoluble proteins found in the flour, called gliadins and glutenins, (CLARKE et al., 2003). The coefficient of determination obtained for the analysis of the specific volume was quite low ($R^2 = 0.0805$), not allowing the construction of a graph, since it was not possible to validate the model. Because of this, ANOVA was made with 90% confidence rate (Table 6), seeing that under these analysis conditions a positive effect of individual variables was observed ($p < 0.10$).

Table 6. Mean and standard deviation resulting of the Simplex-Centroid design, used to evaluate the effect of yeast X1, X2 and X3 on specific volume.

Mixture	X1	X2	X3	Specific volume (cm ³ /g)
1	1	0	0	2,84 ± 0,11 ^a
2	0	1	0	2,81 ± 0,12 ^a
3	0	0	1	2,88 ± 0,06 ^a
4	0	0,5	0,5	2,76 ± 0,07 ^b
5	0,5	0	0,5	2,46 ± 0,06 ^c
6	0,5	0,5	0	2,69 ± 0,13 ^b
7	0,33	0,33	0,33	2,42 ± 0,06 ^c

Results as mean ± standard deviation. ^{a-c} different superscript letters between samples in the same column indicate significant differences (*Tukey test*, $p < 0.10$).

Thereby, it can be noticed that breads produced with the unitary fractions of yeast showed the highest values of specific volume, ranging between 2.81 and 2.88 cm³/g, with no significant difference between results. According to GOBBETTI et al. (1994), the volume of bread depends, above all, on the proper development of the yeast, indicating that the yeast had a better development when isolated.

The mixture of the 3 yeasts and the binary fraction between X1 and X3 resulted in breads with the lowest specific volume (2.46 cm³ / g).

Color Analysis - Parameter L *

Figure 2 (a) corresponds to the results of the color parameter L* (0 - 100). Values next to zero represent breads with darker crust, that is, a higher fermentative yeast power results in and increased formation of residual sugar in the product, which is available to be caramelised during baking (CANELLA-RAWLS, 2009). A ternary mixture (X1, X2, X3) and binary mixture with the fractions X1 and X3 correspond to the best answer for the evaluated parameter.

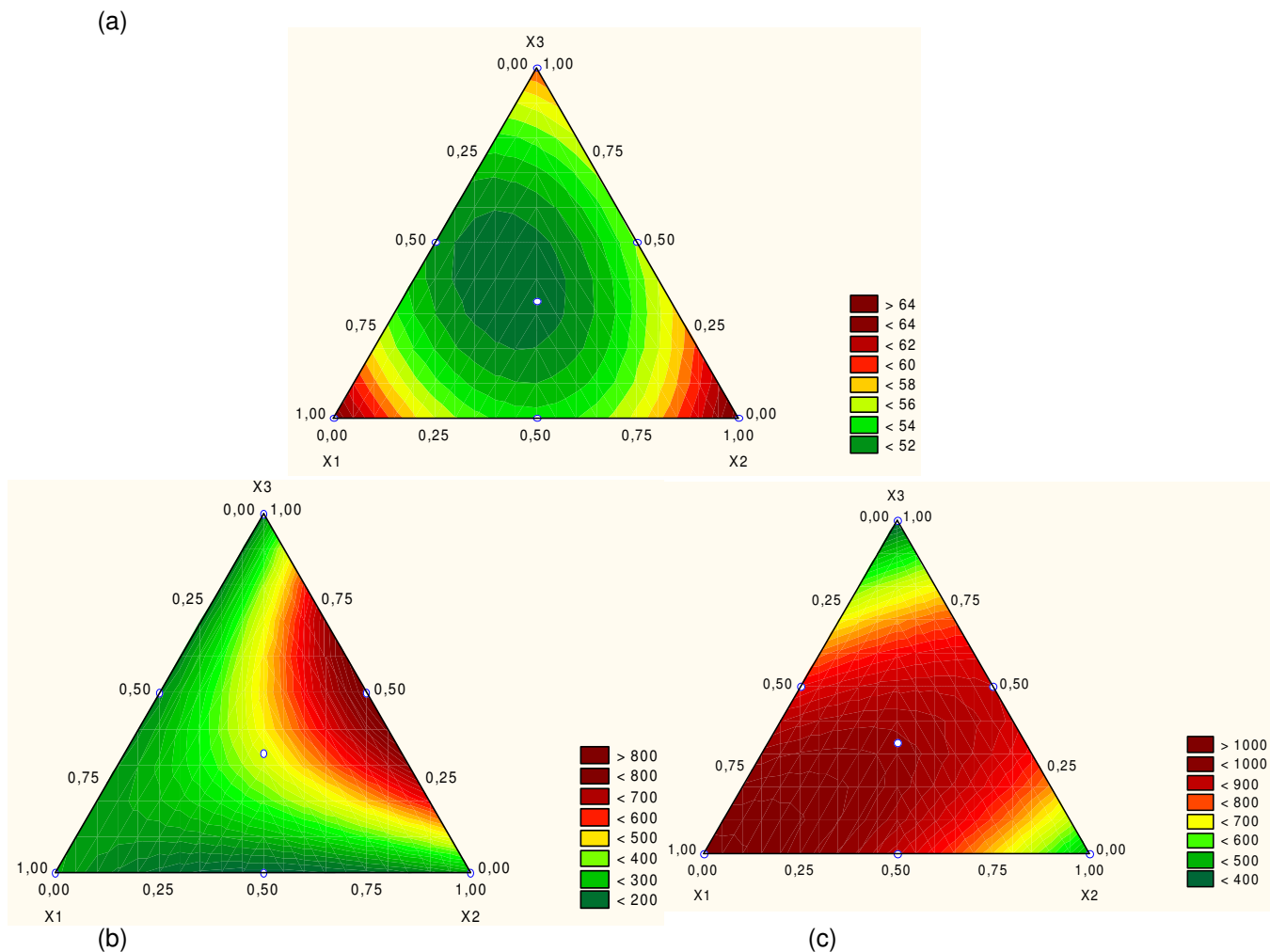


Figure 2: triangular diagram of parameters (a) parameter L^* (color), (b) texture of the crust, and (c) crumb texture, resulting from the experimental design.

The greater the texture of a bread, better is the indicative of the activity of the yeast over the product (CANELLA-RAWLS, 2009). According to Figure 2 (b), the region of the chart between the binary mixture of X_2 and X_3 proves this action. However, for the crumb texture (Figure 2c), the best results were observed for the unitary yeast fraction X_1 , to the binary mixture X_2 and X_3 and to the ternary mixture (X_1 , X_2 , X_3).

Crust thickness

Figures 3 (a) and 3 (b) represent the thickness of the upper and lower crust of the breads, respectively. The regions of the chart in deep red color present the most satisfactory results for the parameter analyzed, since they are the largest thicknesses achieved. For the upper crust, the unitary yeast fraction X1 and the binary mixtures X1 X3 and X2 X3 have the best results. The lower crust follow the same results shown for the upper crust.

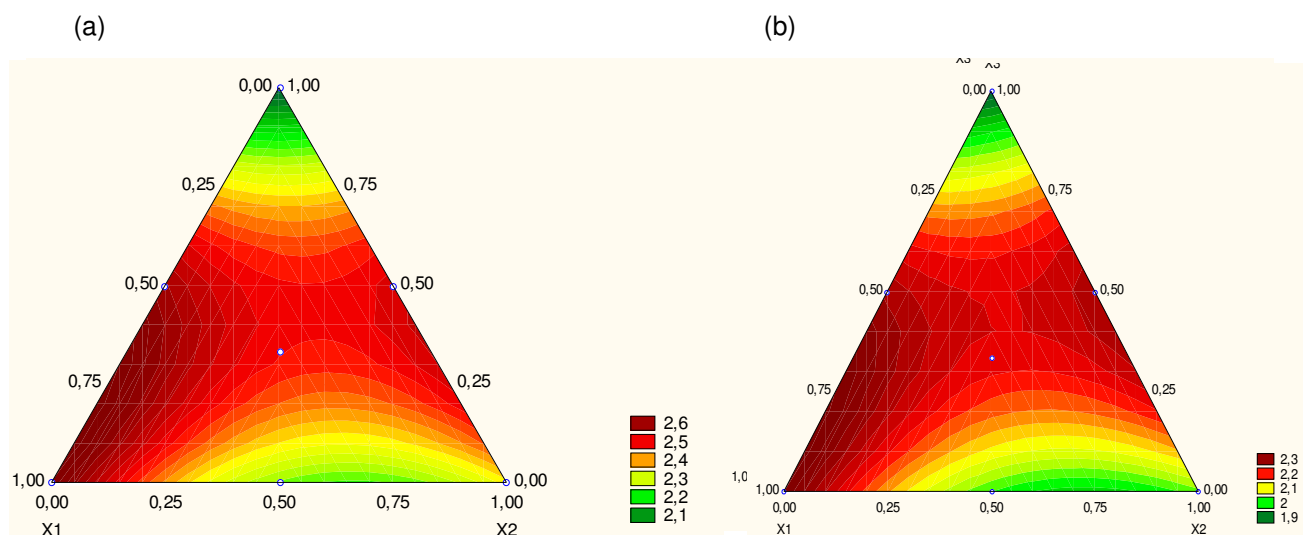


Figure 3: triangular diagram of parameters (a) upper crust thickness and (b) lower crust thickness, resulting from the experimental design.

Conclusions

Based on the results obtained for cell viability, it can be said that the process of lyophilization using skim milk as a cryoprotective agent was suitable to maintain the yeasts studied, however, the use of chemical acids might have aided in the fermentation of the yeasts. The experimental design of the mixture indicated a significant influence of the pure components, concerning the responses for crumb texture and thickness of the crust. There was also an influence of the ternary mixture (X1, X2, X3) in the responses for color and texture of the crumb. Through the obtained data, it can be concluded that there is a tendency for obtaining loaves with better quality with yeast X1. This enables to design new compounds in other ratios, which can be used as a base for natural fermentation, aiming to improve the specific volume, color, texture of

crust and crumb and the thickness of bread crust.

Acknowledgement

Thanks to CAPES - Coordination of Improvement of Higher Education Personnel for the scholarship, the UFRGS - Federal University of Rio Grande do Sul and the ICTA - Institute of Science and Technology of Food for the space, equipment and support.

References

APLEVICZ, K.S. **Identificação de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural obtido a partir de uma e sua aplicação em pães**. Phd thesis, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013. 162 p.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1980, 838 p.

CANELLA-RAWLS, S. **Pão: arte e ciência**. 3 ed. São Paulo: Senac, 2009. 320 p.

CARR, L.G. **Análises físicas, de textura e sensorial de pão francês pré-assado congelado**. Dissertação de Mestrado, Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003. 100 p.

CARR, L. G.; RODAS, M. A. B.; DELLA TORRE, J. C. M.; TADINI, C. C. Physical, textural and sensory characteristics of 7-day frozen part-baked French bread. **Lebensmittel – Wissenschaft und – Technologie**, New York, v. 39, n. 5, p. 540-547, 2006.

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

CHANG, L.T.; ELANDER, R.P. Long-term preservation of industrially important microorganisms. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A., (Ed.) **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: CRC Press, 1986. cap. 5, p. 49-55.

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

CLARKE, C.I. et al. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. **European**

Food Research and Technology, Berlin, v.217, p.23-33, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-003-0724-1>>. Acesso em: 08 dez. 2013. doi: 10.1007/s00217-003-0724-1.

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

DOS SANTOS, T. P. R. **Produção de amido modificado de mandioca com propriedades de expansão**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2012. 96 p.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v.37, p.2-10, 2014.

GOBBETTI, M. et al. The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.41, p.456-460, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01982535>>. Acesso em: 15 dez. 2013. doi: 10.1007/BF01982535.

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

GUTKOSKI, L.C., DOS SANTOS, E. Study of the formulation on production of frozen no fermented french type bread. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, p.347-352, 2004.

HOU, G.G., HSU, Y. H. Comparing fermentation gas production between wheat and apple sourdough starters using the Risograph. **Food Bioscience**, v.3, p. 75-81, 2013.

KIRSOP, B.E. Maintenance of yeasts. In: KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S., (Ed.) **Maintenance of microorganisms**. London: Academic Press, 1984. cap.12, p. 109-130.

KOMLENIC, D.K.; UGARCIC-HARDI, Z.; JUKIC, M.; PLANINIC, M.; BUCIC-KOJIC, A.; STRELEC, I. Wheat dough rheology and bread quality effected by *Lactobacillus brevis* preferment, dry sourdough and lactic acid addition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1417-1425, 2010.

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

MCGUIRE, R.G. Reporting of objective color measurements. **Horticultural Science**, v. 27, p. 1254-1555, 1992.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 5.ed. USA: John

Wiley & Sons, 2001. 684p.

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

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

PURLIS, E.; SALVADORI, V. O. Modelling the browning of bread during baking. **Food Research International**, Amsterdam, v. 42, n. 9, p. 865-870, 2009.

PURLIS, E. Bread baking: technological considerations based on process modeling and simulation. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p.92-102, 2011.

ROSELL, C. M.; HAROS, M.; ESCRIVA, C.; BENEDITO, de Barber C. Experimental approach to optimize the use of α -amylases in breadmaking. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, p.2973–2977, 2001.

STIKIC, R.; GLAMOCLIJAJ, D.; DEMIN, M.; VUCELIC-RADOVIC, B.; JOVANOVIC, Z.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; JACOBSEN, S.-E.; MILOVANOVIC, M. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (quinoa Willd.) as an ingredient in bread formulations. **Journal of Cereal Science**, v.55, n.2, p.132-138, 2012.

SZCZESNIAK, A. S. Sensory texture profiling – historical and scientific perspectives. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 8, p. 54-57, 1998.

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

VIGANÓ, G. S., GUARIENTI, C., FACHINI, F. P., COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., & COSTA, J. A. V. Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente à *Spirulina platensis*. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, 7(supl. 1). 2012.

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

Capítulo III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu isolar sete leveduras a partir de frutas orgânicas e selecionar três delas para aplicação em um planejamento de misturas que avaliou pães produzidos através da determinação de cor, volume específico, textura da crosta e do miolo e espessura da crosta.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que viabilidade celular é mantida durante a liofilização, sendo este processo adequado para a manutenção das leveduras estudadas.

O delineamento experimental de misturas, nos mostra a influência significativa dos componentes puros, para as respostas peso, textura do miolo e espessura da crosta.

A mistura ternária (X1, X2, X3) influenciou diretamente as respostas de cor e textura do miolo.

Existe uma tendência para se obter pães com melhor qualidade envolvendo a levedura X1.

Sugere-se, para estudos futuros, projetar novas misturas em outras proporções, que possam ser utilizadas como partida para a fermentação natural, visando melhorar o volume específico, a cor, a textura da crosta e do miolo e a espessura da crosta dos pães; realizar estudo detalhado da rota metabólica das leveduras e seu envolvimento na produção de gás; adequar a análise da reofermentografia para as condições das leveduras estudadas, para que sejam obtidos os parâmetros de produção de gás e sua retenção na massa do pão; efetuar a caracterização genotípica e fenotípica das leveduras escolhidas durante este estudo; a análise cromatográfica dos compostos voláteis dos pães produzidos com as leveduras pesquisados, realizar análise sensorial dos pães produzidos e associar seus resultados aos obtidos nas análises físicas realizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APLEVICZ, K.S. **Identificação de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural obtido a partir de uma e sua aplicação em pães.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013. 162 p.

ARAÚJO, W.M.C.; MONTEBELLO, N.D.P.; BOTELHO, R.B.A.; BORGIO, L.A. **Alquimia dos alimentos.** Série alimentos e bebidas, v. 2. Senac: Brasília, 2008. 560 p.

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

BARNETT, J.; PAYNE, R.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification.** 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BIANCHINI, M.C. **Desenvolvimento de fermento natural seco para produção de panetone.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003.** Dispõe sobre agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília; 2003. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtoArvore&tipo=LEI&numeroAto=00010831&seqAto=000&valorAno=2003&orgao=NI&codTipo=&desItem=&desItemFim=>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. **Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005.** Aprova o “Regulamento Técnico Para Produtos de Cereais, amidos, farinhas e farelos”, constante no Anexo desta Resolução. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>>. Acesso em: 15 out. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar. **Resolução RDC nº 271, 09/2005.** Regulamento Técnico **Diário Oficial da União.** Brasília-DF, 2005b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index_ato.htm>. Acesso em: 10 nov. 2013

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Decreto Nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007**. Regulamenta a Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Brasília; 2007. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtoArvore&tipo=DEC&numeroAto=00006323&seqAto=000&valorAno=2007&orgao=NI&codTipo=&desItem=&desItemFim=>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

CANELLA-RAWLS, S. **Pão: arte e ciência**. 3 ed. São Paulo: Senac, 2009. 320p.

CARR, L.G. **Análises físicas, de textura e sensorial de pão francês pré-assado congelado**. Dissertação de Mestrado, Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003. 100 p.

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

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

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. Grupo A, 2010.

DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. Industrial microbiology. **Scientific American**, v. 245, p.43-50, 1981.

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

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

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

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; HARTH, H.; HUYS, G.; DANIEL, H.-M.; WECKX, S. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? **Food Microbiology**, v. 37, p. 11-29, 2014.

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

EL-DASH, A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. Série tecnologia agroindustrial, n. 6. Secretaria da Indústria,

Comércio, Ciência e Tecnologia: São Paulo, 1983. 350 p.

EL-DASH, A.; CAMPOS, J.E.; GERMANI, R. Tecnologia de farinhas mistas. **Uso de Farinha Mista de Trigo e Sorgo na Produção de Pães**. v. 4. Embrapa: Brasília, 1994.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras Isoladas de Produtos Frutícolas: Capacidade Fermentativa e Estudos sobre a H⁺-Atpase da Membrana Plasmática**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2008. 201 p.

FLORES, C.L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in nonconventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507-529, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO Regional Conference for Europe: food safety and quality as affected by organic farming**, 32^a, 24-28 July 2000. Porto, Portugal; 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/meeting/X4983e.htm#b4>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Culturas de Tuberosas amiláceas latino americanas: Propriedades gerais do amido**. Fundação Cargill, Campinas. 2002.

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

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

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

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

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

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

HOEFKENS, C.; VERBEKE, W.; AERTSENS, MONDELAERS K.; VAN CAMP

J. The nutritional and toxicological value of organic vegetables: Consumer perception versus scientific evidence. **British Food Journal**, Bingley, v. 111, n. 10, p. 1062-1077, 2009. HYPERLINK "http://dx.doi.org/10.1108/00070700910992916" \t "_blank" <http://dx.doi.org/10.1108/00070700910992916>

KENT, N.L.; EVERS, A.D. **Technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1994. 334 p.

KHATOUNIAN, C.A. A reconstrução ecológica da agricultura. Ed. Agroecologia: Botucatu, 2001. 348 p.

KURTZMAN, Cletus, Jack W. FELL, and Teun BOEKHOUT, eds. **The yeasts: a taxonomic study**. Vol. 1. Elsevier, 2011.

LACERDA, Y. S. **Resistência das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ao fungicida Benomyl**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, CCB, Genética. Recife, 2002, 36 p.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.

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

MARCON, M.J.A.; AVANCINI, S.R.P.; AMANTE, E.R.(2007). **Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo**. Florianópolis: UFSC, 101p.

MATUDA, T.G. **Estudo do congelamento da massa de pão: determinação experimental das propriedades termofísicas e desempenho de panificação**. Tese de Doutorado, Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008. 153 p.

MCGUIRE, D.R.S. **Seleção e caracterização de leveduras “starter” a partir de populações autóctones de mosto**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2010. 47 p.

National Starch and Chemical Industrial Ltda (1995) – Divisão de Amidos Alimentícios. **Tecnologia de amido alimentício**. 13 p.

NEPOMUCENA, T.M; SILVA, A.M; CIRILLO, M.A. Modelos Ridge em Planejamentos de Misturas: Uma Aplicação na Extração da Polpa de Pequi.

Química Nova, v.36, p. 159-164, 2013.

OLIVEIRA, A. A. C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009. 101 p.

OSÓRIO, E.A.; WENDT, W. Duração do período de formação do grão de trigo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n.2 , p. 395-398, 1995.

PAREYT, B; FINNIE, S. M.; PUTSEYS, J. A.; DELCOUR, J. A. Lipids in bread making: sources, interactions, and impact on bread quality. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p.266-279, 2011.

PAVANELLI, A.P. **Aditivos para panificação: conceitos e funcionalidade**. Artigo Técnico. Associação Brasileira da Indústria de Aditivos e Melhoradores para Alimentos e Bebidas - ABIAM, 2000.

PEREZ-ORTIN, J.E.; MATAALLANA, E. and FRANCO, L. Chromatin structure of yeast genes. **Yeast**. v. 5, p. 219-238, 1989.

PHAFF, H.J, LABEDA (ed). Isolation of yeast from natural sources. In: **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**, US Mc- Graw-Hill Inc. p. 53-59, 1990.

PHAFF, H.J.; STAMER, W.T. Yeast associated with plants, insects and soil. In: **The Yeast**. London Academic Press. v. 1, p. 123-180, 1987.

PRIMAVESI, A. A alimentação no século. XXI. In: Encontro de processos de proteção de plantas: controle ecológico de pragas e doenças, 1. **Anais...** Ed. Agroecologia: Botucatu, p.7-12. 2001.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technol. Biotechnol.** v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003

PYLER, E.J.; GORTON, L.A. **Baking science & technology**. 4 ed. Kansas City: Sosland Publishing, 2008. v. 1, 772p.

QUAGLIA, G. **Ciência y tecnología da la panificación**. Zaragoza: Acribia, 1991.

REALE, A.; DI RENZO, T.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Microbiological and Fermentative Properties of Baker's Yeast Starter Used in Breadmaking. **Journal of Food Science**, v.78, p.1224-1231, 2013.

RIBOTTA, P. D.; TADINI, C. C., eds. **Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados**. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2009. 327p.

RICKARD, J.E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science**. 31, 189-207. 1991.

SCHMIDT-HEBBEL, H. **Avances em ciência y tecnología de los alimentos: edición actualizada y ampliada**. Santiago: Merck Química Chilena, 1981. 265 p.

SCIALABBA, N. E. **Global Trends in Organic Agriculture Markets and Countries' Demand for FAO Assistance**. Roma: FAO, 2005.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: An introduction**. 10 ed. Pearson: São Francisco, 2010.

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

VIEIRA, E. N. R. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminos bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011. 167 p.

WALT, J. P. Vander.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGGER-VAN RIJ, N. S. W. (Ed). **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104, 1984.

ZEPEDA, L.; LI, J. **Characteristics of Organic Food Shoppers**. Journal of Agricultural and Applied Economics, v. 39, p. 17-28, 2007.