

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS

Raquel Facco Stefanello

**PRODUÇÃO DE PANETONE UTILIZANDO BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTO NATURAL  
LIOFILIZADO**

Santa Maria, RS  
2018



**Raquel Facco Stefanello**

**PRODUÇÃO DE PANETONE UTILIZANDO BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E  
LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leadir Lucy Martins Fries

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Venturini Copetti

Santa Maria, RS  
2018

Stefanello, Raquel  
PRODUÇÃO DE PANETONE UTILIZANDO BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTO NATURAL  
LIOFILIZADO / Raquel Stefanello.- 2018.  
163 p.; 30 cm

Orientadora: Leadir Lucy Martins Fries  
Coorientadora: Marina Venturini Copetti  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. Aceitação 2. Crioprotetor 3. Fermento natural 4.  
Vida útil 5. Criodessecação I. Martins Fries, Leadir Lucy  
II. Venturini Copetti, Marina III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Raquel Facco Stefanello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: rfstefanello@gmail.com

**Raquel Facco Stefanello**

**PRODUÇÃO DE PANETONE UTILIZANDO BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E  
LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Aprovada em 30 de maio de 2018:**

---

**Leadir Lucy Martins Fries, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Marina Venturini Copetti, Dra. (UFSM)**  
(Co-Orientador)

---

**Martha Zavariz de Miranda, Dra. (EMBRAPA)**

---

**Paula Fernanda Pinto da Costa, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Marlene Terezinha Lovatto, Dra. (UFSM)**

---

**Edi Franciele Ries, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2018



## DEDICATÓRIA



*Ao meu amado e esperado filho Marco Antônio*





## AGRADECIMENTOS

À Deus. Força, foco e fé.

À meus pais, Jaime e Ana Rita. Amor incondicional.

Ao meu irmão, Tobias. Respeito e admiração.

Ao meu noivo, Cleber. Amor, carinho e muita compreensão.

Às minhas professoras orientadoras Dra. Leadir Fries e Dra. Marina Copetti.

Pela colaboração das professoras Dra. Marlene Lovatto (panificação) e Dra. Luisa H. (sensorial).

Pelas contribuições das professoras avaliadoras Dra. Edi Franciele Ries, Dra. Paula Costa, Pesquisadora Martha Z. de Miranda e Dra. Marlene Lovatto.

Pela dedicação e supervisão da pesquisadora Dra. Elizabeth Harumi Nabeshima.

Ao ITAL pela concessão do estágio e ao Cereal Chocotec, Cetea, CCQA, TecnoLat e Lafise pela possibilidade de pesquisa e realização das análises.

Ao professor Dr. Anderson de Souza Sant'anna e por toda a infra-estrutura do Laboratório de Microbiologia Preditiva e Quantitativa de Alimentos (UNICAMP).

À Mary Ângela Favaro Perez. Uma pessoa iluminada que me acolheu em Campinas, SP. Obrigada pela amizade, acolhida e compreensão.

À toda equipe do laboratório de Micologia dos Alimentos (UFSM). Em especial ao Marcelo Garcia que dedicou parte de seu doutorado para a realização de um experimento dedicado aos panetones.

À Prof. Dra. Marlise pela ajuda com as análises de biologia molecular.

Ao professor Dr. Paulo Pacheco (Paulinho) da UFSM que sempre esteve de portas abertas para ajudar com as análises estatísticas da pesquisa.

Às amigas Mariana e Carine. Sempre juntas!

À Amanda Rosito e Raquel Machado pela ajuda e compreensão interminável nas análises.

À Rosane Heck pela colaboração nos softwares de estatística.

Ao pessoal do CBMEG da UNICAMP que me ajudaram com os protocolos de extração de DNA assim como as análises qualitativas.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSM pelo esclarecimento de dúvidas e apoio científico e burocrático.

Aos servidores da UFSM e todos os participantes da pesquisa de análise sensorial que se dispuseram a responder a avaliação.



## RESUMO

### PRODUÇÃO DE PANETONE UTILIZANDO BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO

AUTORA: Raquel Facco Stefanello

ORIENTADORA: Profa. Dra. Leadir Lucy Martins Fries

O fermento natural (*sourdough*) é uma mistura composta por farinha de trigo e água sendo fermentada pela ação de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras, utilizado para elaboração de alguns produtos de panificação, como o panetone. O panetone é um produto tipicamente comercializado no período natalino e apresenta uma longa vida útil, em parte devido às características de pH e tipo de fermentação à que a massa é submetida. Os micro-organismos envolvidos na fermentação natural são diversos, com microbiota predominante composta por leveduras e bactérias ácido lácticas. Durante sua multiplicação, estes micro-organismos produzem metabólitos capazes de imprimir características sensoriais peculiares aos produtos, bem como modificar características físico-químicas e de estabilidade à deterioração fúngica. A identificação destes micro-organismos é fundamental para possibilitar estudos de interação entre as comunidades microbianas, e seu isolamento e conservação são fundamentais para utilização industrial dos mesmos como fermentos iniciadores. Esta tese de doutorado objetivou avaliar a influência de um *sourdough* composto por bactérias ácido lácticas e leveduras na estabilidade microbiológica de panetones, visando o aumento da vida útil sem a adição de conservantes químicos. Para tanto, inicialmente os micro-organismos predominantes nas matérias-primas (farinha de trigo refinada, farinha de trigo integral) e *sourdough* foram isolados nos meios de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e Sabourand Dextrose Agar (DAS) e foram identificados através de sequenciamento molecular. Posteriormente, algumas espécies micro-organismos foram selecionadas, com base em literatura científica, para avaliação de seu potencial para uso na elaboração de panetones. Um dos limitantes para uso em larga escala destes micro-organismos é a manutenção de sua viabilidade e características ao longo do tempo. Assim, foram conduzidos estudos liofilizando-se alguns micro-organismos isolados com diferentes agentes crioprotetores (sacarose, trealose, leite desnatado e glutamato de sódio) e avaliou-se sua viabilidade ao longo da estocagem em temperatura ambiente. Por fim foram testadas diferentes formulações e foram elaborados panetones com estes micro-organismos liofilizados, os quais foram caracterizados físico-química (firmeza instrumental, volume específico, cor, umidade, atividade de água, pH e acidez total titulável), sensorial (*check-all-that-apply* - CATA, aceitabilidade e intenção de compra) e microbiologicamente (enumeração de bolores e leveduras). Os micro-organismos predominantes recuperados e identificados a partir das matérias primas e do *sourdough* liofilizado foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* (Syn. *Pichia anomala*), *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*. A adição de trealose promoveu um efeito crioprotetor nos micro-organismos e foi mais significativa para as leveduras. Trehalose proporcionou taxas de viabilidade satisfatórias apenas para *W. anomalus* durante um ano de armazenamento a temperatura ambiente. Já as soluções com 10% de leite desnatado mais 5% de glutamato de sódio mantiveram os maiores índices de estabilidade celular para *Lb. fermentum* e *W. anomalus* durante o período de armazenamento. O preparo de panetones a partir de cepas selecionadas e sem conservantes artificiais, mostrou-se como uma alternativa mais natural e promissora tendo em vista que foi bem aceito sensorialmente. O panetone elaborado com 50% de *Lb. fermentum* e 50% de *W. anomalus* foi o que apresentou as melhores características físico-químicas e microbiológicas. Pelo teste CATA foi possível observar uma clara distinção entre os panetones elaborados com *sourdough* dos elaborados com fermento comercial. Os panetones artesanais mostraram-se bastante competitivos frente aos panetones controle e comercial mostrando-se mais macios durante todo o período de vida útil. O panetone comercial apresentou notas mais altas no teste de aceitação, no entanto manteve-se estável por apenas 30 dias. Os panetones

elaborados com *sourdough* embora apresentassem condições suscetíveis ao crescimento fúngico, como a alta atividade de água, não mofaram até os 126 dias de armazenamento. A utilização de *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533 como *starters* na produção de panetones sem conservantes artificiais pode ser considerada uma alternativa tecnológica promissora e que atende à forte demanda de consumidores por produtos mais naturais.

**Palavras-chave:** Aceitação. Crioprotetor. Fermento natural. Vida útil. Criodessecação. Pão doce.

## ABSTRACT

### PANETONE PRODUCTION USING LACTIC ACID BACTERIA AND ISOLATED YEASTS OF LIOFILIZED SOURDOUGH

AUTHOR: Raquel Facco Stefanello  
ADVISOR: Profa. Dra. Leadir Lucy Martins Fries

Natural yeast (sourdough) is a mixture composed of wheat flour and water being fermented by the action of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, used to make some bakery products, such as panettone. Panettone is a product typically marketed in the Christmas period and has a long shelf life, in part due to the pH characteristics and the type of fermentation to which the dough is subjected. The microorganisms involved in the natural fermentation are diverse, with predominant microbiota composed of yeasts and lactic acid bacteria. During their multiplication, these microorganisms produce metabolites able to imprint peculiar sensorial characteristics to the products, as well as to modify physical-chemical characteristics and of stability to the fungal deterioration. The identification of these microorganisms is fundamental to enable studies of interaction between microbial communities, and their isolation and conservation are fundamental for their industrial use as starter yeasts. This doctoral thesis aimed to evaluate the influence of a sourdough composed of lactic acid bacteria and yeasts on the microbiological stability of panettones, aiming to increase the shelf life without the addition of chemical preservatives. To that end, initially the predominant microorganisms in the raw materials (refined wheat flour, wholewheat flour) and sourdough were isolated in the media from Man, Rogosa and Sharpe (MRS) and Sabourand Dextrose Agar (SDA) and were identified through sequencing. Subsequently, some species of microorganisms were selected, based on scientific literature, to evaluate their potential for use in the elaboration of panettones. One of the constraints for large-scale use of these microorganisms is the maintenance of their viability and characteristics over time. Thus, studies were conducted by freeze-drying some isolated microorganisms with different cryoprotectants (sucrose, trehalose, skim milk and sodium glutamate) and evaluated their viability throughout the storage at room temperature. Finally, different formulations were prepared and panettones were elaborated with these freeze-dried microorganisms, which were characterized physicochemistry (instrumental firmness, specific volume, color, moisture, water activity, pH and titratable total acidity), sensorial (check- all-that-apply - CATA, acceptability and purchase intent) and microbiologically (enumeration of molds and yeasts). The predominant microorganisms recovered and identified from the raw materials and freeze-dried sourdough were *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* (Syn. *Pichia anomala*), *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. The addition of trehalose promoted a cryoprotective effect on the microorganisms and was more significant for the yeasts. Trehalose provided satisfactory viability rates only for *W. anomalus* during one year of storage at room temperature. On the other hand, the solutions with 10% of skimmed milk plus 5% of sodium glutamate maintained the highest indexes of cellular stability for *Lb. fermentum* and *W. anomalus* during the storage period. The preparation of panettones from selected strains and without artificial preservatives proved to be a more natural and promising alternative in view of the fact that it was well accepted in the sensory field. The panettone made with 50% *Lb. fermentum* and 50% of *W. anomalus* presented the best physico-chemical and microbiological characteristics. By the CATA test it was possible to observe a clear distinction between the panettones elaborated with sourdough of those made with commercial yeast. The artisanal panettones proved to be very competitive in comparison to the control and commercial panettones showing more soft throughout the useful shelf life. The commercial panettone showed higher marks in the acceptance test, however it remained stable for only 30 days. Panettones made with sourdough, although presenting conditions susceptible to fungal growth, such as high water activity, did not mold until the 126 days of storage. The use of *Lb. fermentum* IAL 4541 and *W. anomalus* IAL 4533 as starters in the

production of panettones without artificial preservatives can be considered a promising technological alternative that meets the strong demand of consumers for more natural products.

**Key words:** Acceptance. Cryoprotectant. Sourdough. Shelf life. Criodessection. Sweet bread.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### APRESENTAÇÃO

- Figura 1 – Etapa de pesagem dos fermentos naturais antes da liofilização (a-b) e aspecto final após processo de secagem (c).....39
- Figura 2 – Obtenção do inóculo de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 para liofilização.....43
- Figura 3 – Preparo do sourdough a partir dos inóculos de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 em sete etapas. Onde D: dough (massa), de 1 a 7 e SD: sourdough (fermento natural), de 1 a 7. ....47
- Figura 4 – Processo de elaboração do panetone.....53

### 5.2 ARTIGO 2

- Figure 1 – Production and propagation of a spontaneous sourdough from the blend of refined wheat flour (RWF) and whole wheat flour) during 14 days. Relative humidity (RH).....67
- Figure 2 - Process of freeze-drying of spontaneous sourdough (SS): SSO: spontaneous sourdough without threalose; SST10: spontaneous sourdough with 10% threalose, SST15: spontaneous sourdough with 15% threalose.....68
- Figure 3 - Survival of LAB(a) and yeasts(b) measured at total viable counts before freezing, after freezing, after freeze-drying, and after 15, 30, and 45 days of storage and expressed as the logarithm of CFU/mL.....70

### 5.3 ARTIGO 3

- Figure 1 - Viability (Log CFU/g or ml) of *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) (a) and *Wickerhamomyces anomalus* (IAL 4533) (b) using different CPAs at room temperature for 365 days.....89

### 5.4 ARTIGO 4

- Figure 1 - Sourdough preparation scheme.....119
- Figure 2 - Preparation of panettones.....120
- Figure 3 - Water activity - Aw (a), pH (b) and titratable total acidity - TTA (c) of panettones up to 140 days of storage.....121
- Figure 4 - Sample representation and terms in the first (F1) and second (F2) dimensions of the correspondence analysis performed on check-all-that-apply (CATA) data questions on panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 (LF), *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (WA) and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.....122
- Figure 5 - Results of the buy intention of panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541, *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with calcium propionate (CP) as artificial preservative and commercial panettone (Number of participants= 140).....123





## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

Tabela 1. Linhagens depositadas no Núcleo de Coleção de Micro-organismos do IAL.....	41
Tabela 2. Classificação do trigo conforme Regulamento técnico do trigo publicado na Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. ....	49
Tabela 3. Caracterização da farinha de trigo refinada.....	49
Tabela 4. Formulação final utilizada no preparo dos panetones. ....	52

### 5.2 ARTIGO 2

Table 1. pH, total titrable acidity (TTA) and counts (LOG CFU/mL) of LAB and yeasts on spontaneous sourdough (SS) during the production period (14 days) at 30 C°.....	69
Table 2. Species of bactéria and yeasts identified in refined wheat flour (RWF), wholewheat flour (WWF), spontaneous sourdough without threalose (SS0), spontaneous sourdough with 10% threalose (SST) through the sequence of a fragment of the gene 16s rDNA of D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rDNA region for bactéria and yeasts respectively.....	71

### 5.4 ARTIGO 4

Table 1 - Description of the treatments with the % used of the <i>Lactobacillus fermentum</i> strains IAL 4541 (LF) and <i>Wickerhamomyces anomalus</i> IAL 4533 (WA) in the sourdough preparation. Control trials using the commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.....	112
Table 2 - Panettone formulations.....	113
Table 3 - Monitoring the instrumental firmness of panettones during 140 days of storage .....	114
Table 4 - Specific volume, moisture and instrumental color of panettones made with the strains of <i>Lactobacillus fermentum</i> IAL 4541 (LF) and <i>Wickerhamomyces anomalus</i> IAL 4533 (WA) and panettones using the commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.....	115
Table 5. Microbiological counts of molds and yeasts of panettones made with <i>Lactobacillus fermentum</i> IAL 4541 (LF), <i>Wickerhamomyces anomalus</i> IAL 4533 (WA) and commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with (CP) and without calcium propionate (Control) as an artificial preservative during 140 days of storage.....	116
Table 6. Results of the acceptance test of panettones made with <i>Lactobacillus fermentum</i> IAL 4541, <i>Wickerhamomyces anomalus</i> IAL 4533 and commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with calcium propionate (CP) as artificial preservative and commercial panettone.....	117



## LISTA DE QUADROS

### APRESENTAÇÃO

Quadro 1. Cepas identificadas no fermento natural e meio utilizado para a manutenção.....	440
---	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIMAPI	Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias, Pães e Bolos
ANOVA	Análise de Variância
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
CATA	Método Check – All – That - Apply
FNL	Fermento Natural Liofilizado
GRAS	Generally Recognized As Safe
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NCMO	Núcleo de Coleção de Micro-organismos
PDA	Potato Dextrose agar
RWF	Refined Wheat Flour
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTA	Titrateable acidity
UE	União Européia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WWF	Whole Wheat Flour
YM	Yeast Malt
SDA	Sabourand Dextrose Agar



## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	176
1 INTRODUÇÃO .....	197
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 PANIFICAÇÃO .....	21
3.1.1 Panetone .....	22
3.2 QUALIDADE DOS PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO .....	25
3.2.1 Deterioração fúngica.....	25
3.3 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE PÃES.....	26
3.4 BIOCONSERVAÇÃO .....	27
3.5 FERMENTO NATURAL ( <i>SOURDOUGH</i> ).....	28
3.5.1 Micro-organismos presentes e compostos gerados no <i>sourdough</i> .....	29
3.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	30
3.6.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	33
3.7 LIOFILIZAÇÃO .....	34
3.7.1 Agentes crioprotetores .....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1 MATERIAIS .....	37
4.1.1 Farinha de trigo refinada .....	37
4.1.2 Reagentes, materiais e utensílios para a liofilização .....	37
4.1.3 Insumos da formulação do panetone .....	37
4.2 MÉTODOS .....	38
4.2.1 Produção do fermento natural liofilizado.....	38
4.2.2 Viabilidade do FNL .....	38
4.2.3 Identificação molecular dos micro-organismos .....	39
4.2.4 Manutenção das cepas identificadas .....	40
4.2.5 Depósito das cepas identificadas na coleção Adolfo Lutz.....	40
4.2.6 Crescimento e multiplicação das cepas identificadas.....	42
4.2.7 Soluções crioprotetoras e liofilização de <i>Lactobacillus fermentum</i> ial 4541 e <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ial 4533.....	43
4.2.8 Viabilidade de <i>Lb. fermentum</i> ial 4541 e <i>W. anomalus</i> ial 4533 durante 365 dias em temperatura ambiente .....	44
4.2.9 Preparo de <i>sourdough</i> com as cepas selecionadas .....	44
4.2.10 Caracterização do <i>sourdough</i> .....	46
4.2.11 Insumos e formulação de panetones .....	47
4.2.12 Aplicação do <i>sourdough</i> na formulação e elaboração de panetones .....	50
4.2.13 Caracterização e análises dos panetones.....	53
4.2.14 Vida útil dos panetones .....	55

<b>4.2.15 Comitê de ética e pesquisa</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.16 Análise estatística</b> .....	<b>56</b>
<b>5 ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS</b> .....	<b>57</b>
5.1 ARTIGO 1 – NATURAL CONSERVATION ATTACHED TO THE USE OF MICROORGANISMS .....	57
5.2 ARTIGO 2 – TREHALOSE AS A CRYOPROTECTANT IN FREEZE-DRIED WHEAT SOURDOUGH PRODUCTION.....	65
5.3 ARTIGO 3 – CRYOPROTECTANT EFFECT OF DIFFERENT SOLUTIONS ON THE VIABILITY OF STRAINS OF LACTOBACILLUS FERMENTUM IAL 4541 AND WICKERHAMOMYCES ANOMALUS IAL 4533 ISOLATED FROM A SOURDOUGH AFTER FREEZE-DRYING PROCESS .....	74
5.4 ARTIGO 4 – THE USE OF CHECK-ALL-THAT-APPLY (CATA) TO DETERMINE THE SENSORY ATTRIBUTES IN PANETTONES ELABORATED WITH LACTOBACILLUS FERMENTUM IAL 4541 AND WICKERHAMOMYCES ANOMALLUS IAL 4533 .....	91
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>125</b>
6.1 ELABORAÇÃO DO FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PREDOMINANTES.....	125
6.2 VIABILIDADE CELULAR DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> IAL 4541 E <i>WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</i> IAL 4533 À LIOFILIZAÇÃO.....	128
6.3 PRODUÇÃO DE PANETONES A PARTIR DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> IAL 4541 E <i>WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</i> IAL 4533 COMO STARTERS .....	130
<b>7 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>135</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>136</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>138</b>
<b>APÊNDICE A – APARELHOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO</b> .....	<b>154</b>
<b>APÊNDICE B – RESULTADO DA FARINOGRAFIA</b> .....	<b>155</b>
<b>APÊNDICE C – RESULTADO DA ALVEOGRAFIA</b> .....	<b>156</b>
<b>APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b> .....	<b>157</b>
<b>APÊNDICE E – CONVITE PARA A REALIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PANETONES</b> .....	<b>158</b>
<b>APÊNDICE F - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DISTRIBUÍDA PARA OS PARTICIPANTES</b> .....	<b>159</b>
<b>APÊNDICE G - FORMULAÇÕES DO PANETONE (PARTE 1)</b> .....	<b>160</b>
<b>APÊNDICE H – FORMULAÇÕES DO PANETONE (PARTE 2)</b> .....	<b>161</b>
<b>APÊNDICE I – FORMULAÇÕES DO PANETONE (PARTE 3)</b> .....	<b>162</b>
<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE LINHAGENS</b> .....	<b>163</b>



## **APRESENTAÇÃO**

Essa tese segue as normas estabelecidas na Estrutura e Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses – MDT da UFSM (UFSM, 2015). Os resultados estão apresentados na forma de quatro artigos científicos, sendo um de revisão bibliográfica, e três com resultados da pesquisa. Ao final dessa tese, encontram-se os itens DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÕES, apresentando uma compilação de interpretações e comentários a respeito dos resultados apresentados nos artigos científicos.



## 1 INTRODUÇÃO

O pão é um dos alimentos básicos mais importantes e consumidos pelas pessoas que se alimentam de uma dieta com produtos elaborados com farinha de trigo. Isto o torna parte importante da nossa dieta diária e, portanto, é relevante a busca de maneiras para melhorar sua qualidade e aumentar sua vida útil (CHAUDHARY, 1991). Dentre as variedades de pães, encontra-se o panetone, pão doce, com frutas cristalizadas, uvas-passas, amêndoas ou chocolate como ingredientes opcionais, originário da Itália e preparado principalmente para os períodos natalinos (BENEJAM; STEFFONALI; LEÓN, 2009).

Inúmeros fatores podem causar o envelhecimento de panificados a base de farinha de trigo (RYAN; DAL BELLO; ARENDT, 2008), no entanto os fungos são agentes deteriorantes causadores de perdas econômicas relevantes para a indústria de panificação, diminuindo vendas, causando a formação de odores desagradáveis, conhecidos como “off-flavors”, e ainda propicia a formação de substâncias prejudiciais à saúde, como as micotoxinas (SMITH et al., 2004, DALIÉ et al., 2010).

Para diminuir a contaminação por fungos nos produtos de padaria, a adoção de boas práticas de fabricação tem se mostrado eficiente e a utilização de conservantes químicos dificulta a germinação e o posterior crescimento fúngico (LEGAN, 1993).

Os fungos são organismos versáteis capazes de crescer em todos os tipos de alimentos, incluindo cereais, carnes e frutas. Eles são importantes deterioradores em diferentes alimentos, sobretudo quando os fatores intrínsecos impedem o desenvolvimento bacteriano. A deterioração fúngica do pão de trigo é causada principalmente por *Penicillium* spp., responsável por cerca de 90% da deterioração dos produtos fabricados com trigo (LEGAN; VOYSEY, 1991). Outros fungos comuns que deterioram os produtos de padaria pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (LEGAN, 1993).

Várias estratégias têm sido utilizadas para prolongar a vida útil dos produtos, tais como os tratamentos utilizando aplicação de calor, irradiação com raios infravermelhos ou micro-ondas, atmosfera modificada na embalagem e a adição de conservantes químicos, tais como: ácido sórbico, benzoico, propiônico e seus sais (GOULD, 1996, LEGAN, 1993; PATERAS, 1998).

Os empresários assim como as indústrias de transformação e processamento dos alimentos afirmam estar atentos com a crescente demanda por produtos mais naturais. Hoje e, dia os consumidores almejam alimentos mais saudáveis, com a mesma qualidade e que atendam aos requisitos de conservação e de segurança alimentar. A biotecnologia, aplicada ao processamento e à conservação de alimentos, é a tecnologia que, mediante a aplicação de um conjunto de técnicas e de processos que empregam organismos vivos ou substâncias provenientes destes, permite a produção ou a modificação de um alimento e o desenvolvimento de micro-organismos que intervêm nos processos de elaboração.

Já a biopreservação permite prolongar a vida útil dos alimentos e aumentar a segurança e a qualidade alimentar através da utilização de micro-organismos produtores de substâncias inibidoras que previnem o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos nos alimentos. Entre os sistemas de conservação, a biopreservação vem ganhando um destaque importante, uma vez que utiliza componentes naturais proporcionando a segurança aos alimentos (GALVEZ et al., 2008).

Entre os micro-organismos com propriedades antimicrobianas, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL), pois apresentam a capacidade de produzir compostos com efeitos fungistáticos ou fungicidas (VANDENBERGH, 1993; SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005; DALIÉ et al., 2010).

O uso de bactérias ácido lácticas (BAL) selecionadas, na elaboração de massa fermentada para a fabricação de pães tem uma longa história (HAMMES; GÄNZLE, 1998; MESSENS; DE VUYST, 2002). Estudo realizado com *sourdough* (RYAN; DAL BELLO; ARENDT, 2008) indicou claramente que a adição de fermento composto por BAL antifúngicas permitir reduzir a quantidade de agente químico necessário para garantir a segurança do pão. Rocken (1996) também observou que a atividade antifúngica do fermento natural podia estar estritamente relacionada com a produção de ácido acético.

A adição de fermento natural constituído por *Lactobacillus plantarum* FST 1,7 inibiu o crescimento de *Fusarium* spp. (DAL BELLO et al., 2007). Os compostos responsáveis por esta atividade antifúngica foram caracterizados quimicamente e demonstrado ser ácido láctico, ácido fenilático e outros dipeptídeos cíclicos. Esses metabólitos, oferecem bioconservação aos produtos tendo em vista a produção de compostos antimicrobianos naturais (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

A atividade sinérgica de fermento natural e a adição de ácido propiônico foram também investigadas (RYAN; DAL BELLO; ARENDT, 2008) e os resultados mostraram que a utilização de *sourdough* juntamente com ácido propiônico permitiu reduzir a adição de produtos químicos, como os conservantes artificiais, proporcionando a conservação em pães de trigo e garantindo vida útil aceitável.

Alguns estudos têm demonstrado a atividade antifúngica das BAL, em condições laboratoriais (LAVERMICOCCA et al., 2003; HASSAN; BULLERMAN, 2008) enquanto que outras investigações procuraram destacar a capacidade antifúngica de algumas cepas, impedindo a deterioração por fungos em produtos assados fermentados (LAVERMICOCCA et al., 2000; CODA et al., 2008; ZHANG et al., 2010; RIZZELLO et al., 2011; RYAN et al., 2011). A adição de fermento natural é uma prática comum na indústria de panificação para melhorar o prazo de validade do pão (HAMMES; GÄNZLE, 1998). Porém, de acordo com Casé et al. (2005) não basta saber que um determinado alimento é benéfico à saúde e seguro sem considerar sua aparência, textura, odor, pois estes aspectos têm papel importante na escolha dos alimentos.

Apesar do uso de várias técnicas para o controle de deteriorações dentro da indústria, a extensão da vida útil de produtos de panificação para atender às demandas continua sendo um problema atual (CORNEA et al., 2011; BELZ et al., 2012; DAGNAS et al., 2014; NAKHCHIAN et al., 2014). Assim, o desenvolvimento de estudos mais aprofundados com *sourdough* com propriedades antifúngicas, avaliando sua estabilidade, assim como as características sensoriais e de conservação, expressas em panetones ao longo da estocagem, mostra-se promissor e relevante.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de um fermento natural (*sourdough*) composto por bactérias ácido lácticas e leveduras na estabilidade microbiológica de panetones, visando o aumento da vida útil sem a adição de conservantes químicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os micro-organismos presentes em *sourdough* liofilizado, obtido a partir da mistura de farinha de trigo refinada e farinha de trigo integral;
- Testar agentes crioprotetores para garantir a manutenção de micro-organismos liofilizados em temperatura ambiente ao longo de um ano;
- Elaborar diferentes *sourdoughs* utilizando alguns dos micro-organismos identificados, caracterizando-os físico-química e microbiologicamente.
- Elaborar panetones utilizando *sourdoughs* produzidos com micro-organismos identificados e avaliar, ao longo da vida útil, as características tecnológicas, microbiológicas e físico-químicas;
- Realizar a análise sensorial dos panetones utilizando *sourdoughs* produzidos com micro-organismos identificados, comparando-os com panetones elaborados com levedura comercial (com e sem adição de conservantes artificiais) através do teste de aceitação e também pelo método Check-All-That-Apply (CATA);





### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PANIFICAÇÃO

A história do pão confunde-se com a história da própria humanidade. Os relatos sugerem que sua origem tenha sido a mais de seis mil anos antes de Cristo (CAUVAIN; YOUNG, 2009). De acordo com a Legislação Brasileira, pão é o produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes (ANVISA, 2000).

O que faz do pão esse alimento tão versátil? Como uma massa inicialmente sem paladar transforma-se em um alimento com textura leve e sabor intenso? Essas e outras questões podem ser respondidas pela presença de duas proteínas encontradas na farinha de trigo, a gliadina e a glutenina. Quando a farinha de trigo é misturada com algum líquido e é amassada, uma substância elástica chamada glúten desenvolve-se (CANELLA-RAWS, 2006). O glúten, dentre outras funções, aprisiona os gases formados pela fermentação de micro-organismos do fermento, comercial ou natural. Outras reações, como o ataque de enzimas ao amido da farinha e a quebra das moléculas de glicose em álcool e gás carbônico, proporcionam o crescimento da massa e suas características organolépticas, dando origem a um produto bastante procurado e saboroso (TEDRUS, 2003).

Além da qualidade dos ingredientes, o processo de preparação de pães é de fundamental importância e praticamente segue as seguintes etapas: mistura ou amassamento, fermentação e cozimento ou cocção. A mistura é a principal operação no processo, haja vista que nessa etapa ocorre a formação da estrutura da massa. Esta estrutura é formada pelo desenvolvimento da rede de glúten que é responsável pela retenção de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) liberado pelos micro-organismos que participam da fermentação, que juntamente com o vapor de água é expandido com o aumento da temperatura (PERTUZATTI et al., 2015).

Qualquer que seja o tipo de pão fabricado é importante que ele tenha qualidade aceitável para os consumidores e que as interações entre as diversas partes do processo sejam compatíveis e estejam em equilíbrio (CAUVAIN; YOUNG, 2009). O

grau de equilíbrio entre as matérias-primas, os procedimentos e o equipamento determina, além da qualidade do produto final, a consistência do mesmo. Depois do processo de mistura e desenvolvimento da massa o próximo estágio envolve a divisão da massa em peças de certo tamanho, necessárias para o processamento adicional e o assamento. O descanso dessas porções de massa é também chamado de fermentação intermediária, que significa ao estágio da panificação em que a massa repousa entre a modelagem e a fermentação final. O objetivo do descanso é produzir uma peça de massa macia, extensível e descansada. Na etapa seguinte, a modelagem, o objetivo é dar um formato correto para a massa e, ao mesmo, expelir o excesso de gás. Durante a fermentação final espera-se que a massa modelada repouse, se expanda e produza uma peça aerada de massa, que, depois de assada, terá o formato e o volume requeridos (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

Na etapa de cozimento ou assamento algumas modificações acontecem e contribuem para os aspectos sensoriais do produto como: vaporização de umidade, aumento de temperatura, aumento de volume (HOSENEY, 1991), transformação da viscosidade da massa e elasticidade do miolo do pão (PERTUZATTI et al., 2015), gelatinização do amido e a coagulação das proteínas (CAUVAIN; YOUNG, 2009). Essas reações, junto com a formação de uma casca, transformam uma peça de massa desagradável ao paladar em um pão saboroso e poroso (leve), agradável ao paladar. Após o assamento é necessário reduzir sua temperatura a um nível em que não sofra dano no momento de ser fatiado e embalado (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

### **3.1.1 Panetone**

Panetone é um pão doce assado ao forno, com origem em Milão, e preparado especialmente para a temporada de Natal e Ano Novo na Itália e em países da América Latina. Este produto é preparado a partir de uma massa doce e pela adição de ingredientes opcionais, tais como fruta cristalizada, passas, amêndoas ou chocolate (GAROFALO et al., 2008; BENEJAM; STEFFONALI; LEÓN, 2009). Não se sabe ao certo sobre seu surgimento, mas a versão mais aceita atualmente é a que diz que o panetone foi inventado por Gian Galeazzo Visconti, primeiro duque de Milão, que preparou a iguaria para uma festa em 1395 (TEDRUS, 2003). Com o passar do tempo, tomou conta da Itália e ganhou todo o mundo, sendo trazido ao Brasil pelos imigrantes italianos, após a Segunda Guerra Mundial.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos (ABIMAPI), o volume de vendas de panetones entre novembro de 2016 e janeiro de 2017 foi 34,3 mil toneladas, 12% a mais que o período anterior (2015/2016), movimentando aproximadamente R\$ 531,7 milhões (INDÚSTRIA..., 2018).

Segundo a ANVISA (2000), panetone é o produto fermentado, preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo, açúcar, gordura(s), ovos, leite e sal (cloreto de sódio). Em relação às características físico-químicas, o panetone deve conter no máximo 30 g/100g de umidade, 6,0 mL/100g de acidez e no mínimo 11 g/100g de lipídios.

O panetone é elaborado com ingredientes opcionais, como frutas cristalizadas, passas, amêndoas ou chocolate (BENEJAM; STEFFOLANI; LEÓN, 2009), costumeiramente consumido no período natalino (Gobbetti, 1998) e geralmente emprega a fermentação natural, contando com o auxílio da adição de *sourdough* ao processo para conferir um sabor diferenciado (BENEJAM; STEFFOLANI; LEÓN, 2009). Este *sourdough* é reproduzido continuamente (chamado "massa mãe"), através da propagação contínua de culturas *starters* escolhidas ou espontâneas (PICOZZI; ANCHISE; FOSCHINO, 2006).

O fermento natural usado nas formulações de panetone consiste basicamente da mistura de farinha, água e levedura que é deixada fermentar separadamente antes da incorporação dos outros ingredientes da massa (LAI; LIN, 2006). A grande parte das propriedades benéficas do *sourdough* são proporcionadas pela acidificação causada pelas bactérias ácido lácticas (SADEGHI, 2008). Este método ajuda a melhorar o aroma, por causa da liberação de compostos voláteis e aromáticos durante o processo de uma fermentação longa (HANSEN; HANSEN, 1996).

No Brasil, as maiores indústrias de panetone empregam a fermentação natural no processo industrial deste produto (TEDRUS, 2003). Em relação ao panetone fabricado em padarias e pequenas empresas, o sistema de fermentação empregado é o da massa-direta, ou seja, a massa é fermentada somente com a *Saccharomyces cerevisiae* em tempo relativamente curto, cerca de 1 a 2 horas de fermentação. Esta redução no tempo de fermentação da massa, em relação ao processo de fermentação natural, tem como consequência a obtenção de um produto com qualidade inferior (TEDRUS, 2003). Durante a produção industrial de panetone, os principais desafios

são produzir massa com capacidade de armazenar frutas e passas durante a confecção e a cocção, e obter produtos que mantenham sua qualidade durante o armazenamento (BENEJAM; STEFFOLANI; LEÓN, 2009).

### 3.2 QUALIDADE DOS PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO

Os pães são alimentos perecíveis que passam por mudanças físicas, químicas, sensoriais e microbiológicas durante o seu armazenamento. A diminuição da qualidade e/ou do frescor destes produtos está intimamente relacionada com o tempo de armazenamento e é conhecida como o envelhecimento do pão ou “*staling*”. A firmeza aumenta significativamente, a crocância da crosta do pão diminui, o pão perde seu aroma, assumindo um sabor rançoso. Esses fenômenos complexos são consequência da retrogradação dos grânulos de amido gelatinizados durante o cozimento, da troca de umidade entre o amido e as proteínas constituintes do pão, de aumento na interação entre a fração de proteína e amido, de uma redistribuição da água no pão e de remoção de moléculas aromáticas (DAL BELLO et al., 2007). Microbiologicamente, o principal grupo de micro-organismos deteriorantes de produtos de panificação são os fungos filamentosos ou bolores (DAL BELLO et al., 2007).

Devido à elevada ocorrência de fungos em produtos agrícolas armazenados, tais como trigo e milho (BIRO et al., 2009; PITT; HOCKING, 2009; CHEHRI et al., 2010; EGLEZOS et al., 2010; ASADZADEH et al., 2014), a deterioração fúngica é de particular interesse para a indústria de panificação (PITT; HOCKING, 2009) porque está diretamente ligada com a estabilidade dos pães. Este tipo de deterioração está fortemente relacionada à alta atividade de água deste produto. Além disso, o pão é uma excelente fonte de carboidratos e apresenta uma estrutura porosa que facilita a fixação de micélios fúngicos.

A ocorrência de bolores em alimentos constitui importante problema econômico. Na Europa Ocidental as perdas econômicas relacionadas à presença de fungos no pão foram estimadas em mais de 200 milhões de euros por ano (LEGAN, 1993). As perdas causadas pelo crescimento de fungos em produtos de panificação podem variar entre 1% e 5%, dependendo da estação do ano, do tipo de produto e do modo de produção (VEGA et al., 1998). Além dessas perdas com a deterioração alguns fungos são potencialmente perigosos para a saúde pública.

### 3.2.1 Deterioração fúngica

A deterioração de pães por fungos ocorre a partir do aparecimento do micélio visível proveniente de pelo menos um esporo que se desenvolveu na superfície do produto, evento este que pode ocorrer logo após o término da germinação e antes do final da vida útil do produto, ocasionado rejeição pelo consumidor (BAERT et al., 2007; DAGNAS; MEMBRÉ, 2013). Além da aparência indesejável, os fungos são responsáveis por alterações nas características sensoriais de sabor e odor dos produtos (NIELSEN; RIOS, 2000), devido à produção de exoenzimas, como lipases, proteases e carboidrases (FILTENBORG et al., 1996).

Dentre os fungos mais isolados e relacionados com a deterioração de produtos panificados estão os do gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* (LEGAN, 1993), enquanto que as leveduras potencialmente deteriorantes pertencem aos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Debaryomyces* (LEGAN; VOYSEY, 1991).

Alguns fungos são capazes de resistir a tratamentos químicos e também ao uso de certos conservantes. *Penicillium roqueforti* é usado como micro-organismo indicador em ensaios antifúngicos devido sua alta resistência aos conservantes químicos (CODA et al., 2008), e amplamente relacionado à deterioração de produtos de panificação. Por exemplo, alguns micro-organismos do gênero *Penicillium*, podem crescer na presença de sorbato de potássio (DAVIDSON, 2001) e outros fungos possuem a capacidade de degradar o sorbato (NIELSEN; DE BOER, 2000). *Penicillium polonicum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium albocoremium*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium carneum*, *Eurotium herbarium*, *Eurotium rubrum*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium bialowiezense* são algumas espécies relacionadas com a deterioração fúngica em alimentos assados (LAVERMICOCCA et al., 2000).

O nível de esporos de fungos no ar comumente associado às indústrias de panificação pode variar entre 100 a 2500 esporos/m<sup>3</sup> (CAUVAIN; YOUNG, 2007), e ao se depositarem nas superfícies dos pães já assados podem predispor à deterioração precoce. Além disso um elevado número de esporos fúngicos presentes na farinha e nos grãos, bem como as condições de higiene e de processo podem contribuir para contaminação do produto final (COOK; JOHNSON, 2009).

Por outro lado, a deterioração bacteriana de pão (“rope”) é causada principalmente por um micro-organismo chamado *Bacillus subtilis* (COLLIN et al., 1991), que pode ser proveniente das matérias-primas, da atmosfera da padaria e das superfícies dos equipamentos (BAILEY; VON HOLY, 1993), tornando-se uma grande preocupação, a nível econômico principalmente, na indústria de panificação (NIELSEN, 2003).

### 3.3 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE PÃES

A deterioração por fungos em pães é retardada pela adição de conservantes químicos, como ácidos propiônico, sórbico, acético e seus sais, geralmente reconhecidos como seguros (GRAS). Estes são usados para suprimir o crescimento de micro-organismos e para prolongar a vida útil dos produtos de padaria (GOULD, 1996; LEGAN, 1993). As formas de sais são as mais comumente utilizadas pela indústria devido a sua alta solubilidade em água e por ser de mais fácil manuseio em relação aos respectivos ácidos corrosivos (BLACKBURN, 2006).

Os conservantes químicos apresentam ação fungistática, não sendo, portanto, letais para os esporos. Estudos demonstraram que propionato de cálcio, benzoato de sódio e sorbato de potássio foram eficazes para inibir alguns fungos isolados a partir de produtos de padaria, a pH 4.5, quando aplicado na concentração de 0,3%. O sorbato de potássio também foi eficaz na concentração de 0,03% (MARIN et al., 2002). Em altas concentrações, e dependendo do espectro de ação, podem ocasionar perdas de volume e efeitos adversos nas características sensoriais dos pães (BLACKBURN, 2006).

Os conservantes mais comumente utilizados, nas indústrias de panificação, são os propionatos e sorbatos. O limite de concentração de cada conservante é controlado pela legislação de cada país. De acordo com a União Européia (UE), o ácido propiônico e sórbico nas suas formas de sais podem ser utilizados na formulação de pães em concentrações máximas de 3000 e 2000 ppm, respectivamente (UNIÃO EUROPEIA, 1995). No Brasil, não existe um limite máximo para adição de

propionatos, enquanto os sorbatos podem ser dosados em concentração máxima de 0,1% na forma de ácido nos pães (BRASIL, 1999).

Os propionatos são incorporados na massa antes da etapa de mistura e apresentam como principais vantagens a alta solubilidade, sabor neutro, baixa

toxicidade, além do baixo efeito sobre as leveduras (BLACKBURN, 2006). Sua forma de ação está relacionada com a liberação dos íons propionato e íons  $\text{Ca}^{2+}$  e posterior formação do ácido propiônico, quando em contato com a água, que é estimulada em baixo pH. A presença do ácido provoca diminuição do pH intracelular e inibe enzimas e micro-organismos (LIN; CHEN, 1995).

### 3.4 BIOCONSERVAÇÃO

A indústria de panificação tem utilizado diferentes métodos de conservação afim de alcançar maior estabilidade microbiológica nos produtos de panificação durante a vida útil. Dentre os métodos utilizados estão as técnicas de controle de contaminação (matéria-prima, condições de higiene, layout), controle da germinação seguido de crescimento (formulação, embalagem e condições de estocagem) e técnicas de inativação dos contaminantes (durante processamento) (DAGNAS; MEMBRÉ, 2013).

A busca pela estabilidade microbiológica de produtos de panificação continua sendo o foco de estudos e investigações (BELZ et al., 2012; CORNEA et al., 2011; DAGNAS et al., 2014; NAKHCHIAN et al., 2014), uma vez que a deterioração desses produtos por fungos é responsável por grandes perdas econômicas (COOK; JOHNSON, 2009).

Várias razões levaram à busca de novas alternativas para minimizar os riscos associados à presença ou à deterioração por fungos em alimentos, que incluem demandas dos consumidores em relação à qualidade e segurança dos alimentos e ao aumento da preocupação do governo sobre as questões ambientais e de segurança. O termo bioconservação refere-se à vida útil prolongada e à segurança dos alimentos que utilizam em sua fabricação micro-organismos ou seus metabólitos (ROSS et al., 2002). Assim, esse conceito ocupa lugar de destaque, explorando o uso de micro-organismos e/ou seus metabólitos em diferentes processos alimentares.

O uso de fermento natural é considerado um sistema natural de preservação para pães (GOBBETTI et al., 2014) devido a capacidade de melhorar a qualidade e a vida útil dos mesmos (ARENDDT et al., 2007), de reduzir significativamente o nível

de aditivos químicos empregados em panificação, de possuir vantagens tecnológicas devido ao seu impacto na estrutura e em toda a gama de características de qualidade do pão (RYAN; DAL BELLO; ARENDT, 2008).

### 3.5 FERMENTO NATURAL (*SOURDOUGH*)

Fermento natural é um ecossistema complexo, onde os micro-organismos, leveduras e bactérias ácido lácticas em simbiose, estão altamente adaptados às condições ambientais (temperatura, pH, acidez, tendo a maltose como o carboidrato fermentável mais abundante e a frutose como um potencial receptor de elétrons), para a produção de antimicrobianos (VERA et al., 2009).

O fermento natural é resultante de uma cultura primária de agentes (bactérias e fungos) encontrados no meio ambiente e na própria farinha. É parte da preparação do pão, feita em horas, dias, meses ou até anos antes da elaboração do pão. Praticamente qualquer ingrediente com qualificação para sofrer fermentação pode começar uma massa de pão (CANELA-RAWS, 2006). A fermentação obtida por esse método é mais longa e com tendência a aumentar a acidez causando produtos com qualidade específica e características sensoriais diferenciadas. O fermento natural pode ser de consistência firme, bastante líquido ou até, simplesmente, uma sobra de massa de pão. Alguns pré-fermentos, como também são chamados, contêm sal, outros não; alguns contêm açúcar. Outros contêm certa quantidade de fermento comercial, ou se iniciam com algumas bactérias que ocorrem naturalmente (CANELA-RAWS, 2006).

O uso de fermentos naturais como forma de iniciação e de propagação de uma massa fermentada em processos de elaboração de pães, já têm uma longa tradição e ainda desempenha um papel importante na melhoria da qualidade e manutenção da vida útil destes produtos fermentados (ARENDETT et al., 2007; GOCMEN et al., 2007; KATINA et al., 2006). O uso de *sourodugh* tem sido intensamente estudado nos últimos tempos, devido à crescente procura dos consumidores por alimentos contendo

menor quantidade de conservantes químicos. Vários fermentos foram desenvolvidos para aumentar a vida útil e melhorar as características sensoriais de pão.



De acordo com De Vuyst et al. (2014), o fermento natural pode ser considerado, do ponto de vista microbiológico, um ecossistema específico e estressante, caracterizando-se por apresentar baixo pH, altas concentrações de carboidratos, limitação de oxigênio e altas contagens de células de BAL ( $\geq 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>) em comparação com leveduras ( $\geq 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>). O fermento natural, por natureza, é composto por BAL que produzem, principalmente, ácidos orgânicos e por leveduras que produzem dióxido de carbono e etanol. De acordo com o tipo de pão e da qualidade exigida, os fermentos naturais são selecionados com base nas propriedades metabólicas específicas dos micro-organismos que habitam esse meio fermentativo (GOBBETTI; GANZLE, 2007).

O *sourdough* exerce forte influência na textura dos produtos e apresenta outros efeitos positivos nas propriedades tecnológicas, nutricionais e funcionais dos pães (ARENDDT et al., 2007). Além disso, o uso do fermento natural proporciona ótima qualidade em sabor e conservação nos produtos finais obtidos (HAMMES et al., 2005).

O uso de *sourdough* na formulação de pães (CORSETTI et al., 1998) melhorou as características globais e a utilização de uma estirpe específica de bactéria ácido láctica juntamente com uma ou mais leveduras pode retardar o endurecimento propiciando um aumento da vida útil.

Muitas propriedades inerentes do *sourdough* devem-se à atividade metabólica da bactéria ácido láctica presente no processo, da qual podemos citar: fermentação láctica, proteólise, síntese de compostos voláteis e ação antifúngica (PLESSAS et al., 2011). Além disso, outra vantagem desse método é a extensão da vida útil dos produtos, devido à retenção da umidade e aumento da acidez, o que contribui para o controle microbiano e textura do pão (PLESSAS et al., 2012).

### **3.5.1 Micro-organismos presentes e compostos gerados no *sourdough***

O *sourdough* é caracterizado por um ecossistema microbiano complexo, principalmente representado pelas bactérias lácticas e leveduras, cuja fermentação confere ao pão suas características, tais como a palatabilidade e alta qualidade sensorial (CORSETTI; SETTANNI, 2007). Apesar das BAL não sobreviverem ao

forneamento, a presença das mesmas durante a elaboração dos produtos de panificação produz ácidos orgânicos e outros compostos que contribuem grandemente para o sabor (WANG et al., 2012). As bactérias do ácido láctico podem

ser divididas em dois grupos: (1) homofermentativas, que produzem principalmente ácido láctico, e (2) heterofermentativas, que produzem, além de ácido láctico, uma quantidade considerável de etanol, ácido acético e dióxido de carbono (LIU, 2003). Ambas as espécies de bactérias (homofermentativas ou heterofermentativas) são as que mais contribuem para o processo de acidificação da massa, enquanto as leveduras são as principais responsáveis pela fermentação. A razão entre bactérias lácticas e leveduras na massa ácida é geralmente 100:1 (OTTOGALLI et al., 1996).

A escolha pelos micro-organismos certos para uma fermentação natural está intrinsecamente ligada com o objetivo desejado, ou seja, com o que realmente se espera de resultado final optando entre a produção de ácidos e aromas ou o da fermentação propriamente dita (PLESSAS et al., 2011). Tomamos como exemplo a fermentação de grãos de centeio, onde o que se espera é a queda acentuada de pH para deixar a massa mais elástica. Dessa forma, apenas o uso de bactérias produtoras de ácido láctico é suficiente. Todavia se o interesse é uma fermentação que agregue sabor e aumento de volume aos produtos acabados, então se faz necessário a incorporação tanto de uma bactéria ácido láctica para a geração de compostos voláteis quanto de cepas de leveduras capazes de produzir gás carbônico para a aeração da massa (BRANDT; HAMMES, 2001).

Em produtos como o panetone, por exemplo, é necessário uma fermentação natural contendo leveduras e bactérias ácido lácticas. Mas se o processo fermentativo ocorrer em temperaturas na faixa de 25-30 °C é necessário quantidade elevada de *sourdough* nas fermentações intermediárias (OTTOGALLI et al., 1996).

### 3.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As BAL são micro-organismos cujo metabolismo diverso e a capacidade de produzir compostos antifúngicos naturais tornam-se uma alternativa biológica versátil, tecnicamente viável e com alta relação custo/benefício para o controle de fungos (SCHWENNINGER et al., 2005).

Devido às suas necessidades nutricionais, as bactérias ácido lácticas são geralmente cultivadas em meios enriquecidos e são encontrados em produtos lácteos, em carnes, produtos derivados de carne e produtos à base de cereais (CARR et al., 2002). Estas bactérias são divididas principalmente em quatro gêneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Elas são tradicionalmente

utilizadas como conservantes para evitar a deterioração e para estender a vida útil de muitos alimentos.

Esses micro-organismos desempenham um papel fundamental na fermentação de alimentos, contribuindo não apenas para o desenvolvimento das propriedades sensoriais desejadas no produto final, mas também para a sua segurança microbiológica (SMAOUI et al., 2010). De acordo com Magnusson et al. (2003), três mecanismos podem explicar a eficácia antimicrobiana destes micro-organismos: a produção de ácidos orgânicos, a competição por nutrientes e a produção de compostos antagônicos.

O efeito antimicrobiano das bactérias ácido lácticas está essencialmente relacionado com a produção de ácidos láctico, acético, propiônico, sórbico, benzóico, de peróxido de hidrogênio, diacetil, etanol, fenóis e compostos protéicos sendo, algumas cepas, capazes de sintetizar substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (DALIÉ et al., 2010).

Entretanto, o uso das bactérias ácido lácticas necessita de um estudo aprofundado sobre os parâmetros que modulam suas propriedades antifúngicas. Vários são os parâmetros, incluindo a temperatura, o tempo de incubação, o meio de crescimento, o pH e os fatores nutricionais (BATISH et al., 1997) que afetam esta capacidade. Os estudos realizados por Sathe et al. (2007) demonstraram que a atividade antifúngica de *Lb. plantarum* CUK501 era máxima à 30 °C, quando a cultura encontrava-se no final da sua fase logarítmica de crescimento. Esses resultados foram consistentes com os obtidos anteriormente por Batish et al. (1990), que observaram que a atividade antifúngica de uma estirpe de *Lb. acidophilus* era máxima a 30 °C após 48 horas de incubação, ao passo que o aumento do período de incubação resultou numa menor atividade antifúngica. Esta diminuição foi relacionada com a metabolização de compostos ativos ou à sua degradação enzimática.

O meio de cultura no qual o micro-organismo será inoculado pode modular significativamente o metabolismo dos compostos antifúngicos gerados pelas BAL (BATISH et al., 1990; ROY et al., 1996).

A atividade antifúngica proveniente da incorporação de *sourdough* às massas vem sendo descrita e, como exemplo, Belz et al. (2012) abordaram a viabilidade da redução de sal (NaCl) em pães de trigo com foco no aumento do prazo de validade e a compensação usando *sourdough* bem como a combinação com conservantes químicos. A adição de *sourdough* prolongou a vida útil em até 14 dias,

enquanto que a adição de 0,3% de propionato de cálcio mostrou ser eficaz contra a deterioração fúngica apenas até 12 dias.

A eficácia antifúngica das BAL pode ser reforçada com ligeiro aumento da concentração de NaCl (de 0,5% a 3%) no meio de crescimento para *Lb. rhamnosus* (EFFAT et al., 2001), o que pode estar relacionado com um efeito sinérgico entre o NaCl com os ácidos orgânicos e as substâncias antifúngicas metabolizadas pelas BAL (EFFAT et al., 2001). O pH também exerce forte influência sobre a produção de compostos antifúngicos pelas BAL (BATISH et al., 1997; SATHE et al., 2007). Estudos relatam (BATISH et al., 1997; CORSETTI et al., 1998) que a faixa ótima de pH para a produção desses compostos está situada entre 5,0 e 6,0.

Muitos são os compostos liberados pelas BAL. Como o próprio nome já diz, o ácido láctico e o acético são os principais produtos da fermentação dos carboidratos pelas BAL. Estes ácidos, geralmente reconhecidos como agentes seguros para a preservação de alimentos, difundem-se através da membrana dos micro-organismos alvo (PIARD; DESMAZEAUD, 1991) e, em seguida, reduzem o pH citoplasmático inativando a maior parte das atividades metabólicas dos micro-organismos de interesse.

O ácido acético, por ter uma constante de dissociação alta, foi descrito como sendo mais eficaz do que o ácido láctico e é, de longe, o melhor inibidor de crescimento de bolores (BATISH et al., 1997). No entanto, existem autores (GEREZ, et al., 2009; LAVERMICOCCA et al., 2000; MAGNUSSON et al., 2003; STRÖM, et al., 2002) que descrevem a atividade antifúngica de outro ácido orgânico proveniente das bactérias ácido lácticas, como o ácido fenilático que foi capaz de inibir o crescimento de *Penicillium expansum* IDM/FS2, *Aspergillus niger* FTDC3227 e DM1i, *A. flavus* FTDC3226 e *Fusarium graminearum* IDM623, a uma concentração de cerca de 50 mg/mL (LAVERMICOCCA et al., 2000).

Em estudo realizado por Cizeikiene et al., (2013) cepas produtoras de ácidos orgânicos e bacteriocinas (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 e KTU05-10) foram utilizadas na preparação da massa fermentada para pão contra micro-organismos indesejáveis na indústria de alimentos, mostrando atividade fungicida e fungistática contra *Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *P. expansum* e *A. niger*. Este trabalho indica que estas bactérias podem ser amplamente

utilizadas na indústria de alimentos como bioconservantes, devido ao seu amplo espectro de inibição.

O uso de *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* CR772 e *Lb. brevis* CRL 796 na formulação de culturas iniciadoras juntamente com *Saccharomyces cerevisiae* foi estudado para melhorar significativamente a qualidade do pão e evitar a deterioração por fungos (GEREZ et al., 2009). A redução de NaCl em pão de trigo utilizando *sourdough* e a comparação com pães contendo conservante químico foi estudada. Os autores (BELZ et al., 2012) realizaram *challenge tests* usando fungos comumente encontrados nas padarias tais como *P. expansum*, *F. culmorum* e *A. niger*. Neste estudo, a redução de NaCl diminuiu o prazo de validade por 1-2 dias. Os resultados deste estudo indicam que a adição de fermento natural elaborado com uma cepa antifúngica específica (*Lactobacillus amylovorus* DSM 19280) pode substituir a adição de conservantes químicos e compensar o nível reduzido de NaCl garantindo a estabilidade dos produtos (BELZ et al., 2012).

### 3.6.1 *Lactobacillus fermentum*

As bactérias lácticas são descritas como Gram positivas, não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausente, não aeróbia, mas aerotolerante, exigente quanto aos fatores nutricionais, tolerante a ácido e estritamente fermentativa sendo a formação de ácido láctico o principal produto da degradação do açúcar (ALVARENGA, 2008). Desenvolvem-se em meio ligeiramente ácido, com pH entre 4.4 e 6.4 e em condições microaerófilas. As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* apresentam uma grande importância na indústria alimentícia, e principalmente na panificação, pois as mesmas são utilizadas como culturas iniciadoras em processos fermentativos (TORRIERI et al., 2014).

O gênero *Lactobacillus* pode ser dividido em três grupos distintos quanto ao modo como realizam a degradação dos carboidratos (KANDLER; WEISS, 1986):

- Homofermentativos obrigatórios: através da via de Embden-Meyerhof convertem 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido láctico. Não fermentam pentoses ou glucanato;

- Heterofermentativos facultativos: realizam a fermentação de forma semelhante ao grupo homofermentativo, contudo, algumas espécies produzem outros

ácidos (acético) em condições limitantes de glicose. Convertem pentoses em ácido láctico e acético via fosfoacetolase indutível;

Oliveira et al. (1995) referem-se à espécie *Lb. fermentum*, como sendo bastonetes de 0,5 a 0,9 mm de largura e comprimento variável, apresentam-se isolados e aos pares, Gram-positivos, não esporulados e raramente com motilidade. Também apresenta as seguintes características fisiológicas: são anaeróbios facultativos, heterofermentativos, apresentam catalase negativa, com temperatura ótima entre 30 °C e 40 °C e pH ótimo na faixa de 5,5 a 5,9. A espécie *Lb. fermentum* compreende muitas linhagens e a maior parte delas fermenta frutose, galactose, glicose, gluconato, lactose, maltose, manose, melobiose, rafinose, ribose e sacarose, porém determinadas espécies também fermentam arabinose, celobiose, trealose e xilose (KANDLER; WEISS, 1986).

Durante o processo de fermentação do açúcar, podem ser produzidos ácidos D-láctico e L-láctico, ou ainda a mistura racêmica dos isômeros em proporções variáveis. Tal aspecto é decorrência da existência de enzimas desidrogenases lácticas esteroespecíficas, produzindo separadamente os isômeros D e L (COSTA, 2006). Estudos comprovam que a utilização de *L. fermentum* na elaboração do *sourdough* em pães é benéfico para o controle da deterioração fúngica em pães podendo prolongar a vida útil desses produtos (FAZELI et al., 2004). Os autores (HALM et al., 1996) perceberam que quando utilizavam *L. fermentum* na fermentação da massa o pH atingia um valor de 3,7 em 24h ao contrário do que se conseguia com 48h de fermentação em um *sourdough* espontâneo.

### 3.7 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização também denominada por outras nomenclaturas, como criodesidratação, criosecagem ou criodessecação (GARCIA, 2009) é um método frequentemente aplicado na indústria farmacêutica e de alimentos visando proteger vários compostos bioativos contra diversos fatores físico-químicos (SOLANKI et al., 2013).

É um processo no qual uma substância passa pelos processos de congelamento inicial, redução da quantidade de água através da secagem primária (por sublimação) e secundária (por dessorção), para valores que impeçam atividade biológica e reações químicas. Ou seja, é um processo diferenciado de

desidratação de produtos, pois ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada (estado sólido) passe diretamente ao estado gasoso (sem passar pelo estado líquido), ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação (GARCIA, 2009).

O processo de liofilização mostra-se eficiente comparado com outros meios de desidratação, frente características como concentração do produto, perda de voláteis, decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas, por isso merece destaque (GARCIA, 2009). Na indústria de alimentos, os produtos naturais desidratados por liofilização estão atualmente ocupando o mais alto patamar de qualidade e praticidade nos meios industriais, substituindo com vantagens na praticidade os produtos “*in natura*” e em qualidade, os produtos sintéticos (EBLSA, 2011).

A liofilização é uma das técnicas amplamente utilizadas para secar bactérias e é considerada como um processo de desidratação mais leve devido à capacidade de manter alto nível de viabilidade celular (CHEN et al., 2017). Alguns probióticos, como *Bifidobacterium longum* (AMINE et al., 2014), *Bifidobacterium animalis* (DIANAWATI; SHAH, 2011) e *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (HALIM et al., 2017) foram encapsulados antes do processo de liofilização, para produzir uma forma probiótica seca que seja mais fácil para o armazenamento a longo prazo.

As preparações liofilizadas apresentam mais vantagens do que as preparações feitas por outras técnicas, em termos de preservação em longo prazo, juntamente com a conveniência no manuseio, armazenamento, comercialização e aplicação. É o método mais adequado e bem sucedido de preservação de bactérias probióticas, leveduras e fungos esporulantes, reduzindo a atividade da água pela remoção de água (CHEN et al., 2017). Além disso, o material liofilizado pode ser mantido sob atmosfera de vácuo, diminuindo o metabolismo celular e as reações enzimáticas. Mesmo existindo alguns micro-organismos que possam ser liofilizados sem significativas perdas de viabilidade, esse método causa danos às células microbianas, podendo alterar a taxa de sobrevivência de determinados micro-organismos após a sua reidratação (MORGAN et al., 2006).

Como forma de contornar esses problemas, particular atenção tem sido dada ao estudo de crioprotetores, como carboidratos, proteínas e polímeros, com vistas a aumentar a resistência das células bacterianas dessecadas. Esses agentes protetores podem ser adicionados durante o crescimento celular, ou antes, dos

processos de congelamento e liofilização, sendo a utilização diferenciada para os distintos grupos de micro-organismos (HUBÁLEK, 2003; MORGAN et al., 2006).

Os micro-organismos que são naturalmente capazes de sobreviver à desidratação acumulam açúcares intracelularmente, principalmente dissacarídeos como a trealose e a sacarose (OLIVER et al., 2002). Essas moléculas de açúcares podem substituir moléculas de água intracelulares que hidratam proteínas e membranas, prevenindo a desnaturação de proteínas e a transição da fase liotrópica dos lipídeos das membranas (LESLIE et al., 1995; OLIVER et al., 2002).

### 3.7.1 Agentes crioprotetores

Um bom agente protetor deve proporcionar proteção às células durante o processo de congelamento, propiciar rápida secagem e fornecer boa matriz para permitir a estabilidade e facilidade de desidratação (COSTA et al., 2000). A matriz mais estudada na produção de materiais de referência destinados a ensaios microbiológicos em alimentos é o leite, devido causa de suas propriedades crioprotetoras intrínsecas (ROSAS et al., 2010; BRANDÃO et al., 2013). A sacarose foi selecionada entre os diferentes aditivos crioprotetores por ser o glicídio mais frequentemente utilizado na criopreservação de bactérias (HUBÁLEK, 2003). Os dados da literatura mostram que os materiais produzidos em matriz leite liofilizado são estáveis por períodos de até 237 dias, se estocados a temperatura menor ou igual a -70 °C (INCQS, 2012).

Os açúcares utilizados como crioprotetores substituem a água estrutural das membranas das células após a desidratação e também impedem o desdobraimento e a agregação das proteínas por ligações (pontes de hidrogênio) com os grupos polares das proteínas (COSTA et al., 2000).

A trealose foi o melhor agente protetor para as células de *Pantoea agglomerans* CPA-2, quando sujeito a liofilização (com mais de 80% de viabilidade), seguido da sacarose e lactose (COSTA et al., 2000). De acordo com esses autores, os altos índices de viabilidade após o processo de secagem podem ser explicados pela capacidade desses açúcares prevenirem a ligação da água intracelular evitando a formação de cristais de gelo extracelular que poderiam danificar e agredir a parede da célula.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Farinha de trigo refinada**

Foi utilizado aproximadamente 200 kg de farinha de trigo refinada da marca Renata® (Moinho Selmi, Sumaré, São Paulo) e 10 kg de farinha integral de trigo (CISBRA, Panambi, RS). A farinha de trigo refinada foi o insumo mais importante para o desenvolvimento da pesquisa, pois a partir dela foi elaborado o *sourdough* que teve cepas selecionadas e, foi utilizada como ingrediente de maior peso na formulação dos panetones. Por se tratar de um material tão importante, algumas análises foram realizadas para caracterização dos parâmetros físico-químicos e reológicos da farinha de trigo refinada para sua posterior utilização nas demais etapas do processo. Na farinha de trigo integral apenas inspeção visual foi realizada devido seu teor de fibras dificultar a obtenção de certos parâmetros tecnológicos. Os aparelhos, equipamentos e resultados dessas análises de caracterização encontram-se nos Apêndices, ao final dessa tese.

#### **4.1.2 Reagentes, materiais e utensílios para a liofilização**

Para a liofilização foram adquiridos vidros (com capacidade de 8 mL) e tampas de borracha para liofilização. A sacarose (marca Dinâmica) foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSM. A trealose P.A (TREHA™) foi adquirida pela empresa Tovani (Lote 3G291).

#### **4.1.3 Insumos da formulação do panetone**

Foi fornecido 25 kg de gordura hidrogenada Tri Cake 13 LT pela Triângulo Alimentos. A empresa Granolab cedeu a enzima *Spring Light* (composta de alfa-amilase fúngica), o glúten vital, os emulsificantes, o ácido ascórbico, o sorbitol e o datem em pó para a

realização dos testes com a formulação. A açucareira Bela Vista forneceu 75 kg de açúcar, sendo 50 kg cristal e 25 kg refinado. O aroma de panetone foi fornecido pela empresa Vitaqualy e Bell. As gemas pasteurizadas foram fornecidas pelas empresas Shinoda e fermentos Itaiquara. As formas de papel para os panetones foram doadas pela Top Line. Foram adquiridos no comércio local os seguintes insumos: sal refinado iodado, água mineral, fermento comercial instantâneo e frutas cristalizadas.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Produção do fermento natural liofilizado

O fermento natural liofilizado (FNL) foi produzido a partir da mistura de farinha de trigo e farinha de trigo integral na proporção de 50% durante um período de 14 dias conforme trabalho publicado no artigo 2 (STEFANELLO et al., 2018).

### 4.2.2 Viabilidade do FNL

A liofilização foi utilizada como método de secagem. Para tanto, foi utilizado um agente crioprotetor (trealose) com o objetivo de maximizar a viabilidade dos micro-organismos presentes no *sourdough*. A trealose foi utilizada em concentrações de 10 e 15 % para verificar seu efeito crioprotetor nas células dos micro-organismos. Antes da liofilização, o fermento natural foi dividido em béqueres contendo 600 g cada e a trealose foi adicionada conforme segue: 0 g no béquer FNL 0; 60 g de trealose no béquer FNL 10%; 90 g de trealose no béquer 15%. O material (fermento natural + trealose) foi misturado e dividido em porções menores de aproximadamente 50 g e distribuídos em pequenos frascos para então serem ultracongelados (12 h / -80 °C) em ultrafreezer. No dia seguinte, todo o material foi liofilizado. A Figura 1 (a,b) representa a etapa de pesagem e acondicionamento bem como o aspecto final do FNL após o processo de secagem (Fig 1 – c).

Após a liofilização, os fermentos naturais foram triturados em moinho analítico para obtenção de um pó, e posteriormente, foram armazenados e conservados em embalagens metálicas ao abrigo da luz e umidade para conservação. As análises microbiológicas foram efetuadas logo após a adição de trealose nos tratamentos FNL

10 e FNL 15 como também no FNL 0 (sem adição de trealose). Para calcular a viabilidade celular em porcentagem foi necessário expressar os resultados em Log UFC/g das contagens microbiológicas de bactérias ácido lácticas e de leveduras (antes e depois), após inserir os dados na fórmula a seguir (Equação 1).

$$Viabilidade (\%) = \frac{\text{Log} \frac{UFC}{g} \text{ depois}}{\text{Log} \frac{UFC}{g} \text{ antes}} \times 100 \quad (1)$$



Figura 1. Etapa de pesagem dos fermentos naturais antes da liofilização (a-b) e aspecto final após processo de secagem (c).

#### 4.2.3 Identificação molecular dos micro-organismos

Para o isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL) e de leveduras, 1 grama de cada amostra foi diluída em 10 mL de solução salina 0,85%, em condições assépticas, sendo realizadas diluições seriadas até  $10^{-8}$ . De cada uma delas, foram inoculados 100  $\mu$ L em duplicata nos meios de cultivo M17, Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (de Man et al., 1960) e Potato Dextrose agar (PDA). Os cultivos foram incubados entre 24 e 48h em câmaras de anaerobiose, com exceção daqueles em meio PDA, à 37°C, período após o qual os micro-organismos morfologicamente distintos foram isolados em novas placas de M17, MRS e PDA, de acordo com o seu meio de crescimento preferencial de origem (LHOMME et al., 2015).

O DNA total dos isolados foi extraído através do método do fenol-clorofórmio e o fragmento do gene ribossomal do 16S (rDNA 16S) ou a região espaçadora intergênica (ITS), que separa as regiões 18S e 28S do gene do rDNA, no caso das leveduras, e foram utilizados nas ampliações por PCR (LHOMME et al., 2015). Para a reação de PCR do rDNA 16S, foi utilizado os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'). (LANE, 1991). As reações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturaçã

inicial à 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguidos por uma fase de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para a amplificação do fragmento da região ITS das amostras de levedura, foram utilizados os primers ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al. 1990), nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 35 segundos e anelamento final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações foram purificados e enviados para sequenciamento no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) no sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. Os dados do sequenciamento foram coletados através do software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas no programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1997) e editadas do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999) para a geração dos seus *contigs* (sequência consensual de DNA). Posteriormente, as sequências foram submetidas ao algoritmo de busca por similaridade BLAST do banco de dados GenBank, afim de determinar a sua identidade.

#### **4.2.4 Manutenção das cepas identificadas**

As cepas isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo ágar inclinado com o meio preferencial de crescimento (Quadro 1). Os tubos contendo as cepas isoladas foram preenchidos com óleo mineral, foram rosqueados e selados com parafilme. Os tubos contendo as cepas foram mantidos refrigerados, preferencialmente na faixa entre 5 e 8°C (MURRAY, 2003) para minimizar o efeito da desidratação e ao abrigo da luz.

#### **4.2.5 Depósito das cepas identificadas na coleção Adolfo Lutz**

Foi depositado no Núcleo de Coleção de Micro-organismos – NCMO do Instituto Adolfo Lutz (IAL), 06 linhagens, oriundas da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Após os processos de manutenção e autenticação as linhagens receberam o acrônimo de acesso na coleção do NCMO, conforme a Tabela 1.

Quadro 1. Cepas identificadas no fermento natural e meio utilizado para a manutenção

<b>Identificação</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>Meio utilizado</b>
RF 01	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	M17
RF 02	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MRS
RF 03	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MRS
RF 04	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	M17
RF 10	<i>Enterobacter sp.</i>	M17
RF 11	<i>Escherichia coli</i>	M17
RF 12	<i>Enterobacter cloacae</i>	M17
RF 13	<i>Enterobacter cloacae</i>	M17
RF 14	<i>Streptomyces sp.</i>	BDA
RF 15	<i>Enterobacter cloacae</i>	M17
RF 17	<i>Pseudomonas sp.</i>	BDA
RF 20	<i>Candida glabrata</i>	BDA
RF 22	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	BDA
RF 25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MRS
RF 29	<i>Enterobacter sp.</i>	MRS
RF 30	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MRS
RF 32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS
FN 10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BDA
FN 0	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BDA

Tabela 1. Linhagens depositadas no Núcleo de Coleção de Micro-organismos do IAL.

Linhagem	Número IAL	Data do depósito
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	IAL 4533	17/11/2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IAL 4539	17/11/2016
<i>Candida glabrata</i>	IAL 4540	17/11/2016
<i>Lactobacillus fermentum</i>	IAL 4541	17/11/2016
<i>Lactobacillus plantarum</i>	IAL 4542	17/11/2016
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IAL 4543	17/11/2016

#### 4.2.6 Crescimento e multiplicação das cepas identificadas

De acordo com a nomenclatura e acrônimo de acesso recebido da coleção do NCMO (Tabela 1) foram escolhidas as cepas *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 para desenvolvimento e pesquisa. As duas cepas escolhidas foram liofilizadas e usadas para o estudo de manutenção por um ano. As cepas escolhidas também foram utilizadas nas demais etapas dessa tese, incluindo elaboração dos diferentes *sourdough* e preparo do panetone.

Primeiramente as cepas foram cultivadas em caldo nutritivo, após 48 horas foram centrifugadas (4 °C/ 15 min/ 6240 rpm) e posteriormente distribuídas em frascos estéreis contendo solução estabilizadora. Os resultados desse ensaio não foram positivos, devido às contagens insatisfatórias. Diluições até  $10^{-24}$  foram realizadas e as contagens apresentaram-se irregulares, por isso foi escolhido trabalhar com outra metodologia.

As cepas de *L. fermentum* IAL 4541 foram cultivadas anaerobicamente em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe) a 37 °C por 48 horas (MEROTH et al., 2003). A partir do tubo contendo o isolado puro foram realizados repiques para placas, utilizando o método do estriamento para se obter crescimento uniforme do micro-organismo de interesse. Após crescimento em placa (contendo ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 horas) o inóculo de *L. fermentum* IAL 4541 foi preparado a partir da raspagem de todo o crescimento em placa e transferido, com alça, para frascos estéreis contendo as soluções estabilizadoras para serem liofilizadas (as soluções serão descritas a seguir). Após, os frascos contendo as células de *L. fermentum* IAL 4541, foram vigorosamente agitados em vórtex por 30s, congelados (à -20 °C por 24 horas) e preparados para a liofilização (conforme sessão abaixo). Contagens microbiológicas foram realizadas no inóculo que foi obtido através da raspagem de 1 placa para 1 frasco na proporção de 1:1 e o resultado ficou entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  UFC de *L. fermentum* IAL 4541 por mL.

As cepas de *W. anomalus* IAL 4533 foram cultivadas em Sabouraud Dextrose agar (SDA) à 25 °C por 72h (ANJUN et al., 2008). A partir do tubo contendo o isolado puro foram realizados repiques para placas, utilizando o método do estriamento para se obter um crescimento uniforme do micro-organismo de interesse. Após o crescimento em placas, as cepas foram recolhidas com auxílio de alça de platina para frascos estéreis contendo as soluções estabilizadoras para serem liofilizadas. Nesse caso em especial, uma placa com o crescimento foi dividida para 3 frascos estéreis. Após, os frascos contendo as células de *W. anomalus* IAL 4533, foram vigorosamente agitados em vórtex por 30s, congelados (à -20 °C por 24 horas) e preparados para a liofilização (conforme sessão abaixo). Contagens microbiológicas foram realizadas no inóculo, que foi obtido através da raspagem de 1/3 placa para 1 frasco na proporção de 1:3 e o resultado ficou entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC de *W. anomalus* IAL 4533 por mL. A Figura 2 detalha com imagens essa metodologia.

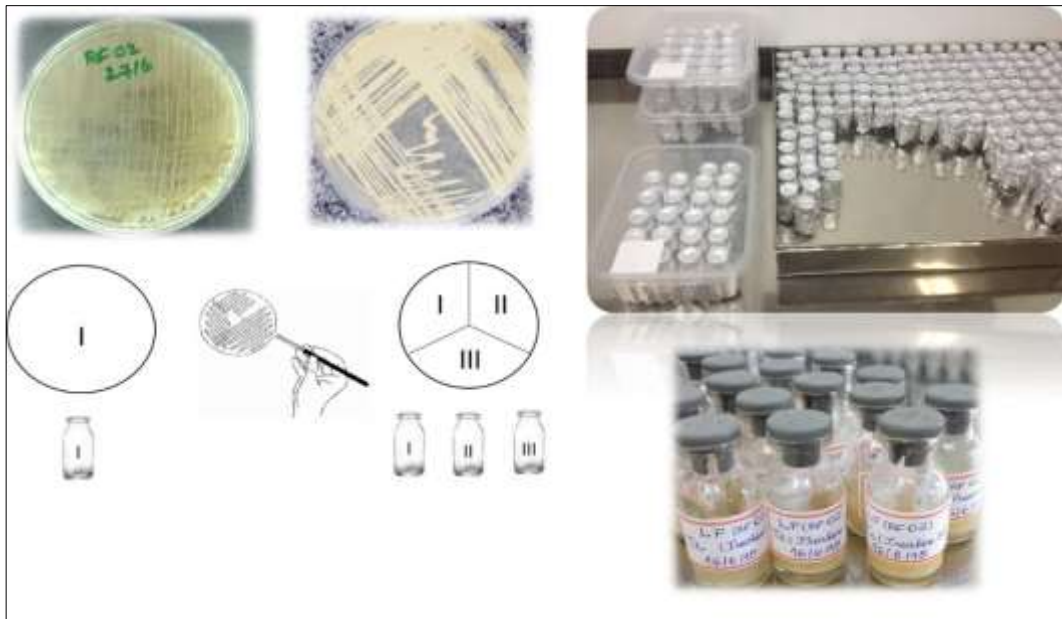


Figura 2. Obtenção do inóculo de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 para liofilização. Fonte: próprio autor.

#### 4.2.7 Soluções crioprotetoras e liofilização de *Lactobacillus fermentum* ial 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* ial 4533

Foram utilizadas algumas soluções com a finalidade de proteger as células de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 durante o

congelamento e posterior liofilização. As soluções crioprotetoras testadas foram sacarose 10%, trealose 5%, leite desnatado 10% e leite desnatado 10% mais glutamato monossódico 5% e água peptonada 0,1% como controle. A água peptonada 0,1% foi autoclavada por 15 min a 121 °C. As soluções contendo trealose e sacarose não foram esterilizadas. Foi utilizado água destilada estéril para dissolver os açúcares garantindo a menor contaminação possível. A solução contendo 5% de trealose foi filtrada em filtros de 0,22µm (BIOFIL<sup>®</sup>) e a solução contendo 10% de sacarose foi filtrada em filtros de 0,45µm (KASVI K18-430). Os meios contendo leite desnatado passaram por processo de tindalização. Esse processo foi realizado duas vezes e da seguinte forma: primeiramente os frascos contendo as soluções foram esterilizados em autoclave com o calor do vapor fluente (100 °C por 30 minutos) porém em uma baixa pressão (sem fechar as válvulas do registro), a seguir os frascos contendo as soluções foram rosqueados e resfriados por 24 horas antes de repetir o procedimento. O preparo dessas soluções foi feito de acordo com Zayed e Roos (2004) e Rosas et al. (2010).

Após a multiplicação das cepas conforme procedimento descrito no item 4.2.6 os inóculos de *L. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533 foram transferidos para frascos específicos para liofilização contendo 3 mL das soluções crioprotetoras e também com o tratamento controle (água peptonada 0,1%). Inicialmente os frascos foram mantidos à -20 °C por 24 horas, depois foram transferidos para um ultrafreezer à temperatura aproximada de -80 °C (Thermo, EUA) por uma noite e, em seguida, submetidos a um ciclo de liofilização (SANTURIO et al., 2009) de no mínimo 18 horas em temperatura inferior a -40 °C (K105, Liotop, Brasil). Em seguida, os frascos foram vedados com Parafilm<sup>®</sup> e mantidos à temperatura ambiente, dentro de uma caixa de isopor.

#### **4.2.8 Viabilidade de *Lb. Fermentum* ial 4541 e *w. Anomalus* ial 4533 durante 365 dias em temperatura ambiente**

A viabilidade celular de *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533 após o processo de liofilização foi monitorada durante um ano com armazenamento em temperatura ambiente, conforme procedimentos descritos por Brandão et al. (2013). Antes do ensaio microbiológico, os frascos contendo as cepas liofilizadas foram reconstituídos com 3 mL de caldo MRS e caldo SDA para *Lb. fermentum* IAL 4541 e



*W. anomalus* IAL 4533, respectivamente. Os frascos foram vigorosamente agitados em vortex por 2 min e mantidos em repouso por 20 min. Foram preparadas diluições

decimais e estas foram semeadas, em triplicata, em placas contendo ágar MRS para *L. fermentum* IAL 4541 e ágar SDA (glucose 20g/L; yeast extract 5g/L; peptone 10 g/L; agar 20 g/L) para *W. anomalus* IAL 4533. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 h para *L. fermentum* IAL 4541 e 30 °C por 48 h para *W. anomalus* IAL 4533. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Os valores médios das três placas foram relatados.

As análises microbiológicas foram realizadas antes da liofilização (P0), depois da liofilização (P1), depois de 30 dias (P30), depois de 60 dias (P60), depois de 90 dias (P90), depois de 120 dias (P120), depois de 210 dias (P210) e após 365 dias (P365). A viabilidade celular (em %) foi calculada segundo metodologia de Huang et al. (2006) pela Equação 1 mediante a divisão dos valores encontrados após a liofilização pelos valores encontrados antes de liofilizar, multiplicado por 100 (YANG et al., 2012).

#### **4.2.9 Preparo de *sourdough* com as cepas selecionadas**

As cepas utilizadas foram *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533, selecionadas de acordo com suas atividades antifúngicas (CODA et al., 2011; FAZELI et al., 2004). As cepas de *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533 liofilizadas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS e YM, e incubadas por 24 horas a 30 °C e 25 °C, para *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533, respectivamente, segundo metodologia descrita por Paramithiotis et al. (2005). Os *sourdoughs* foram preparados conforme metodologias de Minervini et al. (2010), Edema (2011) e Torrieri et al. (2014), com modificações. Foi feita uma mistura de farinha de trigo, água mineral e uma suspensão de células contendo os micro-organismos escolhidos contendo contagem de células viáveis de  $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC/g de bactérias ácido lácticas e  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/g de leveduras na massa final (DAL BELLO et al., 2007; CODA et al., 2010; BELZ et al., 2012; GAROFALO et al., 2012) em um período de incubação de aproximadamente 144h horas a 28 °C.

O procedimento experimental foi realizado conforme descrito a seguir. Após 1 dia de incubação os frascos contendo o crescimento das cepas selecionadas foram

centrifugados (5000 x g, 15 min, 4 °C) e a biomassa foi lavada duas vezes com água destilada esterilizada para se obter um inóculo com uma densidade ótica a 620 nm (DO 620nm) correspondendo a  $10^{10}$  UFC/mL de *L. fermentum* IAL 4541 e  $10^8$  UFC/mL de *W. anomalous* IAL 4533.

Para preparar o *sourdough*, uma técnica de sete etapas derivada de um procedimento tradicional (PARAMITHIOTIS et al., 2005) e ajustada a este experimento foi aplicada. A massa 1 (D1) foi preparada pela mistura dos 50 mL da cultura inicial com 100 g de farinha de trigo (Renata®, moinho Selmi). Após 24 h de incubação a 28 °C, o *sourdough* 1 (SD1) foi formado. Processos de mistura e incubação sucessivas foram realizadas té obter o *sourdough* 7 (SD7) no dia 7 (Figura 3).

#### **4.2.10 Caracterização do *sourdough***

O pH foi determinado de acordo com o método 02-52.01 da AACC (2010), utilizando-se medidor de pH 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), em suspensão de 10 g de amostra em 100 g de água destilada. A acidez total titulável (ATT) foi determinada através do método 016/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) pela titulação de 10 g de amostra suspensas em 100 mL de água destilada com solução padrão de NaOH 0,1 N. O valor da acidez foi expresso pela quantidade de mL necessários para a solução com a amostra mudar de cor ou chegar a pH 8,5 (MINERVINI et al., 2011). Contagens microbiológicas de bactérias ácido lácticas foram realizadas pela diluição das amostras de *sourdough* em água peptonada (0,1%) e pela subsequente inoculação (em anaerobiose), em profundidade, em placas com ágar MRS por 72h a 37 °C. As contagens microbiológicas de leveduras foi determinada pela incubação das diluições seriadas, em superfície, em placas com ágar SDA por 72h a 25 °C.

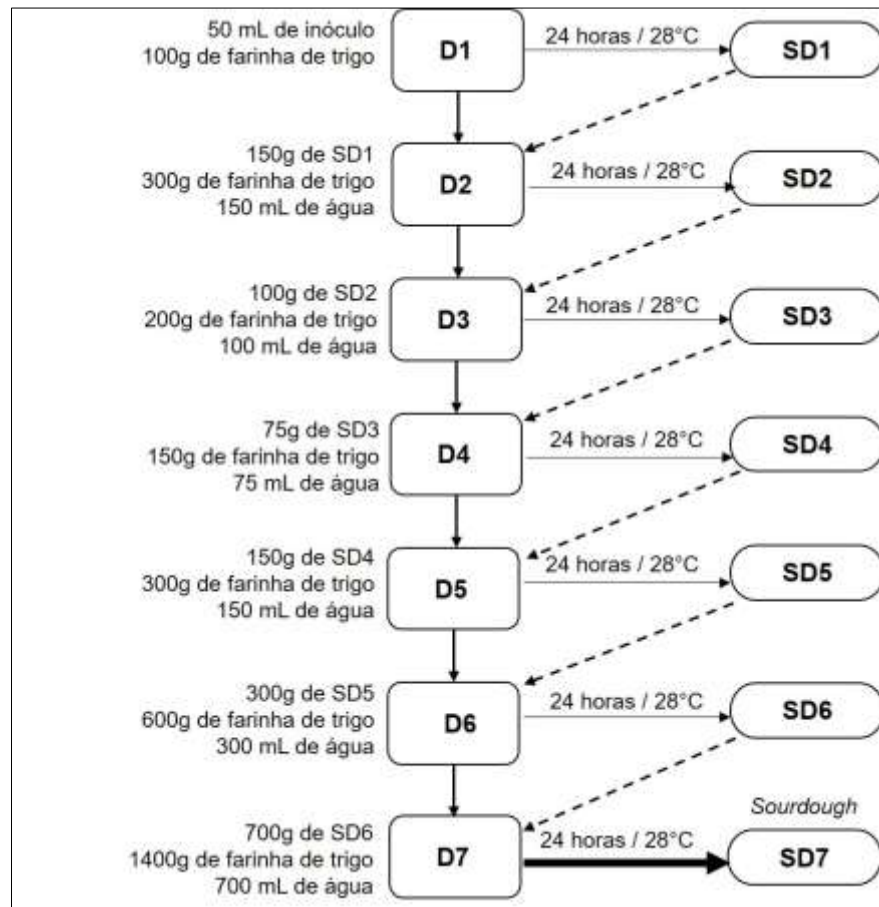


Figura 3. Preparo do sourdough a partir dos inóculos de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 em sete etapas. Onde D: dough (massa), de 1 a 7 e SD: sourdough (fermento natural), de 1 a 7. Fonte: próprio autor.

#### 4.2.11 Insumos e formulação de panetones

Conforme descrito anteriormente no item 4.1.1 aqui serão apresentadas as metodologias utilizadas e os resultados das análises realizadas na caracterização da farinha de trigo. A umidade foi avaliada de acordo com o método 44-15.02 da AACCI (2010). Os teores de glúten úmido, glúten seco e índice de glúten foram determinados utilizando-se o sistema Glutomatic (Perten Instruments, Hägersten, Suécia), de acordo com o método 38-12.02 da AACCI (2010). A atividade diastásica da farinha de trigo foi analisada em equipamento Falling Number FN 1800 (Perten Instruments, Hägersten, Suécia), de acordo com o método 56-81.03 da AACCI (2010). O amido danificado foi determinado conforme o método 76-33.01 (AACCI, 2010) utilizando determinador SDmatic (Chopin, France). Este método mede a cinética de absorção

de iodo em uma suspensão líquida, usando um aparato amperométrico. O resultado foi expresso em porcentagem do índice de absorção de iodo (AI%).

A atividade hidrogeniônica (pH) da farinha de trigo foi determinada de acordo com o método 02-52.01 da AACC (2010), utilizando-se medidor de pH 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), em suspensão de 10 g de amostra em 100 mL de água destilada. A acidez total titulável (ATT) da farinha de trigo foi determinada através do método 016/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) pela titulação de 10 g de amostra suspensas em 100 mL de água destilada com solução padrão de NaOH 0,1 N. O valor da acidez foi expresso pela quantidade, em mL, necessários para a solução com a amostra mudar de cor (tom levemente rosa) ou chegar a pH 8,6. A cor da farinha foi determinada utilizando-se espectrofotômetro MiniScan HUNTERLAB (Reston, USA), seguindo o sistema CIELab, determinando-se os parâmetros de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (MINOLTA, 1993).

A análise farinográfica, mediu os parâmetros de absorção de água (%), estabilidade (em minutos), tempo de desenvolvimento (em minutos) e índice de tolerância à mistura (em unidades farinográficas (UF)), e foi realizada em farinógrafo Brabender de acordo com o método 54-21.02 da AACCI (2010). A absorção de água da farinha foi considerada quando a mistura atingiu a consistência ótima de 500 UF na curva obtida no aparelho. A análise de alveografia mediu a resistência da massa à extensão e essa determinação foi realizada através da mistura de 250g de farinha de trigo com uma certa quantidade de solução de cloreto de sódio 2,5% (m/v) estabelecida de acordo com a umidade da farinha de trigo. O equipamento utilizado nessa análise foi o alveógrafo CHOPIN e o método 54-30.02 da AACCI (2010) serviu de referência metodológica. O Apêndice A mostra imagens de alguns equipamentos utilizados nessa caracterização.

A Tabela 2 estabelece a classificação do trigo conforme o Regulamento técnico do trigo publicado na Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de (BRASIL, 2010). Os resultados da caracterização da farinha de trigo refinada utilizada nessa pesquisa encontram-se na Tabela 3. A umidade (%) da farinha de trigo foi de 12,86 ( $\pm$  0,11) estando dentro do limite aceito (14%) pela legislação brasileira. A análise de Falling number, expressa em segundos, forneceu uma ideia da qualidade enzimática da farinha de trigo. Foi obtido 381s  $\pm$  9,88 de número de queda (Falling number) indicando que a farinha encontrava-se em um estágio com pouca atividade enzimática. Para tanto foi adicionado 0,045% de  $\alpha$ -amilase fúngica na formulação dos

panetones para que a qualidade tecnológica não fosse prejudicada. De acordo com os dados de Falling Number, farinografia e de alveografia apresentados, a farinha de trigo foi classificada como proveniente de trigo tipo pão e adequada para a fabricação de panetone com base na legislação de Identidade e Qualidade de Pão (BRASIL, 2010). Os resultados de farinografia e de alveografia estão apresentados em formato de Apêndice B e C, respectivamente.

Tabela 2. Classificação do trigo conforme Regulamento técnico do trigo publicado na Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010 (BRASIL, 2010).

Classes	Força do Glúten (Valor mínimo expresso em 10 <sup>-4</sup> J)	Estabilidade (Tempo expresso em minutos)	Número de Queda (Valor mínimo expresso em segundos)
Melhorador	300	14	250
Pão	220	10	220
Doméstico	160	6	220
Básico	100	3	200
Outros Usos	Qualquer	Qualquer	Qualquer

Tabela 3. Caracterização da farinha de trigo refinada.

Análises	Resultado
Força do Glúten (Valor mínimo expresso em 10 <sup>-4</sup> J)	270
P/L	2,0
Estabilidade (Tempo expresso em minutos)	17
Número de Queda (Valor mínimo expresso em segundos)	381 ± 9,88
Amido danificado (%)	6,51
Umidade (%)	12,86 ± 0,11
Glúten úmido (%)	26,71 ± 0,55
Glúten seco (%)	9,34 ± 0,24
Index	98,43 ± 0,25
Parâmetros de cor	L*: 93,20 ± 0,03; a*: -0,49 ± 0,00; b*: 10,54 ± 0,02
pH	5,87 ± 0,03
Acidez total titulável (mL de NaOH 0,1N)	3,00 ± 0,03

#### 4.2.12 Aplicação do *sourdough* na formulação e elaboração de panetones

A formulação dos panetones compreendeu uma extensa lista de ingredientes e o processo de elaboração está descrito na Figura 4. Através de uma bolsa de estudos do

Projeto Casadinho entre a UFSM e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foi possível realizar algumas etapas dessa tese de doutorado dentro do ITAL com a supervisão da pesquisadora Dra. Elizabeth Harumi Nabeshima assim como na UNICAMP, no laboratório de microbiologia preditiva e quantitativa, sob a orientação do Professor Dr. Anderson Sant'Ana. Desse modo, a formulação final dos panetones está descrita na Tabela 4 e as demais formulações testadas (da primeira até a última) estão apresentadas ao final desse documento, na sessão de apêndices.

O panetone foi elaborado a partir da mistura de 30% *sourdough* (base farinha) e envolveu duas fases principais. Na primeira fase (Fase 1), parte dos ingredientes foram misturados em masseira espiral durante 9 minutos na velocidade lenta e 2 minutos na velocidade rápida para que o *sourdough* fosse bem incorporado com os demais ingredientes. A massa resultante dessa mistura foi chamada de esponja (ou massa mãe) e foi colocada em câmara de fermentação à 23 °C por 16 horas. Na segunda etapa de obtenção do panetone (Fase 2), toda esponja preparada na fase anterior (Fase 1) foi misturada em masseira espiral com os ingredientes restantes da formulação. Deu-se o nome de massa final a massa elástica, extensível e brilhante resultante ao final da fase 2. A massa final foi dividida em porções de 275 g ou 550 g conforme o tamanho da forma de panetone. Após a divisão e boleamento, as porções seguiram para a câmara de fermentação onde foi conduzida a segunda fermentação, também dita como fermentação final, que foi realizada a 32 °C por aproximadamente 2 horas ou até que o panetone atingisse o ponto ideal de assamento. Quando a massa atingiu o topo das formas, os panetones foram assados em forno de lastro por 45 minutos a 180 °C. A seguir os panetones foram resfriados e embalados.

Importante mencionar que a etapa de resfriamento foi considerada crítica porque todos os panetones (com e sem adição de conservantes) resfriaram sem nenhuma proteção externa ficando expostos ao ar e a contaminação ambiental. Por isso, um dia antes, a sala destinada para isso foi higienizada com água sanitária e ácido perclórico afim de diminuir a contaminação por esporos fúngicos ou qualquer micro-organismo que pudesse servir de contaminação inicial para os panetones recém

assados. Como o objetivo maior dessa tese foi justamente analisar a vida útil de panetones sem a adição de conservantes foram tomadas todas as providências para minimizar os riscos de contaminação. Somente pessoas autorizadas puderam entrar nessa sala durante o tempo de resfriamento e elas foram instruídas a usar luvas, toucas e máscaras. Os panetones permaneceram nessa sala até atingirem a temperatura interna de 36 °C para então serem embalados um a um e identificados. Foi utilizado um termômetro digital tipo espeto para esse fim.

Para a realização deste estudo, além da metodologia de Garofalo et al. (2008) outros estudos (BENEJAM, STEFFOLANI, LEÓN, 2009; MONTANARI et al., 2014; LORENZ, BRUMMER, 2003) foram utilizados como base para a elaboração da massa de panetone com algumas modificações. O processo de fabricação do panetone envolveu bastante tempo e dedicação, pois a fermentação natural necessitou mais tempo quando comparado com o processo de fermentação tradicional, ou seja, com a utilização de fermento comercial. As etapas envolvidas e os principais passos da fabricação do panetone estão apresentados na Figura 4. Com relação às formulações de panetones, foram testadas 19 formulações até se chegar a um padrão de qualidade considerado satisfatório. Durante o experimento realizado em Campinas, SP, foi possível contar com toda a assistência técnica e instrumental do Cereal Chocotec, que é um centro dentro do Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL).

Tabela 4. Formulação final utilizada no preparo dos panetones.

Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	76,0	760,0
Enzima Spring	0,045	0,45
Ácido ascórbico	0,005	0,05
Datem	0,5	5,0
Monoglicerídeos (PH 300)	0,5	5,0
Glúten	4,5	45,00
Gemas pasteurizadas	9,5	95,00
Malte seco	1,0	10,0
<i>Sourdough</i>	30,0	300,0
Água	37,5	375,0
Açúcar	20,5	205,0
Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	24,0	240,0
Fase 1	180,0	1800,5
Gordura Tri Cake 13 LT (80% lipídios)	15,0	150,0
Açúcar	17,5	175,0
Ácido ascórbico	0,008	0,08
Sal	1,0	10,00
Mel	2,0	20,0
Sorbitol	0,02	0,15
Aroma de panetone	0,8	8,0
Gotas de chocolate	50,0	500,0
OU Blend de frutas	50,0	500,0





Figura 4. Processo de elaboração do panetone

#### 4.2.13 Caracterização e análises dos panetones

A atividade hidrogeniônica (pH) das amostras de panetone e a acidez total titulável (ATT) foram determinadas pelos mesmos métodos usados para a análise de farinha de trigo. A atividade de água foi analisada diretamente no analisador de atividade de água (Aqualab, S 4TEV, Decagon, USA) utilizando a técnica do “ponto de orvalho”, ou seja, a temperatura que o ar atinge a saturação. A determinação foi realizada através da medida da temperatura do espelho resfriado quando a condensação ocorre. Esta temperatura está relacionada com a umidade relativa e

consequentemente com a atividade de água. As amostras de panetone foram homogeneizadas e acondicionadas nas cápsulas do analisador de atividade de água tomando o cuidado para não ultrapassar a metade do volume das mesmas. A determinação foi conduzida em triplicata à 25 °C.

A umidade do panetone foi realizada em duas fases. Na primeira fase, o panetone foi preparado de acordo com o método 62-05.01 (AACCI, 2010), sendo as fatias dos panetones picadas e homogeneizadas (casca + miolo). Em seguida foi pesado 10 g de amostra em cápsulas de alumínio, que posteriormente foram levadas para estufa a 70 °C/5 h, depois resfriadas e pesadas. Numa segunda fase, conforme o método 44-19.01 da AACCI (2010) modificado, o resíduo seco foi triturado em gral. A partir da amostra triturada no gral, uma alíquota de 2 g de amostra foi pesada em cápsula de alumínio. Após a pesagem, as cápsulas contendo as amostras foram levadas para estufa a 130 °C/1h, resfriadas e pesadas. A diferença entre o peso inicial e o peso final foi expresso como teor de umidade (%).

O volume específico dos panetones foi determinado 2 horas após o assamento utilizando o método de deslocamento de sementes de colza, conforme o método 10.05.01 da AACCI (2010). Foi utilizado o medidor de volume da marca Vondel Mill (Modelo MDMV 03/MVP 1300, Série 60, Vondel Indústria e Comércio de Máquinas e Componentes Ltda, São José dos Pinhais - PR). O volume específico foi calculado pela razão entre o volume ocupado e o peso dos panetones. As análises foram realizadas em triplicata.

A avaliação da cor do miolo dos panetones foi determinada da mesma forma que na farinha de trigo. O produto, após resfriamento, foi fatiado em fatiadeira industrial e as 3 fatias centrais foram as escolhidas para a análise. Foi efetuada uma leitura para cada lado da respectiva fatia.

A firmeza instrumental foi determinada em texturômetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Haslemere, GBR) segundo o método nº 74-09.01 da AACCI (2010), utilizando duas fatias de 10 mm de espessura para cada repetição. As condições de teste foram: plataforma HDP/90; probe de alumínio P/35; velocidade de pré-teste = 1,7 mm/s; velocidade de teste = 1,7 mm/s; velocidade de pós-teste = 3,0 mm/s; 40 % de compressão da amostra; limiar de força = 0,05 N; com medidas de firmeza expressas em N.

#### 4.2.14 Vida útil dos panetones

Os panetones foram armazenados no Cereal Chocotec, do Itai, em ambiente com temperatura de 25 °C e umidade relativa controlada de 75% a fim de simular o ambiente de supermercados e padarias. Os panetones foram monitorados em relação ao desenvolvimento de bolores e leveduras. A quantificação de bolores e leveduras foi realizada por meio da semeadura, em superfície, de 0,1 mL de cada diluição decimal seriada, em triplicata, utilizando o ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% até pH 3,5 (BRASIL, 2003). A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 25 °C, por cinco dias. As amostras foram analisadas em triplicata. As análises foram realizadas a cada 14 dias sendo conduzidas até 180 dias após a fabricação.

#### 4.2.15 Comitê de ética e pesquisa

Esse projeto de pesquisa foi submetido para avaliação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (Número CAAE 46155415.6.0000.5346). Após a aprovação do mesmo, voluntários foram convidados para participar da análise sensorial do produto elaborado. Os voluntários foram instruídos a ler cuidadosamente o termo de consentimento livre e esclarecido antes de participar da avaliação sensorial do produto. Esse termo informava e orientava quanto à pesquisa e também indicava os riscos e benefícios para os voluntários. O voluntário era convidado a experimentar amostras de panetones elaborados com *sourdough*, ou seja, um fermento composto por bactérias ácido lácticas e leveduras, e avaliar alguns atributos de qualidade, aceitabilidade e de intenção de compra. A título de comparação, amostras de panetones controles e comerciais também foram distribuídas aos voluntários da pesquisa objetivando a mesma avaliação. Foi informado que o risco envolvido nessa exposição ao produto era o de algum tipo de alergia, como por exemplo, ao glúten ou aos ovos. Logo, caso o indivíduo informasse ter doença celíaca ou apresentasse sintomas de inchaço ou desconforto ao ingerir alimentos similares ao da pesquisa, os mesmos eram informados que não deveriam participar para não sofrerem risco à sua saúde. A pesquisa não ofereceu nenhum benefício direto para o participante. Tratou-se de um estudo experimental onde foi testado a aplicação de cepas selecionadas

com a finalidade de aumentar a qualidade e durabilidade de panetones a partir de formulações utilizando *sourdough*. Na sessão de Apêndices dessa tese foi colocado à disposição dos leitores o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o convite para participação da avaliação sensorial anexado nos murais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e a ficha de avaliação sensorial apresentada para os participantes da pesquisa.

#### **4.2.16 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *software Statistica* versão 7.0 (2004, Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e também o SAS. As médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* e também pelo *Levene's*, considerando o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Todos os dados foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvios-padrão.

## **5 ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS**

### **5.1 ARTIGO 1 – NATURAL CONSERVATION ATTACHED TO THE USE OF MICROORGANISMS**

Esse artigo de revisão foi aceito no periódico Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas (Online), ISSN 1679-0375, Área de avaliação em Ciência de Alimentos, Classificação C.

## Natural conservation attached to the use of microorganisms

Raquel Facco Stefanello, Leadir Lucy Martins Fries, Marina Venturini Copetti

Federal University of Santa Maria, Center for Rural Sciences, Post-Graduate Program in Food Science and Technology. Santa Maria, RS.

**RESUMO:** Os pães fazem parte da nossa alimentação básica, salvo raras exceções. Atualmente estamos envolvidos por uma variedade tão grande de marcas e produtos que acabamos optando pelo item que corresponde ao nosso desejo imediato de consumo. Os consumidores, por sua vez, estão mais preocupados com sua alimentação e procuram alimentos mais saudáveis e com o mínimo de conservantes possível. Dessa forma as indústrias necessitam inovar e lançar opções mais naturais para satisfazer essas atuais mudanças. Contudo, ainda se faz necessário aliar a pesquisa com a tecnologia para elaborar produtos que atendam essa nova realidade. Essa revisão traz consigo o objetivo de informar sobre a bioconservação utilizando micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas a fim de sensibilizar as indústrias e os potenciais consumidores a respeito de alguns estudos sobre produtos elaborados com bioconservantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** bioconservação, bactérias ácido lácticas, fermentação, *sourdough*.

**ABSTRACT:** Breads are part of our basic food, with rare exceptions. We are currently involved in such a wide variety of brands and products that we end up opting for the item that matches our immediate desire for consumption. Consumers, on the other hand, are more concerned about their food and are looking for healthier foods with as few preservatives as possible. In this way, industries need to innovate and launch more natural options to meet these current changes. However, it is still necessary to combine research with technology to produce products that meet this new reality. This review includes the objective of reporting on bioconservation using microorganisms that produce antimicrobial substances in order to sensitize industries and potential consumers about some studies on products made with bioconservants.

**KEY WORDS:** bioconservation, lactic acid bacteria, fermentation, *sourdough*.

### 1. INTRODUCTION

Fungi are versatile organisms capable of growing in various types of foods, including cereals, meats and fruits. They are important as deteriorators of different foods and cause significant economic losses in the food industry. Several strategies have been used to extend product shelf life, such as heat treatments, irradiation of infrared or microwave products, use of modified atmosphere in the package and addition of chemical preservatives (such as sorbic acid, benzoic and propionic), as well as prevention through the application of hygienic practices that reduce the microbiological contamination of the products.

In bakery products, the adoption of good manufacturing practices reduces fungus contamination, especially from ambient air, and the use of chemical preservatives makes fungus germination and growth difficult (LEGAN, 1993). A solution without the use of chemical preservatives would be the use of microorganisms during the elaboration of the products, which through their metabolites would offer a bioconservation to the products for the production of natural antimicrobial compounds (SCHNÜRER, MAGNUSSON, 2005). Food preservation based on the use of natural compounds or microorganisms has been highlighted as an

alternative to reduce economic losses due to microbiological contamination of raw materials and food products in order to reduce the incidence of foodborne diseases (GALVEZ et al., 2008), as well as the occurrence of fungal deterioration.

Baked goods are easily subject to deterioration caused by molds and yeasts, especially when moisture is quite high, as is the case of sweet breads and breads (SMITH et al., 2004). The development of molds leads to economic losses that are relevant to the baking industry, reducing sales, causing the formation of unpleasant odors, known as "off-flavors", and can promote the formation of substances harmful to health, such as mycotoxins (SMITH et al., 2004). Among the protective microorganisms, lactic acid bacteria (BAL) stand out due to their ability to produce compounds with fungicidal or fungicidal effects (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010). Some studies have demonstrated the antifungal activity of LAB in laboratory conditions (HASSAN; ZHOU; BULLERMAN, 2015; LAVERMICOCCA; VALERIO; VISCONTI, 2003), while other investigations have sought to highlight the ability of some antifungal BAL strains to effectively prevent fungal baked bakery products (CODA et al., 2011; RIZZELLO et al., 2011; RYAN; DAL BELLO; ARENDT, 2008; STRAIN et al., 2000; ZHANG et al., 2010).

## 2. QUALITY OF BAKED PRODUCTS

Breads, like other baked goods, are perishable foods that undergo physical, chemical, sensory and microbiological changes during storage. The decrease in the quality and / or freshness of these products is closely related to storage time and is known as staling. Over time, the firmness increases significantly, the crunchiness of the bread crust decreases, the bread loses its flavor (smell), assuming a rancid flavor. These complex phenomena are a consequence of the retrogradation of the gelatinized starch granules during cooking, the exchange of moisture between the starch and the constituent proteins of the bread, an increase in the interaction between the protein and starch fraction, a redistribution of water in bread and a removal of aromatic molecules. The occurrence of mold in food is potentially dangerous to public health and is also an important economic problem. In Western Europe, economic losses related to the presence of fungi on bread were estimated at more than 200 million Euros per year (LEGAN, 1993), leading to losses of 1% and 5% of bakery products, depending on the season, type of product and mode of production (VEGA et al., 1998).

Among the most isolated fungi and related to the deterioration of baked goods, we can mention those of the genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Rhizopus* (LEGAN, 1993), while deteriorating yeasts of bakery products and ingredients belong to the genera *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Pichia*, *Candida* and *Debaryomyces* (LEGAN, VOYSEY, 1991). Baked products can be protected against deterioration caused by fungi and yeasts and by the spores that have contaminated the products using BAL in the preparation of fermented pasta, since the use of these products provides certain antimicrobial activity (LAVERMICOCCA et al., 2000).

Some fungi are able to resist the use of certain preservatives. For example, some species of the genus *Penicillium* can grow in the presence of potassium sorbate (DAVIDSON, 2001) and other fungi have the ability to degrade the sorbate, including by stimulating the production of ochratoxin A (NIELSEN; RIOS, 2000). Bacterial breakdown of bread is mainly caused by a microorganism called *Bacillus subtilis* (COLLIN et al., 1991), derived from raw materials, bakery atmosphere and equipment surfaces (BAILEY, VON HOLY, 1993), becoming a major economic concern in the bakery industry (SUHR; NIELSEN, 2004).

### 3. CHEMICAL PRESERVATIVES

The most commonly used chemical preservatives are weak organic acids, such as propionic, benzoic and sorbic acid; whose efficiency is higher at low pH because of the dissociation of their molecules (LEGAN, 1993). Previous studies have shown that calcium propionate, sodium benzoate and potassium sorbate were effective in inhibiting some isolates from bakery products at pH 4.5 when a concentration of 0.3% was applied. Potassium sorbate was also effective at a concentration of 0.03% (MARIN et al., 2002).

#### 3.1 Bioconservation

Several reasons have led to the search for new alternatives to minimize the risks associated with presence or deterioration by fungi in food, which include consumer demands for food quality and safety, and increased government concern about environmental and safety issues. The term "bioconservation" refers to the prolonged shelf life and safety of foods that use microorganisms or their metabolites in their manufacture (ROSS et al., 2002). Thus, this concept occupies a prominent place, exploring the use of microorganisms and/ or their metabolites in different food processes.

#### 3.2 Lactic Acid Bacteria (LAB) as Bioconservants

LABs are food grade microorganisms whose diverse metabolism and the ability to produce natural antifungal compounds become a versatile, technically feasible and cost-effective biological alternative for fungus control (SCHWENNINGER et al., 2005). Due to their nutritional needs, LABs are generally grown in enriched media and are found in dairy products, meats, meat products and cereal products (CARR et al., 2002). These bacteria are mainly divided into four genera: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. They are traditionally used as preservatives to prevent spoilage and to extend the shelf life of many foods.

LABs play a key role in the fermentation of foods, contributing not only to the development of desired sensory properties in the final product, but also to their microbiological safety (SMAOUI et al., 2010). According to Magnusson et al. (2003), three mechanisms may explain the antimicrobial efficacy of these microorganisms: the production of organic acids, competition for nutrients and the production of antagonistic compounds. The antimicrobial effect of LAB is mainly related to the production of lactic, acetic, propionic, sorbic, benzoic, hydrogen peroxide, diacetyl, ethanol, phenols and other protein compounds. Some strains are capable of synthesizing antimicrobial substances such as bacteriocins (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010).

However, the use of LAB requires an in-depth study on the parameters that modulate its antifungal properties. Several are the parameters, including temperature, incubation time, growth medium, pH and nutritional factors (BATISH et al., 1997). The studies performed by Sathe et al. (2007) demonstrated that the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* CUK501 was maximal (1,280 AU / ml) at 30°C when the culture was at the end of its log phase. These results were consistent with those obtained previously by Batish et al. (1990), who observed that the antifungal activity of a strain of *Lactobacillus acidophilus* was maximal at 30°C after 48 hours of incubation, while increasing the incubation period resulted in a lower antifungal activity. This decrease was related to a metabolism of active compounds or to their enzymatic degradation.



The culture medium in which the microorganism will be inoculated can significantly modulate the metabolism of the antifungal compounds generated by LABs (BATISH et al., 1990; ROY et al., 1996). From some studies (BATISH et al., 1990) the Elliker broth was presented as the best medium for the production of antifungal compounds of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD 28.3 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* against fungi, compared to media M17 and MRS. The antifungal effectiveness of LAB can be enhanced with a slight increase in NaCl concentration (from 0.5% to 3%) in the growth medium for *Lactobacillus rhamnosus* (EFFAT et al., 2001) which may be related to a synergistic effect between NaCl with organic acids and antifungal substances metabolised by LAB (EFFAT et al., 2001). The pH also exerts a strong influence on the production of antifungal compounds by LAB (BATISH et al., 1997; SATHE et al., 2007). Studies have reported (CORSETTI; GOBBETTI; ROSSI, 1998) that the optimum pH range for the production of these compounds is between 5.0 and 6.0.

Many are the compounds released by the LAB. As its name suggests, lactic acid and acetic acid are the main products of the fermentation of carbohydrates by LAB. These acids generally recognized as safe agents for preserving foods, diffuse through the target microorganism membrane (DESMAZEAUD, 1991) and then reducing the pH to inactivate cytoplasmic most metabolic activities of micro-bodies of interest. The acetic acid, by having a high dissociation constant and not being assimilated by the energy metabolism has been described as being more effective than lactic acid and is by far the best mold growth inhibitor (BATISH et al., 1997). However, some authors (GAGIU et al, 2013; GEREZ et al, 2013; SCHNÜRER; MAGNUSSON 2005), which describe antifungal activity of another organic acid from the LAB, as phenylactic acid that was able to inhibit the growth *Penicillium expansum* of MPI / FS2, and *Aspergillus niger* FTDC3227 iDM1, *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* FTDC3226 IDM623 at a concentration of about 50 mg/ml (LAVERMICOCCA et al., 2000).

### 3.3 Applications of Bioconservation

The use of natural ferments as a form of initiation and propagation of a fermented mass in brewing processes already have a long tradition and still plays a very important role in improving the quality and prolongation of the useful life of these fermented products (ARENDRT; 2007, KATINA et al., 2006). The use of yeast has been intensely studied in recent times, due to consumer demand for foods containing a lower amount of chemical preservatives. Various yeasts have been developed to increase shelf life and improve sensory characteristics of bread. Natural yeast is a complex ecosystem in which microorganisms, exerting a symbiosis between yeasts with lactic acid bacteria, are highly adapted to environmental conditions (temperature, pH, acidity, maltose as the most abundant fermentable carbohydrate and fructose as a potential electrons), for the production of antimicrobials (VERA et al., 2009).

In a study by Cizeikiene et al. (2013) strains producing organic acids and bacteriocins (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 and KTU05-10) were used in preparation of fermented bread dough showing fungistatic and fungistatic activity against *Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger*. This work indicates that these bacteria can be widely used in the food industry as bioconservants because of their broad spectrum of inhibition.

The use of *L. plantarum*, *Lactobacillus brevis* CR772 and CRL 796 in the formulation of starter cultures together with *Saccharomyces cerevisiae* was studied to significantly improve bread quality and prevent fungal decay (GEREZ et al., 2013). The viability of NaCl reduction

in wheat bread focusing on shelf life and compensation using natural yeast in association with a chemical preservative has been studied (Belz et al., 2012). The authors performed challenge tests using fungi commonly found in bakeries such as *Penicillium expansum*, *Fusarium culmorum* and *Aspergillus niger*. In this study, the NaCl reduction reduced the shelf life by 1-2 days. The addition of fermented pasta with antifungal activity prolonged the shelf life of 12-14 days, while the addition of 0.3% of calcium propionate provided a shelf life of only 10-12 days. The results of this study indicate that the addition of natural yeast prepared with a specific antifungal strain (*Lactobacillus amylovorus* DSM 19280) can replace the addition of chemical preservatives and compensate the reduced level of NaCl, guaranteeing product safety (BELZ et al., 2012).

#### 4. CONCLUSION

From this analysis of data available in the literature on the antifungal activity of LAB, the ability of some strains to reduce or even suppress fungal growth through the production of several low molecular weight antifungal metabolites was highlighted. The control of the optimal conditions responsible for the higher production of *in vitro* and food matrix antifungal metabolites could increase the potential offered by LAB as natural food-grade bioconservatives. Thus, the use of LAB and its metabolites to control mold development seems to be a promising strategy for bioconservation in perishable foods or frequently contaminated by toxigenic fungi strains, as for bakery products. In view of the growing concern for food safety, microorganisms that are used because of their antifungal potential need careful food safety assessment in order to ensure a safe product for the consumer.

#### 5. REFERENCES

- ARENDDT, E. K.; RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, v. 24, n. 2, p. 165–174, 2007.
- BAILEY, C.P.; VON HOLY, A. Bacillus spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiology*, v. 10, p. 287-294, 1993.
- BATISH, V.K.; LAL, R.; GROVER, S. Effect of nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 45, p. 74-76, 1990.
- BATISH, V.K.; ROY, U.; LAL, R.; GROVER, S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.17, n. 3, p. 209-225, 1997.
- BELZ, M. C. E. et al. The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, n. 2, p. 493–501, 2012.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, p. 281–370, 2002.
- CIZEIKIENE, D. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, v. 31, n. 2, p. 539–545, 2013.
- CODA, R. et al. Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 10, p. 3484–3492, 2011.
- COLLINS, N.E.; KIRSCHNER, L.M.; VON HOLY, A. Characterization of *Bacillus* isolated from rye bread, bakery equipment and raw materials. *South African Journal of Science*, v. 87, p.

62-66, 1991.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria : identi cation of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. p. 253–256, 1998.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, v. 21, n. 4, p. 370–380, 2010.

DAVIDSON, M.P. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. DOYLE; L.R. BEUCHAT; I.J. MONTVILLE (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington: ASM press, 2001. p.385-392.

EFFAT, B.A.; IBRAHIM, G.A.; TAWFIK, N.F.; SHARAF, O.M. Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, v. 29, p. 251-262, 2001.

GALVEZ, A.; LUCAS-LOPEZ, R.; ABRIOUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, p. 125-152, 2008.

GAGIU, V. et al. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* strains and calcium propionate on spoilage fungi. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 18, n. 2, p. 8214–8220, 2013.

GEREZ, C. L. et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, v. 64, n. 3, p. 231–237, 2013.

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

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

HASSAN, Y. I.; ZHOU, T.; BULLERMAN, L. B. Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International*, 2015.

KATINA, K. Ā. et al. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. v. 39, p. 1189–1202, 2006.

LAVERMICOCCA, P. et al. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 4084–4090, 2000.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. v. 69, n. 1, p. 634–640, 2003.

LEGAN, J.D. Moulds spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 32, p. 33-53, 1993.

LEGAN, J.D.; VOYSEY, P.A. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 70, p. 361-371, 1991.

MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROOS, S.; SJÖGREN, J.; SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 219, p. 129–135, 2003.

MARIN, S.; GUYNOT, M.E.; NEIRA, P.; BERNADO, M.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 203-211, 2002.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs , and the possible application in active packaging , with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 60, p. 219–229, 2000.

- NIELSEN, P.V., DE BOER, E. Food preservatives against fungi. In R. A. SAMSON; E. S. HOEKSTRA; J. C. FRISVAD; O. FILTENBORG (Eds.). Introduction to food-and airborne fungi. Utrecht: Centraal Bureau voor Schimmelcultures, 2000. p.357–363. 2001
- PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, v. 71, p. 525–541, 1991.
- RIZZELLO, C. G. et al. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*, v. 127, n. 3, p. 952–959, 2011.
- ROSS, R.P., MORGAN, S., & HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 3, p. 16-22, 2002.
- RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, n. 3, p. 274–278, 2008.
- RYAN, L.A.M.; ZANNINI, E.; DAL BELLO, F.; PAWLOWSKA, A.; KOEHLER, P.; ARENDT, E.K. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel foodgrade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 276-283, 2011.
- SATHE, S.J.; NAWANI, N.N.; DHAKEPHALKAR, P.K.; KAPADNIS, B. P. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2622-2628, 2007.
- SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 1–3, p. 70–78, 2005.
- SCHWENNINGER, S.M.; VON AH, U.; NIEDERER, B.; TEUBER, M.; MEILE, L. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 111-119, 2005.
- SMAOUI, S.; ELLEUCH, L.; BEJAR, W.; KARRAY-REBAI, I.; AYADI, I.; JAOUADI, B.; et al. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 1132-1146, 2010.
- SMITH, J. P. et al. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products — A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 1, p. 19–55, 2004.
- SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. v. 95, p. 67–78, 2004.
- STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, 2002.
- VEGA, M.C; MARTINEZ, M.C; ALBISU, M.; et al. Un problema de conservacion en productos de bolleria en fase de comercializacion. *Alimentaria*, v. 292, p. 77-80, 1998.
- VERA, A.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. *Food Microbiology*, v. 26, p. 728-733, 2009.
- ZHANG, C. et al. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 390–395, 2010.

## 5.2 ARTIGO 2 – TREHALOSE AS A CRYOPROTECTANT IN FREEZE-DRIED WHEAT SOURDOUGH PRODUCTION

Artigo publicado no periódico LWT - *Food Science and Technology* (*LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT + TECHNOLOGIE / FOOD SCIENCE + TECHNOLOGY*), ISSN 0023-6438, Área de avaliação em Ciência de Alimentos, Classificação A1.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production

Raquel Facco Stefanello<sup>a</sup>, Amanda Aimée Rosito Machado<sup>b</sup>, Carlos Pasqualin Cavalheiro<sup>c,d</sup>,  
Marlise Ladvoat Bartholomei Santos<sup>d</sup>, Elizabeth Harumi Nabeshima<sup>e</sup>, Marina Venturini Copetti<sup>d</sup>,  
Leadir Lucy Martins Fries<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Santa Maria, Rural Sciences Center, Department of Science and Food Technology, 1000 Borromeo Avenue, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Santa Maria, Department of Food and Nutrition, 3751 Independence Avenue, 98300-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil

<sup>c</sup> Federal University of Bahia, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production, 500 Adhemar de Barros Avenue, 40170-115, Salvador, BA, Brazil

<sup>d</sup> Federal University of Santa Maria, Natural and Exact Sciences Center, Department of Biology and Evolution, 1000 Borromeo Avenue, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Food Technology, Cereals and Chocolate Technology Center, 2880 Avenue Brazil, 13070-178, Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sourdough

Freeze-drying

Trehalose

Viability

Cryoprotectant/Chemical compounds studied in

this article

Trehalose (PubChem CID: 7427)

Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798)

L-(+)-Tartaric acid (PubChem CID: 444305)

Magnesium chloride (PubChem CID: 5360315)

### ABSTRACT

Sourdough, a mixture of wheat flour and water, fermented by the action of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, presents some technological advantages, such as improvement in dough structure, flavor, aroma, bread texture, and shelf life. Few studies related to methods of preservation of sourdoughs are currently available. This work aimed to test the cryoprotective effect of trehalose on microorganism survival and its effect on freezing, freeze-drying and storage of freeze-dried sourdough, and to molecularly identify predominant bacteria and yeasts. Refined and whole wheat flour were used to prepare the sourdough. On the 14th day of production, varying amounts of trehalose were added (0, 10 and 15%) and the sourdough was freeze-dried. The cryoprotective effect of trehalose was evaluated before and after freezing, after freeze-drying, and after 15, 30 and 45 days of storage. Predominant microorganisms were molecularly identified through amplification and sequencing of rDNA fragments. Addition of trehalose promoted a cryoprotective effect survival of microorganisms, and it was more significant for LAB. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala* and *Pediococcus pentosaceus*, were the main species recovered.

### 1. Introduction

Sourdough is a mixture of wheat flour and water fermented by the action of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts present in flour and in the environment (Rinaldi et al., 2015). Sourdough is a specific and stressful ecosystem characterized by low pH, high carbohydrate concentrations, low oxygen and higher cell counts of LAB [ $> 10^8$  colony forming units (CFU)/g] compared with yeasts [ $< 10^7$  CFU/g] (De Vuyst et al., 2014). Wheat breads made with sourdough show technological advantages compared with breads made with baker's yeast, such as improvement in dough structure (Arensk, Ryan, & Dal Bello, 2007), as well as in flavor, aroma, bread texture and shelf life (Chavan & Chavan, 2011).

Sourdough is advantageous because of its nutritional properties and beneficial effect on health by decreasing or increasing levels of certain compounds (antinutritive factors, phenolics and sterols). It also enhances or retards the bioavailability of nutrients (minerals, vitamin and dietary fibers) (Pontanus, Flander, & Karina, 2009). Sourdough presents artisan characteristics (natural status), traditional value and

gastronomic quality (De Vuyst et al., 2014), besides the additive-free image (Karina, Helmig, Auris, & Pontanus, 2006).

Three types of sourdough can be distinguished according to its manufacturing process (Giovetti & Settanni, 2007; De Vuyst, Vrancken, Ruyts, Rimaux, & Weckx, 2009). The first type (Type I) represents "spontaneous" sourdough (SS) fermentation processes based on back-slopping, i.e. the repeated cyclic re-inoculation of a new batch of flour and water from a previous dough derived from the so-called mother dough (De Vuyst et al., 2014). Another way of sourdough fermentation (Type II) results from the addition of a starter culture to the flour/water mixture (Gaggiato et al., 2007). Microbial strains such as *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus rossiae* are used in the fermentation process, which usually takes one to three days (Gaggiato et al., 2007; Nionelli et al., 2014; Rizzello, Luzzani, Montemurro, & Gobetti et al., 2016). The third type (Type III) of sourdough fermentation process represents a mixture of Type I and Type II processes (i.e., sourdough initiated with a starter culture followed by traditional back-slopping; De Vuyst et al., 2014).

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [raquelstefanello@gmail.com](mailto:raquelstefanello@gmail.com) (R.F. Stefanello), [amanda.rosito@gmail.com](mailto:amanda.rosito@gmail.com) (A.A.R. Machado), [carlos.cavalheiro@ufba.br](mailto:carlos.cavalheiro@ufba.br) (C. Pasqualin Cavalheiro), [marliseb@ufsm.br](mailto:marliseb@ufsm.br) (M.L. Bartholomei Santos), [elnabeshima@ufop.gov.br](mailto:elnabeshima@ufop.gov.br) (E.H. Nabeshima), [mv@focaf.ufsm.br](mailto:mv@focaf.ufsm.br) (M.V. Copetti), [lcufsm@ufsm.br](mailto:lcufsm@ufsm.br) (L.L.M. Fries).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>

Received 20 May 2017; Received in revised form 1 November 2017; Accepted 8 November 2017

Available online 09 November 2017

0022-6430/© 2017 Published by Elsevier Ltd.



Microbial stability of the fermented dough is influenced by several factors. Among the aspects that affect microbial stability, we can highlight those related to environmental contamination and use of different batches of flour during propagation time (Lattanzi, Minervini, & Gobberti, 2014). Daily back-slopping process is a fastidious procedure that demands time and skilled workforce. Hence, some bakers prefer to preserve the sourdough at low temperatures or in dried form. It is important to observe that besides rheological properties relevant for bread quality, high survival rates during freezing or drying are necessary for the economic production of dried sourdough (Brandt, 2007). An alternative to obtain dried sourdough would be using freeze-drying technology. However, few studies related to this method of sourdough drying are available in current literature.

Freeze-drying is widely used as a long-term preservation technique for bacteria and yeast, where they need to be previously frozen and water is removed by sublimation without passing through liquid phase (Santo, Lima, Torres, Olivetira, & Pissano, 2013). Low temperatures, especially below freezing point, may cause severe damage to microorganisms due to intracellular ice crystals formation (Momon, Matsumoto, Maruyama, & Yasusaka, 2010). Thus, a cryoprotective agent may be added before the freeze-drying process, because it plays a significant role in microorganism preservation (Morgan, Herman, White, & Vesey, 2006).

Several studies suggest using trehalose as a cryoprotective agent due to high microorganism survival rates after freezing and freeze-drying processes (Raudera, Fraser, Chambers, & Stanley, 2009; Nakamura, Takagi, & Shima, 2009). Trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside) is a non-reducing disaccharide of glucose, and its most significant function is to protect proteins and lipids included in the membrane structure against different kinds of stress conditions such as heat and freeze-thaw (Yoshiyama et al., 2015). The main advantage of using trehalose compared to other sugars, such as sucrose and lactose, is its water-binding ability, consequently preventing intracellular and extracellular ice crystals formation (Costa, Ushil, Teixido, Garcia, & Vilas, 2006). Also, trehalose is stable, colorless, odor-free, only 45% as sweet as sucrose, and prevents browning of the product during processing (Maillard reaction) (Schiraldi, De Lencina, De Rosa, & De Rosa, 2002).

Since sourdough is a stressing ecosystem and there is no clear relationship between a typical sourdough and its microbiota, the identification of microorganisms involved in this process is fundamental to verify the relationships between LAB and yeast species (De Vuyst et al., 2014). Molecular DNA-based methods (DNA fingerprinting and sequencing) have become essential for the identification of LAB and yeasts (Lhomme et al., 2016). Compared with phenotyping methods, molecular DNA-based identification methods offer a much higher taxonomic resolution of species up to strain level (De Vuyst et al., 2014).

Several studies (De Vuyst et al., 2009; De Vuyst et al., 2014; Ercolini et al., 2013; Gagliano et al., 2007) described the microorganisms present in sourdough. However, research involving the production of freeze-dried sourdough (FSS), as well as its microbiota, is uncommon (Messier, Barber, & Flucher, 1995). Therefore, this work aimed to test the cryoprotective effect of trehalose on microorganism survival in an artisanal FSS. We also identified bacteria and yeasts present in FSS by molecular techniques.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material

Commercial refined wheat flour (RWF) was provided by a local supplier (Ipiranga mill, Santa Maria, Brazil) in a 50 kg-batch of Antoniazzi Massa Tipo 1 (06-03-2013); whole wheat flour (WWF) was purchased from Cibra (Panambi, Brazil) in a 5 kg-batch of PM1-5 (030105). Flours used for preparing the sourdough were stored in a freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in plastic bags and thawed at room temperature before use. Malt extract (Unimalt-WC 15826501) was purchased from Myler (São Paulo, Brazil). Trehalose was provided by Protzyn (São Paulo, Brazil).

RWF presented the following characteristics: moisture,  $12.4\% \pm 0.1\%$ ; protein (N x 5.40),  $10.5\% \pm 0.2\%$ , ash content of dry matter (d.m.) was  $0.53\%$ . WWF contained  $9.6\% \pm 0.4\%$  of moisture,  $11.9\%$  (d. m.) of protein, and  $1.5\%$  of ash content. Farinograph characteristics of RWF were absorption of  $59.5\%$  and stability of  $8.7$  min. Values for dough deformation energy (W), representing the energy necessary to inflate the dough bubble to rupture point, was  $251 \times 10^{-4}$  J for RWF, and  $199 \times 10^{-4}$  J for WWF, respectively. Falling number values were  $280 \pm$  for RWF, and  $267 \pm$  for WWF. LAB and yeasts were counted in RWF and in WWF before sourdough preparation. For these analysis, results were expressed in CFU per mL. For RWF, values were  $2.90 \log$  CFU/mL and  $1.63 \log$  CFU/mL, respectively; for WWF, they were  $3.41 \log$  CFU/mL and  $4.25 \log$  CFU/mL, respectively (data not shown).

### 2.2. Production and propagation of sourdough

Dough was prepared and sourdough propagated according to traditional protocols (Minervini et al., 2012), based on back-slopping without using starter cultures or baker's yeast (Fig. 1). Dough preparation was made by mixing RWF (50 g) and WWF (50 g) with malt extract (5 g) and tap water (120 mL) for 5 min. Dough was incubated in a microbiological chamber (CIENLAB, CE-210/80, São Paulo, Brazil) at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 72 h, and was considered dough prior to fermentation and before becoming sourdough. Each sourdough was propagated every 12 h at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 14 days, and the final dough was called mother dough.

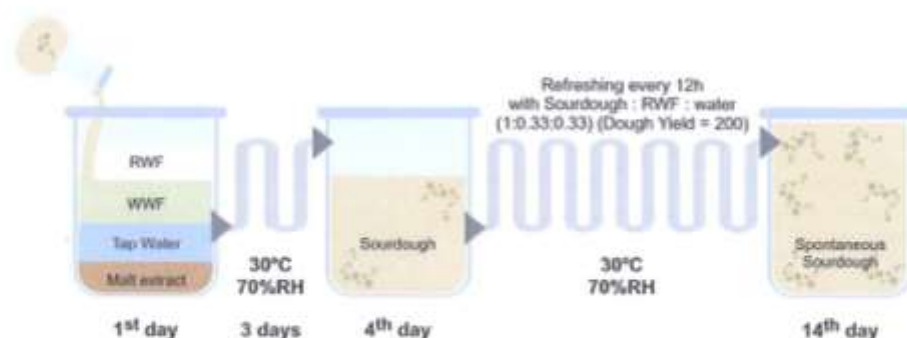


Fig. 1. Production and propagation of a "spontaneous" sourdough from the blend of refined wheat flour (RWF) and whole wheat flour (WWF) during 14 days. Relative humidity (RH).

For refreshment procedure (Fracoloni et al., 2013), dough from the day before was used as starter inoculum to ferment the new mixture of RWF (100 g), and sterile tap water (50 mL), having a dough yield of 200 (DY = dough weight x 100/flour weight). Preparation and propagation were repeated four times.

### 2.3. Determination of pH and total titratable acidity during back-slopping

Dough pH and total titratable acidity (TTA) was determined on 10 g of dough homogenized with 90 mL of deionized water at room temperature, and expressed as g of lactic acid/g of dough (Gamel, Abdel-sal, & Tosh, 2015). pH measurement was done using a pH meter (Digimed<sup>®</sup>, DM-22, SP, Brazil), and TTA was determined by standard method 02-31.01 (AACC, 2010) using 0.1 M NaOH and phenolphthalein as indicator (pH 8.3). These analyses were carried out during 14 days of back-slopping.

### 2.4. LAB and yeast cell counting

LAB and yeast cells were counted in the sourdough produced during back-slopping on days 1, 4, 6, 8, 10 and 14; samples were taken prior to each back-slopping step. Ten grams of sourdough were homogenized with 90 mL of sterile peptone water (1% [wt/vol] of peptone and 0.9% [wt/vol] of NaCl solution). LAB were counted using MRS not supplemented (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) through pour plate method (Rizzello, Lorusso, Montemurro, & Gobetti, 2016). Plates were incubated at 30 °C for 48 h, under anaerobiosis (AnaeroJar, Oxoid). Yeasts were counted on acidified (pH 3.5; 10% tartaric acid) Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, Mich.) using spread plate technique (Coda et al., 2011) at 25 °C for 24–72 h.

### 2.5. Freeze-drying of sourdough

On the 14th day of production, sourdough was divided among three containers with 600 g per container (Fig. 2). In each container, a different concentration of trehalose was added: 0% of trehalose (control - SS0), 10% (60 g) of trehalose (SST10) and 15% (90 g) of trehalose (SST15). Thus, treatments were divided into 12 individual fractions, containing 50 g each. Freezing was performed (at -80 °C) using an ultra-low temperature freezer (Thermo Scientific, FormaTM 900 Series, USA) for 24 h.

After 24 h of freezing, cultures were transferred to a freeze-dryer (Terroni, LS 3000, São Paulo, Brazil). Freeze-drying was carried out for 60 h and was performed at -37 °C, at chamber pressure of 40 Pascal

(Pa). Freeze dried sourdoughs samples were ground in a basic analytical mill (Deleo, EDB-5, Porto Alegre, Brazil) and stored at room temperature. Samples were stored in metallic bags (8 cm × 12.5 cm) (Tradbor, 80TZ, São Paulo, Brazil) in a dry, odor-free and ventilated room for 45 days.

### 2.5.1. Evaluation of the cryoprotective effect of trehalose

To evaluate the cryoprotective effect of trehalose on samples of sourdough, total viable counts of LAB and yeast were measured according to the item §2.4. Analysis were realized before and after freezing, after freeze-drying and after 15, 30 and 45 days of storage (Bosnea, Moschakis, & Billaderis, 2014) on samples of sourdough with or without trehalose (SS0; SST10; SST15).

### 2.6. Molecular analysis

#### 2.6.1. Bacteria and yeast isolation

Bacteria and yeast selection was performed for samples of RWF, WWF, freeze-dried sourdough without trehalose (SS0) and freeze-dried sourdough with 10% trehalose (SST10). Isolation and identification analysis were done in duplicate. Sourdoughs were freeze-dried on the 14th day of production.

Bacteria counts were performed on samples of RWF, WWF, and sourdough (SS0 and SST10), by diluting 1 g of each sample in 10 mL of 0.85% saline solution, in a sterile flow hood, performing serial dilutions up to 10<sup>-8</sup>. From each dilution, 100 µL were inoculated in duplicate in culture media M17, MRS and PDA (Merck, Darmstadt, Germany). Cultures were incubated for 24–48 h in an anaerobic chamber, except those in PDA medium, at 37 °C. After that, colonies of each morphological type obtained were isolated in Petri dishes containing M17, MRS or PDA, according to their original medium of preference for growth.

For yeast count on samples of RWF, WWF, and sourdough (SS0 and SST10), aliquots of 0.1 mL from serial dilutions were spread in duplicate on acidified YM agar medium (1% glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 2% agar, 400 mg/L of chloramphenicol, pH 4.0) or acidified YEPG agar medium (0.5% yeast extract, 2% glucose, 1% peptone, 2% agar, 400 mg/L of chloramphenicol, pH 4.0). After incubation at 22–25 °C for 3–5 days, yeast colonies were counted and results were expressed as CFU/g of flour or freeze-dried sourdough sample. Representative colonies of each morphological type obtained were isolated and purified in Petri dishes containing YEPG medium (Landell, Hartfelder, & Valente, 2006). Strains were maintained in GYP medium (0.5% glucose, 2% malt extract, 0.5% yeast extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 2% agar), slants covered



Fig. 2. Process of freeze-drying of "spontaneous" sourdough (SS). SS0: "spontaneous" sourdough without trehalose; SST10: "spontaneous" sourdough with 10% trehalose; SST15: "spontaneous" sourdough with 15% trehalose.



with a layer of sterile mineral oil, and kept in the refrigerator.

### 2.6.2. Bacteria and yeast DNA extraction and sequencing

Total DNA from isolated colonies of bacteria was extracted using a traditional phenol-chloroform method (Sambrook & Russell, 2006). Bacteria species were identified through amplification and sequencing of a fragment of the 16S rDNA gene, using universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1525R (5'-AAG-GAGGTGWTGCARCC-3') (Lane, 1991). Samples were incubated at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 2 min at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

Total genomic DNA from yeast colonies was extracted as described by Osorio-Cabrera, Ramirez, Lopez, and Mamburay (2009), with some modifications (Mattana et al., 2014). Sequencing of D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal DNA was performed according to O'Donnell (1993), using NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAGG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3') primers. The PCR mix contained DNA Taq polymerase (1U) (Invitrogen), 1 × Buffer, MgCl<sub>2</sub> (3 mM), primers (70 μM), dNTPs (10 μM) and DNA (30 ng). Amplification conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 90 s, and final extension at 72 °C for 6 min.

### 2.6.3. Molecular identification

Sequences were obtained by automated sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp., USA), and protocols established by Ludwig Biotech Brazil company (Alvorada, RS, Brazil) were used. Obtained sequences were aligned using CLUSTAL-X (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997) and edited in BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1998). Sequences were assembled and compared with sequences reported in GenBank (bacteria and yeasts sequences) and in Mycobank and Yeast IP (yeast sequences), using basic local alignment search tool (BLAST) algorithm for identification. After identification, lineages were deposited in the Microorganism Collection Nucleus of the Adolfo Lutz Institute under the access code IAL 4533, IAL 4539–4543.

### 2.7. Statistical analysis

Results were initially submitted to Levene's test to check for homogeneity of variances, followed by one-way ANOVA and parametric Tukey's HSD test. The software SAS Studio 3.5–2016 (SAS Software, Cary, NC, USA) was used, at a 5% significance level, to check if there were significant differences between treatments.

## 3. Results and discussion

Sourdough microbiota can develop spontaneously, originating from flour and/or other ingredients (De Vuyst et al., 2014). WWF showed a slightly higher level of microbiological counts for yeasts (4.25 log CFU/g) than RWF (1.63 log CFU/g). However, microbiological counts for LAB did not differ by more than 1 log cycle. Values for LAB were 3.41 log CFU/g and 2.90 log CFU/g for WWF and RWF, respectively.

The predominance of species strongly depends on condition of dough propagation, type of flour or environment of each bakery. It was observed that in each sample of flour or freeze-dried sourdough, an association of LAB and yeast developed, which was characteristic of a specific type of substrate with regard to the number of species as well as to flour composition (Hammes et al., 2005). Besides providing nutrients, WWF is a non-sterile material, and these microorganisms can become dominant in sourdough due to daily and continuous back-slopping (De Vuyst et al., 2000).

### 3.1. pH and TTA during back-slopping

During the preparation of sourdough (Table 1), pH values decreased

Table 1

pH, total titratable acidity (TTA) and counts (Log CFU/mL) of LAB and Yeast on "spontaneous" sourdough (SS) during the production period (14 days) at 30 °C.

Production day	pH	TTA	LAB		Yeasts
			Log CFU/g		
1	5.91 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.07 <sup>a</sup>	
4	3.74 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.10 <sup>b</sup>	8.58 ± 0.41 <sup>b</sup>	6.54 ± 0.44 <sup>b</sup>	
8	3.58 ± 0.14 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.13 <sup>b</sup>	8.47 ± 0.90 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.42 <sup>b</sup>	
8	3.63 ± 0.09 <sup>bc</sup>	1.18 ± 0.09 <sup>bc</sup>	8.69 ± 0.13 <sup>bc</sup>	7.27 ± 0.19 <sup>a</sup>	
10	3.58 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.04 <sup>c</sup>	8.71 ± 0.12 <sup>bc</sup>	7.31 ± 0.18 <sup>a</sup>	
14	3.64 ± 0.14 <sup>bc</sup>	1.23 ± 0.06 <sup>c</sup>	9.02 ± 0.10 <sup>c</sup>	7.44 ± 0.31 <sup>a</sup>	

TTA, total titratable acidity (g of lactic acid/100 g dough); LAB, acid lactic bacteria; SS "spontaneous" sourdough. Mean and standard deviation of four determinations ( $n = 106$  to pH and TTA;  $n = 33$  to LAB;  $n = 32$  to Yeast). Values in the same column with different superscript are significantly ( $P \leq 0.05$ ) different.

( $P < 0.05$ ) on the first four days (from 5.9 to 3.7), while TTA increased during the 14 days of manufacturing (from 0.27 to 1.25). This pH decrease and hence acidity increase during the first four days is the result of lactic acid production by LAB (Miservini et al., 2012; Vrancken, De Vuyst, Rimaux, Altemeersch, & Weckx, 2011). This fact helps to inhibit growth of undesired microorganisms and contributes to development of sensorial characteristics of the final product (Leroy & De Vuyst, 2004). Sourdough used for manufacturing traditional Italian breads (Miservini et al., 2012) also showed pH values between 3.70 and 4.28. pH changes observed in our study agree with Vogelmann and Hertel (2011), who observed a sharp drop in pH after 12 h of sourdough fermentation (5.5–3.1), and with Hamal, Döng, Ehrmann, and Vogel (1997), who reported a drop in pH (4.28–3.35) after 42 h of sourdough fermentation.

In this study, the blend of RWF and WWF in the same proportion resulted in 1.01 g/100 g ash content and presented an adequate acidification. Ash measures the amount of bran present in wheat flour, and according to Chavan and Chavan (2011), this fraction contains more minerals and micronutrients important for the growth of LAB, and consequently affects the acidification properties. Besides, it influences the buffering capacity of the sourdough, reaching a higher TTA.

Marioni et al. (2014) verified that the higher acid content of WWF is probably attributable to the higher ash content of WWF than RWF, thus causing the higher buffering capacity of WWF.

Katina et al. (2006) studied the effect of ash content (0.6–1.8 g/100 g) on sensory properties of sourdough bread and observed that the ash content of flour is the most important parameter influencing the flavor of the bread. Sourdough bread with higher ash content resulted in enhanced aftertaste, overall intensity, pungent and roasted flavor.

### 3.2. LAB and yeast cell counting

LAB and yeast cell counting during manufacturing of sourdough is shown in Table 1.

There was a marked LAB and yeast growth ( $P < 0.05$ ) in the first four days of SS production. On the 14th day, LAB and yeast counts were 9.02 log CFU/ml and 7.44 log CFU/ml, respectively. LAB and yeast counts of sourdough elaborated with RWF and WWF mix were similar to the results of Miservini et al. (2012), who found 9.01 and 7.30 log CFU/ml for LAB and yeast counts, respectively. According to Icela et al. (2012), a sourdough is stable and ready to be used when it presents microbiological counts of about  $2 \times 10^8$  UFC/g, pH  $\leq 3.90$  and TTA  $\geq 14$  ml as quality parameters.

### 3.3. Effect of trehalose

The cryoprotective effect of trehalose and survival of LAB and yeast are shown in Fig. 3. According to microbiological counts of FSS with (SST10 and SST15) and without trehalose (SS0), it was possible to

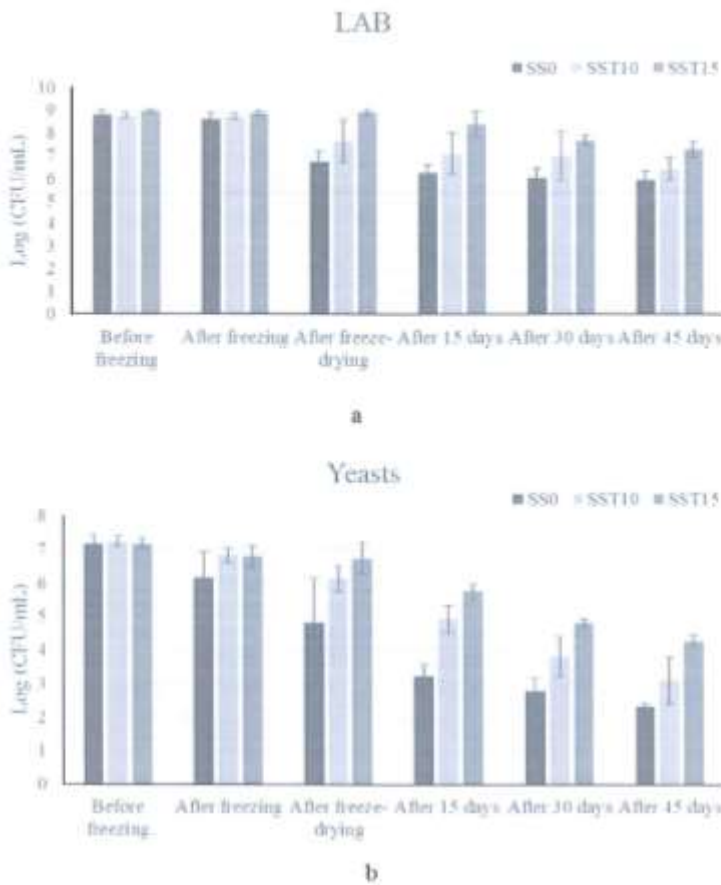


Fig. 3. Survival of LAB (a) and yeasts (b) measured at total viable counts before freezing, after freezing, after freeze-drying, and after 15, 30 and 45 days of storage and expressed as the logarithm of CFU/ml. \* Experiment was carried out in triplicate and repeated three times. S50: "spontaneous" sourdough without trehalose; S10: "spontaneous" sourdough with 10% trehalose; S15: "spontaneous" sourdough with 15% trehalose.

verify that trehalose effect on LAB and yeast survival after the freeze-drying process was directly proportional to the quantity of trehalose added. Survival rates for S50, S10 and S15 were around 67%, 73% and 81%, respectively. The same behavior was described by Leslie, Israeli, Lighthart, Croose, and Groves (1995) where the microorganisms *Escherichia coli* DH5a and *Bacillus thuringiensis* HD-1 showed an increased tolerance to freeze-drying when dried in the presence of disaccharides trehalose and sucrose.

Reductions in microbiological counts were greater in yeast, indicating that the cryoprotective effect was more significant for LAB. Whereas reduction in LAB after 45 days of storage was around 3.2, 2.3 and 1.5 log CFU/ml for S50, S10 and S15, respectively. In yeast, the observed reduction was 5.0, 4.0 and 3.0 log CFU/ml. The cryoprotective effect of trehalose is due to its ability to inhibit intracellular ice crystals formation (Nakamura et al., 2009). Stevens (2003) showed that trehalose added into a culture medium was able to increase survival of *Bradyrhizobium japonicum* after 24 h of desiccation.

Bread flavor has a major influence of raw material and ingredient employed, enzymatic reactions occurring during dough fermentation by yeast and/or LAB, and thermal reactions induced during baking, mainly through caramelization and Maillard reactions (Cho & Peterson, 2010).

According to literature (Schiraldi, De Lencina, & De Rosa, 2002), trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside) presents no significant impact on bread aromatic profile, because this sugar is among

the most chemically unreactive sugars. It is a stable, colorless, odor-free, and non-reducing disaccharide that is widespread in nature. Trehalose is only 45% as sweet as sucrose, and unlike other disaccharides, it does not engage in chemical reactions with amino acids or proteins, thus preventing browning of the product during processing.

A previous sensorial test related to this study was carried out to evaluate technological performance and sensorial pattern of breads containing lyophilized sourdough with zero (control), 10 and 15% of trehalose (Stefanello, Machado, Menezes, & Fries, 2017). As expected in the sensorial preference ordering test, results showed no significant difference among trials, demonstrating that the addition of trehalose had no impact on flavor and aroma intensity of breads produced.

#### 3.4. Molecular identification

Species of LAB and yeast isolated and identified in the freeze-dried sourdough (S50; S10) are listed in Table 2. Bacteria species were identified using a fragment of the 16S rDNA gene occurring in sourdough and flour samples. Seven different species of bacteria were identified in flour samples (RWF and WWF) and freeze-dried sourdough (S50 and S10), three of them being LAB (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *P. pentosaceus*). Among the three different isolates found in freeze-dried sourdough, *L. plantarum* was found only in S10, and only *P. pentosaceus* was also found in WWF.

Table 2

Species of bacteria and yeasts identified in refined wheat flour (RWF), wholewheat flour (WWF), “spontaneous” sourdough without trehalose (SSO) and “spontaneous” sourdough with 10% of trehalose (SST10) through the sequencing of a fragment of the gene 16S rDNA and of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rDNA region for bacteria and yeasts, respectively.

Isolated number	Source	Identification of specie	Medium for isolation	Fragment size (bp)	Sequence Identity (%)
<b>Bacteria</b>					
1	RWF	<i>Streptomyces</i> sp.	PDA	1332	100%
2	RWF	<i>Enterobacter cloacae</i>	PDA	1296	99%
3	RWF	<i>Pseudomonas</i> sp.	PDA	1215	99%
4	WWF	<i>Enterobacter</i> sp.	MRS	945	100%
5	WWF	<i>Enterobacter</i> sp.	MI7	932	87%
6	WWF	<i>Enterobacter cloacae</i>	MI7	1364	99%
7	WWF	<i>Escherichia coli</i>	MI7	981	91%
8	WWF	<i>Pedococcus pentosaceus</i>	MRS	1196	99%
9	WWF	<i>Pedococcus pentosaceus</i>	MRS	1041	100%
10	SSO	<i>Pedococcus pentosaceus</i>	MI7	1344	100%
11	SSO	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MI7	1383	100%
12	SST10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MI7	1346	100%
13	SST10	<i>Pedococcus pentosaceus</i>	MI7	778	100%
14	SST10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	911	100%
<b>Yeasts</b>					
15	RWF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	602	99%
16	RWF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	556	99%
17	RWF	<i>Candida glabrata</i>	YM/YEPG	508	99%
18	WWF	<i>Pichia anomala</i>	YM/YEPG	515	99%
19	WWF	<i>Pichia anomala</i>	YM/YEPG	508	98%
20	WWF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	585	99%
21	WWF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	536	99%
22	SSO	<i>Candida glabrata</i>	PDA	511	99%
23	SSO	<i>Myrrocyma guillemontii</i>	PDA	540	82%
24	SSO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	509	99%
25	SSO	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	YM/YEPG	529	99%
26	SSO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	528	99%
27	SSO	<i>Pichia anomala</i>	YM/YEPG	507	99%
28	SSO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	523	98%
29	SST10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	536	99%
30	SST10	<i>Candida glabrata</i>	YM/YEPG	516	98%
31	SST10	<i>Pichia anomala</i>	YM/YEPG	604	99%
32	SST10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM/YEPG	546	99%

We used non-supplemented MRS for LAB selection, and presumably because of this, some microorganisms were not isolated and identified due to the inability of certain LAB to grow in these media. *L. fermentum* and *L. plantarum* are highly adapted to hostile and nutrient-poor environments (Vogelmann & Hietel, 2011). These acid-tolerant species of LAB were dominant in freeze-dried sourdough as well as in most Italian sourdough (Minervini et al., 2012), Altamura sourdough (Perricone, Bevilacqua, Carlu, & Sinigaglia, 2014) and organic French sourdough (Lhomme et al., 2016). In another study (Lhomme et al., 2016), six different LAB species were identified as dominant (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. kimchi*, *L. sakei*, *L. hammesii* and *L. pentosus*) using the sequencing of the 16S rRNA gene of 520 isolates from organic French sourdough.

As the preparation process of sourdough is affected by physical-chemical parameters such as pH and acidity (Minervini et al., 2012), heterofermentative LAB play a significant role in sourdough microbiological stability (Vrancken et al., 2011). *Saccharomyces cerevisiae* is not so much tolerant at lower pH. This may be another reason why this species of yeast did not dominate spontaneous fermentations in laboratory, since it could not overcome more acid tolerant strains of *Pichia anomala* (also known as *Hansenula anomala* or *Wickerhamomyces anomala*) (Vrancken et al., 2010).

The greatest ability of yeast growth occurs when they are associated with homofermentative LAB compared to heterofermentative LAB (Gobbetti, Corsetti, & Rossi, 1994; Hansen, Lund, & Lewis, 1989). The result found by Iacumin et al. (2009) confirmed a previous study of Hansen et al. (1989), which demonstrated that in samples where *S. cerevisiae* was present, *L. plantarum* showed a high percentage of

isolation. Heterofermentative LAB utilize lactic acid and glucose as substrates to produce acetic acid (Marz, Schmidt, Nussio, Hallada, & Kung, 2009), which are effective for enterobacteria and yeast control (Zappolatto, Daniel, & Nussio, 2009).

Yeast species were identified by sequencing the D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal DNA, and results of the identification are exhibited in Table 2. Four different species of yeast were identified among the 16 isolates found in sourdough and flour samples. Nine were *S. cerevisiae*, four were *P. anomala*, two were *Candida glabrata* and one was *Rhodotorula mucilaginosa*. Interestingly, only *R. mucilaginosa* was found in SSO, while the other species were found in RWF and WWF. Utilization of the divergence region D1-D2 within the large ribosomal RNA subunit, which is part of the rDNA gene complex, was suggested as a nuclear marker for species identification (Sonnenberg, Nolte, & Tautz, 2007).

Regarding yeast presence in sourdough manufactured by traditional procedures in Italy, Gobbetti, Corsetti, and Rossi (1994) isolated yeast microbiota from Central Italy, mainly composed by *S. cerevisiae* (66%), *Candida krusei* (17%), *Saccharomyces exiguus* (16%) and *H. anomala* (1%). Presence of *S. cerevisiae* and *H. anomala* was also confirmed by Rossi (1996) in sourdough from Umbria region.

An investigation of microbial composition of 21 artisan sourdough from 11 different Belgian bakeries yielded 127 yeast isolates (Vrancken et al., 2010). Dominant species in the bakery sourdough were *S. cerevisiae* and *P. anomala*, while dominant species in the laboratory sourdough fermentations were *P. anomala* and *C. glabrata*, and there was an occasional detection of *S. cerevisiae* (in only three samples).

The ability of all *P. anomala* and *S. cerevisiae* isolates to strongly



assimilate maltose and sucrose, the major carbohydrates of flour, might be considered as an advantage of these species, leading to their dominance in laboratory sourdough fermentations and a frequent occurrence in bakery sourdough fermentations (Vrancken et al., 2016).

Organic French sourdough preserve special yeast communities in which Kazachulanicus bulderi (48% of the isolates) and Candida humilis (24%) are common, while S. cerevisiae (less than 0.2%) is rare (Lhomme et al., 2016). Relevant isolates from Altamura sourdough were identified as S. cerevisiae and C. humilis (Perricone et al., 2014). Different combinations of strains from four yeast species (Kazachulanicus unipora, S. cerevisiae, Candida krusei and C. glabrata) were detected in rye sourdough propagated at 30 °C based on 26S rRNA partial gene sequencing (Bessmertova, Viliard, Stenni, Poulaine, & Sarand, 2014).

In “spontaneously” fermented mass, fermentation is caused mainly by “wild” flour microbiota, which is well adapted to the ecosystem and evolves during fermentation. Strains that develop spontaneously are variable according to geographic region, because LAB and yeast species depend on ecological factors (De Vuyst & Neysens, 2005).

Ecological factors are also important for stability and competitiveness of microbial associations between LAB and yeast in sourdough (Vogelmann & Hertel, 2011). However, the competition between these two types of microorganisms is not specific, as recently shown for some strains of L. sanfranciscensis and L. plantarum (Mitsvelot, Pinto, Di Cagno, De Angelis, & Golibetski, 2011; Sotgiu et al., 2009) in sourdough made with wheat flour.

Presence of P. anomala can have an important role in stability and improvement of shelf life of breads. Among 60 different species of yeast, P. anomala was the species that showed the greatest capacity to inhibit growth of Penicillium roqueforti, one of the main spoilage microorganisms in bakery products (Dreuxler, Panath, & Schurrer, 2005). The use of P. anomala as a starter for fermentation was studied by Coda et al. (2011) to extend shelf life of baked goods while improving flavor and structure.

#### 4. Conclusion

The artisanal sourdough produced had its pH stabilized after four days of preparation, while TTA increased during the 14 days of sourdough production. Sourdough was possibly mature and ready to use or freeze-dry from the sixth day, as means for LAB and yeast did not differ significantly after this period.

Addition of 10% and 15% trehalose to sourdough prior to freeze-drying had a cryoprotective effect on survival of microorganisms, and such an effect was directly proportional to the added concentration of trehalose. Cryoprotective effect was more significant for LAB than for yeast.

Yeast species S. cerevisiae and P. anomala, along with LAB P. pentosaceus, L. plantarum and L. fermentum were identified as the main species present in freeze-dried sourdough, using molecular techniques. Studies of the application of sourdough in bread and panettone are undergoing in our laboratory.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil through Edital CAPES No. 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional.

#### References

AOAC (2010). Approved methods of analysis (11th ed.). St. Paul, MN, U.S.A.: AOAC International.

Amali, F. S., Ryan, L. A. M., & Dal Sella, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24, 165–174.

Bardini, A., Ferrero, S., Chizzolini, P. J., & Scatelli, G. A. (2005). Trehalose promotes the survival of *Kazachulanicus cerevisiae* during initial ethanol stress, but does not influence yeast growth under industrial ethanol stress. *FEBS Letters*, 578, 1209–1216.

Belo, M. C. F., Mairinger, F., Zaveri, F., Ryan, L. A. M., Carbaso, E. D., & Arendt, E. K. (2012). The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf life of salt enriched bread. *Applied Microbiology Biotechnology*, 96, 493–501.

Bonombiani, M., Viced, E., Sano, J., Poulain, Y., & Sarand, I. (2016). Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation. *PLoS One*, 11, 1–12.

Bonino, L. A., Mucchetti, T., & Biliotti, C. G. (2014). Complex coexistence in a novel microenvironment: evidence to improve stability of probiotics under different stresses. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 2767–2781.

Brenck, M. J. (2007). Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*, 24(2), 164–164.

Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 179–185.

Chu, H., & Peterson, D. G. (2010). Chemistry of bread crumb: A review. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 575–581.

Coda, R., Carrozzini, A., Rizzello, C. G., Niscoli, L., Cardinale, G., & Golibetski, M. (2011). Antifungal activity of *Kazachulanicus unipora* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough preparation: Identification of acetic compounds and long chain ester during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3484–3492.

Corsetti, A., & Schwan, L. (2007). *Lactobacilli* in sourdough fermentation: A review. *Food Research International*, 40, 530–538.

Costa, E., Ural, I., Teyssie, H., Garcia, R., & Vilas, J. (2006). Effect of protective agents (refrigeration, methyl and initial cell concentration on viability of *Panosea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 793–800.

De Vuyst, L., & Neysens, P. (2000). The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 11(3), 63–66.

De Vuyst, L., Van Kerckhove, S., Ward, H., Hays, G., Daniel, M. M., & Weerts, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37, 11–26.

De Vuyst, L., Vrancken, G., Ruyts, F., Rinaudo, T., & Weerts, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microflora. *Food Microbiology*, 26, 646–675.

Dreuxler, U. S., Panath, Y., & Schurrer, J. (2005). Starter effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* (J2) during airtight storage of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 1865–1868.

Ferrero, S., Panatier, E., Di Filippo, F., Mitsvelot, F., La Rocca, A., Golibetski, M., et al. (2012). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied Environmental Microbiology*, 78, 7527–7536.

Gagliardi, M., Di Cagno, R., De Angelis, M., Arendt, E., Tassin, F., Fox, P. F., et al. (2007). Inulin and/or sorbitol semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiology*, 24, 15–24.

Gaouf, Y. H., Abdel-sal, T. M., & Tadi, S. M. (2013). Effect of yeast fermented and sourdough making processes on physicochemical characteristics of *S. glaucus* in whole wheat flour bread. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 78–85.

Golibetski, M., Corsetti, A., & Ross, J. (1994). The sourdough microflora: Interaction between lactic acid bacteria and yeasts: Metabolism of carbohydrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 257–276.

Golibetski, M., Corsetti, A., & Ross, J. (1995). Mutual diversity in fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *indurans* (C9) in various negative media. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 935–944.

Hall, T. A. (1998). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Molecular Acid Symposium Series*, 41, 95–98.

Hamad, S. H., Dong, M. C., Elsham, M. A., & Vogel, R. T. (1997). Characterization of the bacterial flora of Lebanese saffron bread and saffron sourdough. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 764–770.

Hansen, W. P., Brenck, M. J., Francis, K. S., Bonombiani, M., Swartz, F. B., & Vogelmann, S. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 4–11.

Hansen, A., Lund, R., & Lousi, J. M. (1999). Flavour production and utilization of sourdough relation to starter culture and fermentation temperature. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 22, 145–149.

Leccese, L., Corbelli, F., Manzoni, M., Ossolitto, M., Bonetti, B., Gelo, S., et al. (2009). Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 26(2), 128–135.

Katna, K. A., Helito, R., Aulin, E., & Poutanen, K. (2005). Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.004>.

Laschi, M. F., Hartfelder, C., & Valente, P. (2009). Identification and respiratory profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiarum: Curitiba*, 34, 49–55.

Line, D. J. (1991). 16S/23S rDNA sequencing. In E. Macleod (Ed.), *Handbook of Molecular Biology and Biotechnology* (Vol. 1). *Molecular cloning techniques in bacterial systems* (pp. 135–147). New York: John Wiley and Sons Ltd.

Lottman, A., Mitsvelot, F., & Golibetski, M. (2014). Assessment of comparative methods for using type 4 wheat sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 548–555.

Lopez, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the bread fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–74.

Luño, S. R., Iturriz, E., Ugelstad, E., Gross, J. H., & Gross, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in yeast liposomes during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2002–2007.

Lhomme, E., Ullou, C., Legendre, J., Doucet, X., Durr, R., & Sicard, B. (2015). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*, 55, 41–50.

Marchini, M., Corbelli, C., Aguilanti, L., Di Marco, A., Pagnoni, L., Tassin, F., et al.

- (2014). Rye flour exploitation in sourdough bread-making: A technological, nutritional and sensory evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 975–980.
- Wark, L. J., Schmidt, R. J., Susano, L. G., Hallada, C. M., & King, L. J. (2009). Short communitation: An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 in altering fermentation and improve the aerobic stability of over-stage in farm silage. *Journal of Dairy Science*, 92, 1174–1176.
- Manzana, P., Dalbé, P. B., Puri, J., Richards, N., Dalnoki, T., Sereferian, M. L., et al. (2014). Lipid profile and antimicrobial activity of steroidal oils from 16 oblique yeast isolates from artisanal cheese. *Annals of Microscopy*, 12, 121–128.
- Messer, F., Barber, B., & Fischer, G. (1993). Determination of the microbial activity of dried sourdough by crystallization of their lactic acid bacteria and yeasts. *Food Control*, 6, 147–154.
- Minervini, F., Cagno, D., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antoninelli, L., Cardinale, G., et al. (2012). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1251–1264.
- Minervini, F., Pina, D., Di Cagno, R., De Angelis, M., & Gobetti, M. (2011). Screening the application of sourdough in frozen dough bread technology. *Journal of Cereal Science*, 54, 298–304.
- Monisz, Y., Matsumoto, R., Mamiyama, A., & Yamashita, M. (2010). Comparative analysis of transcriptional responses to the ergosterolants, dimethyl sulfide and trehalose, which induce resistance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, 60, 245–261.
- Morgan, C. A., Hernan, N., White, F. A., & Yeung, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193.
- Nakamura, T., Takagi, H., & Shimizu, J. (2009). Effects of ice-seeding temperature and mucopolysaccharide contents on survival of frozen *Baccharomyces cerevisiae* cells. *Cryobiology*, 55, 170–174.
- Shwehli, L., Corsi, R., Carlet, J. A., Di Cagno, R., Possento, F., Cavaddi, L., et al. (2014). Exploitation of Allium-like wheat-cultures: Characterization of the flours and lactic acid bacteria microflora, and selection of starters for sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 44, 96–107.
- Osorio-Caldas, E., Ramirez, M., Lopez, W. A., & Manduacay, L. A. (2009). Caracterización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN proteómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 125–131.
- O'Donnell, K. (1993). Fermentation and its near relatives. In D. R. Reynolds, & J. W. Taylor (Eds.), *The fungal microbiome: Micro, macro, and phylogenetic speciation in fungal systems* (pp. 225–233). Wallingford, UK: CAB International.
- Perrenone, M., Bevilacqua, A., Carbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Allium-like sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 36–39.
- Pontanen, K., Haasler, L., & Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26, 693–696.
- Rusadi, M., Partelli, M., Collinari, A., Sgarbi, E., Ortolini, M., Awa, C. D., et al. (2015). Oatmeal and soft wheat flours in sourdough and straight dough bread making. *Journal of Food Science and Technology*, 32, 6254–6265.
- Rizzello, C. G., Locantore, A., Montemurro, M., & Gobetti, M. (2016). Use of amebough-molds with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, 51, 1–13.
- Rossi, J. (1996). The yeasts in sourdough. *Advanced Food Science (COMTE)*, 18, 201–211.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). *Commonly used techniques in molecular cloning: In J. Sambrook, & D. W. Russell (Eds.) Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. NY, USA: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sano, E. F., Lima, L. B. F., Torres, A. P. C., Oliveira, G., & Passaro, E. H. G. (2013). Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 31, 47–51.
- Schiraldi, C., Di Lenna, I., & De Rosa, M. (2002). Trehalose production: Exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20, 420–425.
- Shigeta, S., Di Cagno, R., Bresini, D., Minervini, F., Gobetti, M., & De Angelis, M. (2009). Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type 1 propagation using *Lactobacillus amylophilus* starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1099–1108.
- Sorenberg, R., Nohle, A. W., & Tarr, D. (2007). An evaluation of 150 DDBP DNA ID-PII sequences for their use in species identification. *Frontiers in Ecology*, 12, 1–12.
- Stefanello, R. F., Machado, A. A. B., Meyeres, C. R., & Fries, L. L. M. (2017). Avaliação sensorial de pães de forma com adição de farinha integral e fermento natural bio-lábil. In D. B. G. Leite, & A. C. Franon (Eds.), *Desafios da Ciência e Tecnologia de Alimentos 2017*. Ponta Grossa, PR, Brazil: Atena Editora.
- Suzuki, J. G. (2001). Effect of trehalose on survival of *Bifidobacterium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 484–491.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, P., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882.
- Vegetarian, S. A., & Hovind, C. (2011). Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 28, 583–589.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Rinaus, T., Allenssereck, J., & Weckx, S. (2011). Adaptation of *Lactobacillus plantarum* DSM 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulated medium at different pH values through differential gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3408–3417.
- Vrancken, G., Vuyst, L. D., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., & Hamel, H. M. (2010). Yeast species competition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Research*, 10, 471–481.
- Yoshizawa, Y., Yamaoka, K., Yoshizawa, K., Hibi, M., Ogawa, J., & Shimizu, J. (2015). Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 172–175.
- Zappalà, M., Daniel, J. L. P., & Nazzari, L. G. (2009). Adição microbiana em algarim no pão: Efeito dos aspectos de modelagem e do desenvolvimento de amido. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 170–180.



1

5.3 ARTIGO 3 – CRYOPROTECTANT EFFECT OF DIFFERENT SOLUTIONS ON THE VIABILITY OF STRAINS OF LACTOBACILLUS FERMENTUM IAL 4541 AND WICKERHAMOMYCES ANOMALUS IAL 4533 ISOLATED FROM A SOURDOUGH AFTER FREEZE-DRYING PROCESS

Artigo submetido ao periódico *Food Research International*, ISSN 0963-9969, Área de avaliação em Ciência de Alimentos, Classificação A1.

2 **Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces***  
3 ***anomalus* strains isolated from wheat sourdough after freeze-drying with different**  
4 **cryoprotectant agents**

5  
6 Raquel Facco Stefanello<sup>a</sup>, Elizabeth Harumi Nabeshima<sup>b</sup>, Beatriz Thie Iamanaka<sup>b</sup>, Aline  
7 Ludwig<sup>c</sup>, Leadir Lucy Martins Fries<sup>a</sup>, Marina Venturini Copetti<sup>a\*</sup>

8  
9 <sup>a</sup> Federal University of Santa Maria, Rural Sciences Center, Department of Science  
10 and Food Technology, 1000 Roraima Avenue, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

11  
12 <sup>b</sup>Institute of Food Technology, ITAL, 2880 Brazil Avenue, 13070-178, Campinas, SP,  
13 Brazil

14  
15 <sup>c</sup> Federal University of Santa Maria, Mycological Research Laboratory, 1000  
16 Roraima Avenue, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

17  
18 \*Corresponding author: Marina Venturini Copetti

19  
20 E-mail: [mvc@smail.ufsm.br](mailto:mvc@smail.ufsm.br)

21  
22 Phone Number: +55 55 3220 8254

23  
24 "DECLARATIONS OF INTEREST: NONE"

25  
26 ABSTRACT:

27 The stability of microorganisms along the time is important for allowing their industrial use  
28 as starter agents, improving fermentation processes. This study evaluated the survival  
29 and maintenance of the cell viability of *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) and  
30 *Wickerhamomyces anomalus* (IAL 4533) strains isolated from wheat sourdough by  
31 freeze-drying (-50 °C/24 h at a chamber pressure of 0.15 mbar). Treatments involved a  
32 control solution (S1), 0.1% peptone water, and four cryoprotectant solutions (S2, S3, S4  
33 and S5), with 5% trehalose, 10% sucrose, 10% skim milk and 10% skim milk plus 5%  
34 sodium glutamate, respectively. To verify the effect of freeze-drying, microbiological  
35 analysis (expressed as Log CFU/mL) was performed before and after lyophilization and  
36 regularly during a storage period of 365 days at room temperature. Viability after freeze-  
37 drying was particularly influenced by cryoprotectant agents. Trehalose and skim milk  
38 protected the cells during the freeze-drying process. Our results demonstrate that freeze-  
39 drying is a realistic technology for the stability and maintenance of *Lactobacillus*  
40 *fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* for long time.

41  
42 Keywords: wheat, skim milk, cell viability, trehalose, cryoprotectants.

43  
44  
45



46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80

## 1. INTRODUCTION

Sourdough represents a product-mixed fermentation affected by the action of diverse microorganisms naturally present in various cereals (Minervini, De Angelis, Di Cagno, & Gobbetti, 2014). This process is less effective in terms of time but produces breads that are more flavourful and often preferred by some consumers. The large-scale production of fermented foods has become an important branch of the food industry and subsequently has created challenges for producing high quantities of microorganisms (Leroy & De Vuyst, 2004). To guarantee the survival of microorganisms, preservation methods have been tested to ensure their high stability during long-term storage (Sanders, Oomes, Membré, Wegkamp, & Wels, 2015).

Freeze-drying has been the classical method used to produce dry bacterial powders because drying takes place at low temperatures, thus reducing heat degradation (Miyamoto-Shinohara, Sukenobe, Imaizumi, & Nakahara, 2008). However, biological materials can be irreversibly damaged during these treatments. During the freezing process, the formation of ice crystals and an increase in the intracellular concentration of salt cause water to leak out of cells and form extracellular ice crystals. This osmotic shock is the main reason for cell viability loss (Nakamura, Takagi, & Shima, 2009).

Therefore, it is essential to define protective agents able to preserve protein activity and cell survivability. Cryoprotectants are used to prevent this phenomenon (Morgan, Herman, White, & Vesey, 2006) because they immobilize microorganisms in a material with very high viscosity and low mobility reaction (Semyonov et al., 2010). Some studies describe the use of cryoprotectants including skim milk and different sugars, to decrease the damage caused in microorganisms by low temperatures (Basholli-Salihu, Mueller, Salar-Behzadi, Unger, & Viernstein, 2014; Foerst, Kulozik, Schmitt, Bauer, & Santivarangkna, 2012; Navarta et al., 2014). The production of concentrated starter cultures for the food industry by freeze-drying has been studied (Fonseca, Béal, & Corrieu, 2000; Zhao & Zhang, 2005). Most studies evaluate the maintenance of microorganisms at lower or even frozen temperatures (Lattanzi, Minervini, & Gobbetti, 2014). Such diversity has led to numerous studies over the years aiming to understand the natural complexity of sourdoughs, which is pivotal to uncovering potentialities and promising applications (García Vilanova,

81 Díez, Quirino, & Iñaki Álava, 2015; Lhomme et al., 2016; Lhomme, Orain, Courcoux,  
82 Onno, & Dousset, 2015).

83  
84 Thus, this study aimed to evaluate the freeze-drying method to improve the cell  
85 survivability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* (formerly  
86 *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*) using four cryoprotectant solutions, as well as,  
87 the efficiency of the proposed solutions during a 12-month period of preservation at  
88 room temperature, to obtain a simple and fast ready-to-use inoculum for the sourdough  
89 process.

90

## 91 2. MATERIALS AND METHODS

92

### 93 2.1 Microorganisms

94

95 *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) and *Wickerhamomyces anomalus* (IAL  
96 4533) strains were isolated from dried sourdough (Stefanello et al., 2018) and  
97 deposited at Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) of Instituto Adolfo Lutz.

98

99 The activation of *L. fermentum* (IAL 4541) was performed by the resuspension  
100 of the lyophilized strain in 3 mL of de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck,  
101 Germany), followed by vigorous shaking for 30 seconds in a vortex mixer and  
102 incubation at 36 °C for 24 h under anaerobic conditions (BD Gaspak™). An aliquot of  
103 *L. fermentum* was transferred to Petri dishes containing solidified MRS agar. The  
104 plates were incubated at 36 °C for 48 h under anaerobic conditions (BD Gaspak™).  
105 The inoculum was prepared by scraping one plate with culture growth and  
106 resuspension in a sterile flask with 3 mL sterile 0.1% peptone solution (Merck,  
107 Germany), obtaining a suspension of approximately  $2.6 \times 10^{10}$  CFU/mL.

108

109 The activation of the *W. anomalus* IAL 4533 strain was by the subculture of cells  
110 from a GYP (glucose 20g/L; yeast extract 5g/L; peptone 10 g/L; agar 20 g/L) plate, and  
111 incubation for 48 h at 30 °C under aerobic conditions. The inoculum was prepared by  
112 scraping 1/3 of the culture growth on the plate and resuspending in a sterile flask with  
113 3 mL of sterile 0.1% peptone solution (Merck, Germany), giving a suspension of  
114 approximately  $1.17 \times 10^9$  CFU/mL.

115

### 116 2.2 Cryoprotectant agents (CPAs)

117

118 Five treatments were evaluated, namely a control solution (S1) and four  
119 cryoprotectant solutions (S2, S3, S4 and S5), having the following components: S1 –

120 0.1% peptone water solution; S2 - 5% trehalose solution (Tovani; Treha™); S3 - 10%  
121 sucrose solution (Merck, Germany); S4 - 10%  
122 skim milk solution; and S5 - stabilizer solution containing 5% sodium L-  
123 glutamate monohydrate p.a. and 10% Molico® skim milk powder. The control solution  
124 (S1) was autoclaved (121 °C/1 atm) for 15 minutes. The solutions containing the 5%  
125 trehalose (S2) and 10% sucrose (S3) were sterilized by filtration using a sterile syringe  
126 and filter. For S2, a 0.22 µm filter (BIOFILM® Syringe Filter) was used, and a 0.46 µm  
127 filter (KASVI-k18-430) was used for S3. Cryoprotective solutions S4 and S5 were  
128 sterilized by tyndallization (100 °C/30 minutes). Tyndallization was repeated after 24  
129 h, and the vials containing solutions S4 and S5 were sealed with Parafilm® after  
130 closing (Bemis NA, USA).

131  
132 The inoculum prepared in Section 2.1 was aseptically resuspended in sterile  
133 glass vials containing 3 mL of the solutions of each treatment (S1 to S5) for further  
134 lyophilization.

135

### 136 2.3 Freeze-drying

137

138 Initially, the vials were held at -20 °C for 24 hours. Lyophilization caps were  
139 positioned in the flasks containing the *L. fermentum* (IAL 4541) and *W. anomalus* (IAL  
140 4533) inocula. The flasks were immediately frozen (at -80 °C) using an ultralow  
141 temperature freezer (Thermo, USA). After 12 h of freezing, cultures were transferred  
142 to a freeze-dryer (K105, Liotop, Brazil). Freeze-drying was carried out for 24 h at -50  
143 °C and at a pressure of 0.15 mbar (Keivani Nahr et al., 2015). After closing, the vials  
144 containing lyophilized strains were sealed with Parafilm® and stored protected from  
145 light at room temperature for 1 year.

146

### 147 2.4 Microbiological counts and cell viability

148

149 The quantification of the viable cell number of lyophilized strains (IAL-4541 and  
150 IAL-4533) was performed eight times during storage: before lyophilization (-1), after  
151 lyophilization (0), after 30 days (30), after 60 days (60), after 90 days (90), after 120  
152 days (120), after 210 days (210) and after 365 days (365).

153

154 Freeze-dried samples were rehydrated adding autoclaved MRS broth (*L.*  
155 *fermentum* IAL-4541) and SDA broth (*W. anomalus* IAL-4533) to match the sample

156 weight before dehydration, and vortex-mixed intermittently for 2 min. After 20 min,  
 157 samples were inoculated in Petri dishes. The viability of microorganisms before and  
 158 after freeze-drying was determined by 10-fold serial dilutions and plate assays on MRS  
 159 and SDA agar for bacteria and yeasts, respectively. Plates were incubated at 35 °C for  
 160 72 h for bacteria and 30 °C for 48 h for yeasts. Colonies with 30–300 per plate were  
 161 selected for counting, and the mean values of the three plates were reported.

162  
 163 The survival rate (expressed as a %) was calculated using Equation (1),  
 164 considering the microorganism population before the process, i.e. the result obtained  
 165 in the analyses before freezing (-1), and the microorganism population after the  
 166 process, both for freezing followed by freeze-drying and for the other storage stages  
 167 at room temperature (for 365 days).

168  
 169 The viability (%) of the cell suspension for each protective medium was  
 170 calculated using the following equation (Huang et al., 2006):

171

$$172 \quad x (\%) = \frac{\text{viable cells after freeze - drying}}{\text{viable cells before freeze - drying}} \times 100$$

173

## 174 2.5 Experimental design

175  
 176 The experimental design was completely randomized with measures repeated  
 177 in time, in a 2 × 5 × 8 factorial scheme, totalling 80 treatments, with three replicates of  
 178 each treatment: two microorganisms (*L. fermentum* IAL 4541 and *W. anomalus* IAL  
 179 4533), five different cryoprotectants (S1: 0.1% peptone water, S2: 5% trehalose, S3:  
 180 10% sucrose, S4: 10% reconstituted skim milk, S5: 10% reconstituted skim milk with  
 181 5% monosodium glutamate) and eight times (-1, 0, 30, 60, 90, 120, 210, 365). The  
 182 mathematical model used is described in the formula below:

$$183 \quad Y_{ijkl} = \mu + M_i + C_j + (M * C)_{ij} + T_k + (M * T)_{ik} + (C * T)_{jk} + (M * C * T)_{ijk} + \varepsilon_a$$

$$184 \quad \quad \quad + \varepsilon_{ijkl}$$

185

186 Onde:  $\varepsilon_a = \text{Amostra}_i (M * C)_{ij}$

187 i: 1....M (2) microorganismsanis

188 j: 1....C (5) CPAs

189 k: 1....T (8 ) store stage

190

191

192 Data were submitted to residual analysis (normality test, test for independence and  
193 test for homogeneity), analysis of variance, F-test and, when significant at 5%, means  
194 were analysed by the Tukey test (5%) and contrast studies. For the time factor and its  
195 interactions, when significant (5%), correlation analysis and polynomial regression  
196 were used. Repeated measurements of viable counts after freeze-drying were carried  
197 out to compare the protective effect of different agents. All experiments were repeated  
198 three times independently. All data were statistically analysed with the SAS System for  
199 Windows v9.1 software.

### 201 3. RESULTS AND DISCUSSION

202 **Figure 1** shows the viability of *L. fermentum* (IAL 4541) and *W. anomalus* (IAL  
203 4533) after freeze-drying with different cryoprotectants over time. Based on the  
204 presented results, we can see that the lyophilization process was adequate for the  
205 conservation of both the *L. fermentum* (IAL 4541) and the *W. anomalus* (IAL 4533)  
206 isolates.

207 A significant drop in the cell viability of *L. fermentum* (IAL 4541) and *W. anomalus*  
208 (IAL 4533) was observed after freeze-drying in most conditions. In terms of the  
209 percentage of cell viability, the highest survivability of 99.7% was obtained when 10%  
210 skim milk (S4) and 5% sodium glutamate (S5) were used as a protectant to *L.*  
211 *fermentum* (IAL 4541). After 12 months, the lyophilized strains with the S5  
212 cryoprotectant solution showed a cell viability rate of 87.3% for *L. fermentum* (IAL  
213 4541) and 79.6% for *W. anomalus* (IAL 4533). The *L. fermentum* (IAL 4541) and *W.*  
214 *anomalus* (IAL 4533) strains lyophilized with reconstituted milk and monosodium  
215 glutamate showed high cellular survival rates (higher than 85%) 12 months after  
216 preparation. The lyophilized cells of *W. anomalus* IAL 4533 with 5% trehalose stored  
217 at room temperature maintained a viability of 71.7% after 12 months, whereas the  
218 freeze-dried cells of *L. fermentum* IAL 4541 showed only 6.7% viability in the same  
219 period. The skim milk powder solution best protected the *W. anomalus* IAL 4533 cells  
220 during 365 days of storage at room temperature (83%), while the solution containing  
221 the skim milk powder plus sodium glutamate was the most effective for the protection  
222 of *L. fermentum* IAL 4541 cells (87.3%).  
223  
224  
225  
226

227 Freeze-drying provides higher cell viability and is used for the long-term preservation  
228 of bacteria and yeasts (Jarque, Bittner, & Hilscherová, 2016). Different factors affect cell  
229 viability during freeze-drying (Hubálek, 2003). Freezing conditions (rate and duration of  
230 freezing) and the presence of protectants (Amine et al., 2014) used to suspend cells  
231 before freezing are important parameters because they usually enhance cell survival.  
232 Still, some treatments were more effective and ensured higher survival rates of cells over  
233 time. This can be explained because during the drying process, more specifically  
234 lyophilization, cells undergo thermal stress that can cause membrane injuries, protein  
235 denaturation and irreversible damage to cellular DNA (Basholli-Salih et al., 2014).  
236 Therefore, it is important to optimize the freeze-drying process and choose a medium or  
237 solution capable of protecting the cell both in freezing and in drying (Berk, 2013).

238  
239 Protection by trehalose can be due to a protein-stabilizing capacity, replacing water  
240 around polar molecules (Morgan et al., 2006). The positive effect demonstrated by the  
241 addition of skim milk may be explained by its ability to provide a coating layer that protects  
242 microorganism cells during freeze-drying (Abadias, Benabarre, Teixidó, Usall, & Vias,  
243 2001). Having in mind the effect of cryoprotectants in enhancing cell survival during  
244 freeze-drying, the results showed that the concentration of these protectants can affect  
245 the amount of cell survivability after the process. Sugars showed high efficiency in  
246 stabilizing cell membranes during freezing in comparison with other cryoprotectants  
247 (Hubalek, 2003), because they reduce the freezing point and minimize the formation of  
248 intracellular ice (Barbas and Mascarenhas, 2009). Besides, the hydroxyl components of  
249 sugar molecules have the ability to protect cells from injury caused by freezing (Barbas  
250 and Mascarenhas, 2009).

251  
252 The results demonstrated that freezing without CPAs dramatically affected the survival  
253 of the two tested strains. The positive effect observed for skim milk and trehalose on the  
254 viability of the two strains after freezing confirmed the results of previous studies  
255 (Stephan, Da Silva, & Bisutti, 2016). These results correspond to (Zayed & Roos, 2004)  
256 the effect of trehalose on *Lactobacillus salivarius* survival after freeze-drying. It was  
257 observed that cell survivability decreased when none of the CPAs was used, in the same  
258 way as observed in treatments involving 0.1% peptone water in this study. Trehalose,  
259 when used alone or in combination with other cryoprotectants, increased cell survivability.  
260 The combination of trehalose, sucrose and skim milk was the most effective protection  
261 and gave a survival rate between 83% and 85% after freeze-drying (Zayed & Roos, 2004).  
262

263 The survivability of *Lactobacillus plantarum* cells after freeze-drying increased as the  
264 concentration of trehalose rose from 0% to 30% (Keivani Nahr et al., 2015) according  
265 with results of this study. Increasing the trehalose concentration from 1% to 10% also  
266 increased the survival of *Candida sake* cells after freeze-drying (Abadias et al., 2001).  
267 An average concentration of skim milk and a high concentration of trehalose improved  
268 tolerance to freezing followed by the drying of *L. plantarum* (Keivani Nahr et al.,  
269 2015). The positive effect of skim milk on freezing survival is related to the formation of  
270 a thin layer of milk protein over cell wall proteins. Even with this, calcium ions from the  
271 skim milk may contribute to the protective effect (King and Su, 1993).

272  
273 In the study by Black et al. (2013), four different cryoprotectants used in the  
274 lyophilization of *Escherichia coli* were evaluated (Black, Zannini, Curtis, & Gänzle,  
275 2013). Four batches were produced using a 10% skim milk solution and the same  
276 solution containing glycerol, sucrose and trehalose. Long-term stability was studied at  $\leq$   
277  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  for five days. Batches remained stable at  $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$   
278 for four months. The sample containing glycerol presented unsatisfactory stability results  
279 at the end of five days. Sucrose and trehalose cryoprotectants were stable at the studied  
280 temperatures and were considered to be suitable for lyophilizing the microorganism in  
281 question. An increase in the survival of freeze-dried species of *Geotrichum candidum*  
282 was reported by Hamoudi et al. (2007) using disaccharides such as trehalose, sucrose  
283 and maltose at a concentration of 23%.

284  
285 In a previous study of the preparation of a freeze-dried sourdough (Stefanello et al.,  
286 2018), the addition of 10% and 15% of trehalose before lyophilization was evaluated  
287 and a cryoprotective effect directly proportional to the added concentration of trehalose  
288 in microorganism viability was observed. In previous study conducted by Stefanello et  
289 al. (2017) investigated the sensorial characteristics of sourdough control breads  
290 compared with 10% and 15% trehalose, and there was no significant difference between  
291 treatments, demonstrating that the addition of trehalose had no impact on the flavour  
292 intensity and aroma of breads produced, affecting only the specific volume of breads.

293

#### 294 4. CONCLUSION

295

296 Using lyophilized strains to obtain natural ferments is a practical alternative for the  
297 production of naturally fermented products. However, there is a relevant parameter  
298 that involves the preparation of the strain and its use with success. Trehalose was

299 shown to be much more efficient in protecting and maintaining the yeast cells of *W.*  
300 *anomalus* (IAL 4533) than the bacterial cells of *L. fermentum* (IAL 4541). The best  
301 cryoprotectant solution was the mixture of 10% skim milk powder plus 5% sodium  
302 glutamate, obtaining the highest viability rates after 365 days for both analysed strains.  
303 This matrix is a  
304 relatively cheap product and is more economically advantageous than the use of  
305 trehalose. Our results demonstrate the possibilities of the conservation and  
306 maintenance of strains at room temperature, reducing refrigeration and transportation  
307 costs.

308

## 309 5. ACKNOWLEDGEMENTS

310

311 The authors wish to acknowledge the financial support from Coordenação de  
312 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil through Edital CAPES  
313 No. 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional, and to Conselho Nacional de  
314 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, through Process  
315 456472/2014-2.

316

## 317 6. REFERENCES

318

319 Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Vias, I. (2001). Effect of freeze  
320 drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*.

321 *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 173–182.

322 [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00513-4)

323

324 Amine, K. M., Champagne, C. P., Salmieri, S., Britten, M., St-Gelais, D., Fustier, P., &  
325 Lacroix, M. (2014). Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of  
326 *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*,  
327 56(1), 111–117. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.003>

328

329 Basholli-Salihi, M., Mueller, M., Salar-Behzadi, S., Unger, F. M., & Viernstein, H.

330 (2014). Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -glucosidase activity and viability of

331 *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices.

332 *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 276–282.

333 <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.011>

334

335 Black, B. A., Zannini, E., Curtis, J. M., & Gänzle, M. G. (2013). Antifungal hydroxy fatty  
336 acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic



- 337  
338 pathways, and antifungal activity in bread. *Applied and Environmental Microbiology*,  
339 79(6), 1866–1873. <http://doi.org/10.1128/AEM.03784-12>  
340
- 341 Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., & Santivarangkna, C. (2012). Storage  
342 stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and*  
343 *Bioproducts Processing*, 90(2), 295–300. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.06.004>  
344
- 345 Fonseca, F., Béal, C., & Corrieu, G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification  
346 activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy*  
347 *Research*, 67(1), 83–90. <http://doi.org/10.1017/S002202999900401X>  
348
- 349 García Vilanova, M., Díez, C., Quirino, B., & Iñaki Álava, J. (2015). Microbiota distribution  
350 in sourdough: Influence of high sucrose resistant strains. *International Journal of*  
351 *Gastronomy and Food Science*, 2(2), 98–102.  
352 <http://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.01.002>  
353
- 354 Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.  
355 *Cryobiology*, 46(3), 205–229. [http://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](http://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)  
356
- 357 Jarque, S., Bittner, M., & Hilscherová, K. (2016). Freeze-drying as suitable method to  
358 achieve ready-to-use yeast biosensors for androgenic and estrogenic compounds.  
359 *Chemosphere*, 148, 204–210. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.038>  
360
- 361 Keivani Nahr, F., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiyabani, M.,  
362 & Zoroufchi Benis, K. (2015). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective  
363 medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using  
364 response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 326–  
365 332. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.004>  
366
- 367 Lattanzi, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2014). Assessment of comparative methods for  
368 storing type-I wheat sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 948–  
369 955. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.032>
- 371 Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the  
372 food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78.  
373 <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>  
374
- 375 Lhomme, E., Orain, S., Courcoux, P., Onno, B., & Dousset, X. (2015). The predominance  
376 of *Lactobacillus sanfranciscensis* in French organic sourdoughs and its impact on

- 377 related bread characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 40–48.  
378 <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.010>  
379
- 380 Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., & Sicard, D. (2016). Sourdough  
381 microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making  
382 processes. *Food Microbiology*, 53, 41–50. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.014>
- 383 Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters  
384 influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International*  
385 *Journal of Food Microbiology*, 171, 136–146.  
386 <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021>  
387
- 388 Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. (2008). Survival  
389 of freeze-dried bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(1), 9–  
390 24. <http://doi.org/10.2323/jgam.54.9>  
391
- 392 Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-  
393 organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183–193.  
394 <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>  
395
- 396 Nakamura, T., Takagi, H., & Shima, J. (2009). Effects of ice-seeding temperature and  
397 intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae*  
398 cells. *Cryobiology*, 58(2), 170–174. <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.012>  
399
- 400 Navarta, L. G., Calvo, J., Posetto, P., Cerutti, S., Raba, J., Benuzzi, D., & Sanz, M. I.  
401 (2014). Postharvest Control of Gray Mold in Apples with Lyophilized Formulations of  
402 *Cryptococcus laurentii*: The Effect of Cold Stress in the Survival and Effectiveness  
403 of the Yeast. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2962–2968.  
404 <http://doi.org/10.1007/s11947-014-1303-0>  
405
- 406 Sanders, J. W., Oomes, S. J. C. M., Membré, J. M., Wegkamp, A., & Wels, M. (2015).  
407 Biodiversity of spoilage lactobacilli: Phenotypic  
408 characterisation. *Food Microbiology*, 45(PA), 34–44.  
409 <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.013>  
410
- 411 Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E.  
412 (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food*  
413 *Research International*, 43(1), 193–202. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.028>  
414
- 415 Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Cavalheiro, C. P., Santos, M. L. B., Nabeshima,  
416 E. H., Copetti, M. V., & Fries, L. L. M. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in  
417 freeze-dried wheat sourdough production. *LWT - Food Science and Technology*,  
418 89, 510–517. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>

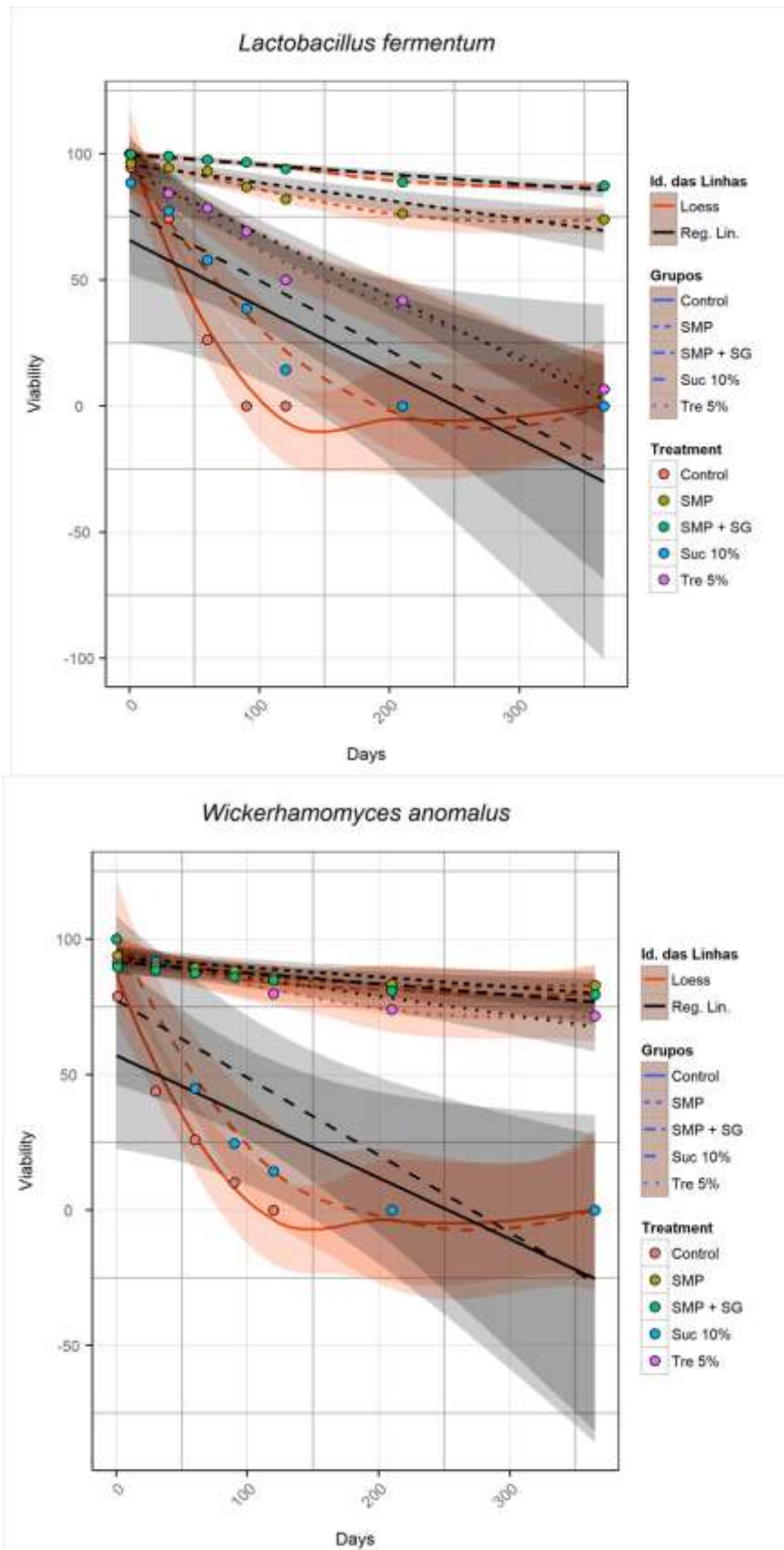
- 419  
420 Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying  
421 process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability,  
422 storability and efficacy. *Biological Control*, 94, 74–81.  
423 <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>  
424
- 425 Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of  
426 *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*,  
427 39(9), 1081–1086. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00222-X](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00222-X)  
428
- 429 Zhao, G., & Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration  
430 media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied*  
431 *Microbiology*, 99(2), 333–338. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>  
432

**Figure 1**

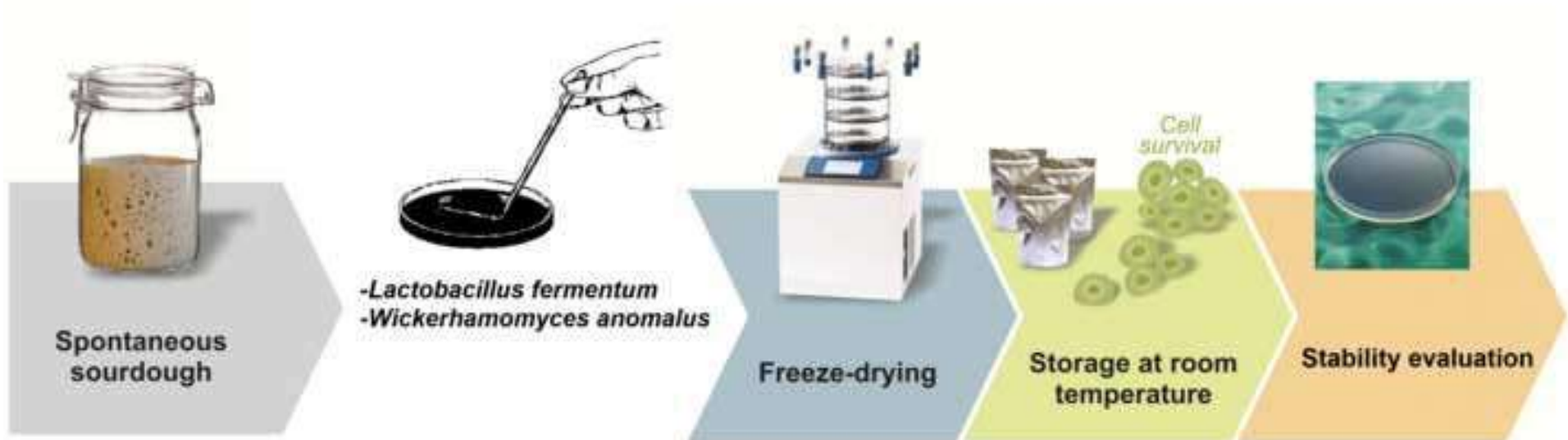
**Figure 1.** Viability (Log CFU/g or ml) of *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) (a) and *Wickerhamomyces anomalus* (IAL 4533) (b) using different CPAs at room temperature for 365 days. Control: peptone water; Tre 5%: Trehalose 5%; Suc 10%: Sucrose 10%; SMP: Skim milk powder 10%; SMP + SG: Skim milk powder 10% more sodium glutamate 5%.

**Figure 1**

**Figure 1.** Viability (Log CFU/g or ml) of *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) (a) and *Wickerhamomyces anomalus* (IAL 4533) (b) using different CPAs at room temperature for 365 days. Control: peptone water; Tre 5%: Trehalose 5%; Suc 10%: Sucrose 10%; SMP: Skim milk powder 10%; SMP + SG: Skim milk powder 10% more sodium glutamate 5%.



**Figure 1.** Viability (Log CFU/g or ml) of *Lactobacillus fermentum* (IAL 4541) (a) and *Wickerhamomyces anomalus* (IAL 4533) (b) using different CPAs at room temperature for 365 days. Control: peptone water; Tre 5%: Trehalose 5%; Suc 10%: Sucrose 10%; SMP: Skim milk powder 10%; SMP + SG: Skim milk powder 10% more sodium glutamate 5%.







5.4 ARTIGO 4 – THE USE OF CHECK-ALL-THAT-APPLY (CATA) TO DETERMINE THE SENSORY ATTRIBUTES IN PANETTONES ELABORATED WITH *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 AND *Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533

Artigo submetido ao periódico *Food Research International*, INSS 0963-9969, Área de avaliação em Ciência de Alimentos, Classificação A1.

1 Title page

2 Title: **Use of Check-All-That-Apply (CATA) to determine the sensory attributes in**  
3 **panettones elaborated with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 and**  
4 ***Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533**

5

6 Raquel Facco Stefanello<sup>a</sup>, Elizabeth Harumi Nabeshima<sup>b</sup>, Luisa Helena Rychecki  
7 Hecktheuer<sup>a</sup>, Rosane Heck<sup>a</sup>, Leadir Lucy Martins Fries<sup>a</sup>, Marina Venturini Copetti<sup>a\*</sup>

8

9 <sup>a</sup>Federal University of Santa Maria, Center of Rural Sciences, Department of  
10 Technology and Food Science. Avenida Roraima 1000, University City, Camobi, Santa  
11 Maria, RS, Brazil.

12 <sup>b</sup>Institute of Food Technology, Chocotec Cereal. Campinas, SP, Brazil.

13

14 \*Corresponding author.

15 Marina Venturini Copetti

16 Permanent address: Federal University of Santa Maria, Center of Rural Sciences,  
17 Department of Technology and Food Science. Avenida Roraima 1000, University City,  
18 Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

19 Phone number: +55 55 3220 8254

20 E-mail: [mvc@smail.ufsm.br](mailto:mvc@smail.ufsm.br)

21

22 Title: **Use of Check-All-That-Apply (CATA) to determine the sensory attributes in**  
23 **panettones elaborated with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 and**  
24 ***Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533**

25 ABBREVIATIONS<sup>1</sup>

26 ABSTRACT:

27 In panettones, the physical and chemical properties can determine, besides quality  
28 attributes, consumer acceptability. The aim of this work was to evaluate the effect of  
29 *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomallus* (formerly *Pichia anomala*)  
30 on microbiological, physical, and chemical characteristics, as well as the impact of  
31 these strains on sensory aspects. For the elaboration of panettones, the sponge  
32 method was used, with long fermentation and using sourdough containing two selected  
33 microorganisms, *L. fermentum* IAL 4541 (LF) and *W. anomallus* IAL 4533 (WA). To  
34 obtain the control panettones, the sponge was prepared using commercial dry yeast,  
35 with and without calcium propionate, as a preservative. For the sensory analysis, we  
36 selected sourdough panettones prepared with LF, LF / WA, WA, control without  
37 calcium propionate and compared them with commercial panettone. The samples were  
38 characterized for their physical and chemical aspects (moisture and color), quality  
39 attributes (specific volume and instrumental firmness), microbiology (mould and yeast),  
40 “check-all-that-apply” and acceptance tests. The results of the statistical analyses  
41 analyzed by analysis of variance ANOVA and Tukey test showed significant  
42 differences ( $p \leq 0.05$ ) among the samples. Differences in specific volume and  
43 instrumental firmness were observed. The samples presented values of moisture  
44 between 22.56% and 24.95%. Analysis of the instrumental firmness of the crumb  
45 showed a high variation in values (between 3.27 N and 12.74 N). Significant  
46 differences in crumb color parameters ( $L^*$  values between 74.90 and 77.79,  $a^*$   
47 between  $-0.25$  and  $0.002$  and  $b^*$  from 22.76 to 25.18) were found in all samples.

48 Keywords: panettone stability, sourdough, calcium propionate, acceptance test, acid  
49 lactic bacteria, sensory analyses.

---

<sup>1</sup> CATA: Check-All-That-Apply; IAL: Instituto Adolfo Lutz; YM: Yeast extract-mannitol; MRS: Man Rogosa and Sharpe; OD: Optical density; CFU: Colony forming unit; D1-D7: Doughs (number 1 to 7); SD1-SD7: Sourdough (number 1 to 7); Aw: Water activity; TTA: Total titratable acidity; B.O.D: Biochemical Oxygen Demand; PDA: Potato Dextrose Agar

50

## 51 1. INTRODUCTION:

52

53 Fungal deterioration is the main problem regarding the shelf life of bread and baked  
54 goods. Chemical preservatives such as propionic, sorbic, and benzoic acid and its  
55 derivative salts are still widely used, but consumers are looking for more natural  
56 products. Several studies (Crowley & Mahony, 2013; Hassan, Zhou, & Bullerman,  
57 2015; Valerio, Di Biase, Lattanzio, & Lavermicocca, 2016) have focused on the  
58 antifungal activity of compounds from natural sources and on biopreservation as  
59 effective alternatives to chemical preservatives. Recent studies (Hassan, Zhou, &  
60 Bullerman, 2015; Valerio et al., 2016) proposed a combined effect of sourdough  
61 fermentation, which extended the shelf life of bread.

62 The use of select lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for industrial bread  
63 making, resembling the traditional sourdough fermentation, has been extensively  
64 explored during these last years (Salvucci, LeBlanc, & Pérez, 2016; Stefanovic,  
65 Fitzgerald, & Mcauliffe, 2017). Studies have shown that the use of *Lactobacillus*  
66 *fermentum* from brewing sourdough in bread is beneficial for controlling fungal  
67 deterioration in bread, which may extend the shelf life of these products (Fazeli,  
68 Shahverdi, Sedaghat, Jamalifar, & Samadi, 2004). Species of *Wickerhamomyces*  
69 *anomallus* (formerly *Pichia anomala*) are known to control a range of postharvest fungi  
70 decreasing sporulation and mycotoxin production (Melin, Schnürer, & Håkansson,  
71 2011).

72 Sourdough fermentation has the potential to exploit the technological, nutritional,  
73 functional and sensory features of wheat flours (Coda, Cagno, Gobbetti, & Rizzello,  
74 2014). In particular, sourdough fermentation improves dough workability, bread  
75 structure and organoleptic and nutritional properties of flours (Rizzello, Calasso,  
76 Campanella, Angelis, & Gobbetti, 2014). Adequate starter cultures are needed to  
77 exploit the potential of particular flour matrices. Thus, the use of sourdough in wheat  
78 breads has gained popularity in recent times as a means to improve the quality and  
79 flavor of breads (Najafi, Pourfarzad, Zahedi, Ahmadian-Kouchaksaraie, & Mohammad  
80 H. Haddad Khodaparast, 2016). Sourdoughs are distinctive of some traditional Italian  
81 sweet baked products like panettone (Picozzi, Anchise, & Foschino, 2006). According  
82 to Montanari et al. (2014) "Panettone is a traditional Italian sweet-leavened baked  
83 product, usually consumed at Christmas". The preparation of panettone begins with a

84       sourdough called "mother" (mother sponge), which is propagated continuously  
85       following specific procedures (Montanari et al., 2014).

86             Panettones are products with a relatively long shelf-life — they may last for  
87       months — and their quality is maintained during storage through the use of various  
88       additives such as oxidizing agents, emulsifiers and enzymes (Benejam, Steffolani, &  
89       León, 2009). Studies on the use of sourdough as a way to reduce the formulation's  
90       additive content (conservative and oxidizing agents), as well as to improve flavor and  
91       aroma (Benejam et al., 2009) have been accomplished.

92             Sensory analysis is an important tool to assist in developing new products,  
93       quality assurance and consumer satisfaction assessments (ASTM, 2014). Because of  
94       the limitations of some methods of measuring perceptions, methods such as Check-  
95       All-That-Apply (CATA) or "Check All That Matches" have been developed to quickly  
96       obtain product profiles through consumer perceptions in trained teams. The evaluation  
97       consists of presenting a list of attributes and asking consumers to indicate words and  
98       phrases that adequately describe sensory attributes, emotional and / or hedonic  
99       responses, purchase intentions, product positioning, or other terms that consumers  
100       may associate with the sample (Meyners & Castura, 2014).

101            The main objective of this work was to evaluate the effect of *L. fermentum* and  
102       *W. anomallus* (formerly *Pichia anomala*) on the microbiological, physical, and chemical  
103       characteristics, as well as the impact of these strains on the sensorial aspects of long  
104       fermentation panettones. In this study, seven types of panettone, produced in a pilot  
105       plant with different sourdoughs were compared.

106

## 107       2. MATERIAL AND METHODS:

### 108       2.1 Microorganisms

109            The strains of microorganisms used throughout this study were *Lactobacillus*  
110       *fermentum* IAL 4541 and *Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533, selected for their  
111       antifungal activities (Coda et al., 2011; Fazeli et al., 2004). The strains were isolated  
112       from a lyophilized natural yeast produced from a blend of refined wheat flour and whole  
113       wheat flour for 14 days (Stefanello et al., 2018) and kept lyophilized by the Collection  
114       Nucleus of the Adolfo Lutz Institute (IAL).

5

6

### 117 2.1.1 Inoculum preparation

118           Actively growing single strains of *L. fermentum* IAL 4541 and *W. anomalus* IAL  
119 4533 were inoculated (inoculum level 1.0%, v/v) into Erlenmeyer flasks containing 100  
120 mL of YM or MRS broth, and incubated for 24 h at 25 and 30 °C, respectively  
121 (Paramithiotis, Chouliaras, Tsakalidou, & Kalantzopoulos, 2005). Twelve-hour cells  
122 were harvested (5000 x g, 15 min, 4 °C), washed twice with distilled sterile water and  
123 resuspended in distilled water to an optical density at 620 nm (OD<sub>620nm</sub>) corresponding  
124 to about 10<sup>10</sup> colony forming unit (CFU) per mL of *L. fermentum* IAL 4541 and 10<sup>8</sup>  
125 CFU/mL of *W. anomalus* IAL 4533. These inoculums were used as a starter culture in  
126 sourdough preparation.

127

### 128 2.2. Sourdough preparation

129 To prepare the sourdough, a seven-stage technique derived from a traditional  
130 procedure with three stages (Paramithiotis et al., 2005) adjusted to this experiment  
131 was applied. Dough 1 (D1) was prepared by mixing the 50 mL of the starter culture  
132 with 100 g of wheat flour (Renata®, Selmi mill). After 24 h incubation at 28 °C,  
133 sourdough 1 (SD1) was formed. It was followed by successive mixing and incubation  
134 until obtain the sourdough 7 (SD7) on day 7 (Figure1), that was considered the final  
135 sourdough.

136

### 137 2.3. Panettone formulation

138           From the sourdoughs produced (*L. fermentum* IAL 4541 and *W. anomalus* IAL  
139 4533) a proportion of the microorganism was established in each treatment (Table 1).  
140 Thus the five treatments were composed of: LF: 100% *L. fermentum* IAL 4541 and 0%  
141 *W. anomalus* IAL 4533; 75 LF / 25 WA: 75% *L. fermentum* IAL 4541 + 25% *W.*  
142 *anomalus* IAL 4533; LF / WA: 50% *L. fermentum* IAL 4541 + 50% *W. anomalus* IAL  
143 4533; 25 LF / 75 WA: 25% *L. fermentum* IAL 4541 + 75% *W. anomalus* IAL 4533; WA:  
144 0% *L. fermentum* IAL 4541 and 100% *W. anomalus* IAL 4533; and the controls  
145 (checks) CP: 100% commercial yeast + 0.5% calcium propionate and Control: 100%  
146 commercial yeast.

147           For panettone preparation, the ingredients were separated, weighed in a semi-  
148 analytical balance and subjected to semi-industrial process using a vertical spiral  
149 kneading trough with two speeds (A30 model, Indústria Máquinas para Panificação

150 Progresso, Santa Teresinha, PR, Brazil) and turbo electric oven (Vipinho 0448,  
151 Perfecta, Curitiba/PR, Brazil). The panettones were prepared using a previously  
152 tested, conventional formulation (Table 2), and the mixing process was the same for  
153 all panettones.

154 The ingredients in the sponge phase were mixed for 9 minutes at slow speed  
155 (190 rpm hook and 50 rpm bowl) and 2 minutes at high speed (380 rpm hook and 100  
156 rpm), while the mass phase mixture took 7 minutes at slow speed and 4 minutes at  
157 fast speed for gluten network to form. The masses were divided in portions of 550 g  
158 each and were left to rest in the climatic Evolution proofer (Super Freezer, Poços de  
159 Caldas, MG, Brazil) until they doubled in size at a controlled temperature of 32 °C /  
160 80%, relative humidity. Afterwards they were supplied in oven Vipinho 0448 (Perfecta,  
161 Curitiba/PR, Brazil) at 180 ° C for 50 minutes. Figure 2 describes the panettone  
162 flowchart.

163

## 164 2.4 Physicochemical analysis

### 165 2.4.1 Instrumental Firmness Analysis

166 The firmness of the panettones was determined by the texturometer Stable  
167 Micro Systems, model TA-XT2i (Godalming / Surrey, UK), according to the method 74-  
168 09.01 (AACCI, 2010). For the analysis, the probe SMS P / 36R HDP / 90 platform was  
169 used in the following operating conditions: compression force measurement, pre-test  
170 speed: 1.0 mm/s, test speed: 1, 7 mm/s, post-test speed: 10.0 mm/s, penetration  
171 distance 40%. Ten readings of each sample were performed. The readings were  
172 performed every 28 days for 140 days (1, 28, 84, and 140 day).

173

### 174 2.4.2 Specific volume

175 The specific volume of the panettones, 2 hours after the resting, was evaluated  
176 by the rape seed method according to AACCI 10.05.01 (AACCI, 2010) using the  
177 Vondel Mill brand volume meter (Model MDMV 03 / MVP 1300, Series 60, Vondel  
178 Indústria e Comércio de Máquinas e Componentes Ltda., São José dos Pinhais, PR,  
179 Brazil). The specific volume was calculated by the ratio between volume and weight of  
180 the panettones (cm<sup>3</sup>/g). The analyses were performed in quadruplicate.

181

### 182 2.4.3 Color analysis

183 The color analysis of the panettones was performed on a Konica Minolta CR450  
184 colorimeter at room temperature under the following conditions: illuminant D<sub>65</sub>,  
185 observation angle: 10° for analysis of crumb color. The results were expressed in the  
186 CIELab system. The colorimeters measure color using three parameters: L\*, ranging  
187 from 100 (white) to zero (black); b\*, ranging from blue (negative) to yellow (positive);  
188 and a\*, that varies from green (negative) to red (positive). The results were the average  
189 of three readings.

190

#### 191 2.4.4 Moisture analysis

192 The moisture analysis of the panettones was performed in two phases. In the  
193 first phase, method 62-05.01 (AACCI, 2010), the panettone slices were chopped and  
194 homogenized (crust + crumb), weighed 10 g sample in tared aluminum capsules,  
195 heated to an oven at 70 °C / 5 h, cooled and weighed. In a second step, method 44-  
196 15.02 (AACCI, 2010), the dry residue was ground in a gral, weighed 2 g of sample in  
197 a tared aluminum dish, heated to 130 °C / 1 h, cooled and weighed. This analysis was  
198 performed with 3 replicates.

199

#### 200 2.4.5 Water activity (Aw)

201 For Aw, the panettone slices were chopped and homogenized, and carried out  
202 the direct measurement in an AquaLab 4TEV water activity analyzer, at a temperature  
203 of 25 °C. The water activity was monitored for 140 days, with readings performed on  
204 days 1, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, and 140.

205

#### 206 2.4.6 pH and total titratable acidity (TTA)

207 The pH and TTA were determined on 10 g of panettone homogenized with 90  
208 mL of deionized water at room temperature (Gamel, Abdel-aal, & Tosh, 2015) at days  
209 1, 28, 56, 84, 112, and 140. The pH was measured using a pH meter (Digimed®, DM-  
210 22, SP, Brazil) and TTA was determined by the standard method (IAL, 2008) using 0.1  
211 M NaOH (expressed in mL of NaOH) and phenolphthalein as indicator (pH 8.3). These  
212 analyses were carried out during 14 days of back-slopping.

213

#### 214 2.5 Study of shelf-life and microbiological analyses of panettones



216 The panettones were stored in a chamber type B.O.D (Biochemical Oxygen  
217 Demand) at 28 ° C / 75% RH and monitored for up to 140 days after manufacture. The  
218 microbiological counts of molds and yeasts, expressed in CFU/g, were determined on  
219 days 28, 98, 112, and 126 after manufacture. Approximately 10 g of sample were 10-  
220 fold diluted with 9 g/L NaCl solution [NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 0.85%, m/v;  
221 peptone (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom), 0.1%, m/v] and  
222 homogenized in a Lab Blender Stomacher (Seward Medical, London, UK) for 2 min.  
223 Decimal dilutions were performed and plated onto Potato Dextrose Agar (PDA) Agar  
224 (Himedia, Mumbai, India) and tartaric acid 10% under aerobic conditions at 25 °C for  
225 72 h (Aplevicz et al., 2014).

226

## 227 2.6. Sensory evaluation

228 The sensory evaluation was performed for the LF, LF/WA, WA, CP, and  
229 commercial panettone. Commercial panettone was purchased locally. This study was  
230 approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria  
231 (RS, Brazil) (CAAE: 46155415.6.0000.5346). A three-digit code was assigned to the  
232 samples, which were evaluated by each consumer in a monadic order, following a  
233 balanced design (Ares et al., 2016). The tests were performed in individual booths with  
234 fluorescent lighting according to Heck et al. (2017). The panettones were cut into 7 x  
235 5 cm and water at room temperature was provided to consumers for palate cleansing.  
236 One hundred and forty consumers of panettones (66% female, 34% male, age 17–60  
237 years) participated in the sensory tests.

238

### 239 2.6.1 Check-all-that-apply (CATA) evaluation

240 Consumers were asked to complete a CATA questionnaire with 23 descriptors  
241 related to the sensory characteristics of the panettones. The descriptors used in the  
242 CATA questionnaire were based on studies on sensory consumer perception (Ares &  
243 Jaeger, 2013, 2015; Jaeger et al., 2015). The following sensory attributes were used  
244 to characterize the sensory profile of the panettones: Alveoli elongated and with uniform  
245 size, Mustiness aroma, Nice aroma, Holes in the crumb, Uniform color, Remaining  
246 taste, Candy, Pasta devoid of flavor, Candied fruits, and raisins in the proper amount,  
247 Crumbly and dry crumb, Excessively aromatic, Soft taste, Sweet aroma, Alcohol

248 aroma, Proper texture, Bitter taste, Raw pasta, Soft, Few candied fruits and raisins,  
249 Pleasant taste, Yeast flavor, Moist crumb, and Aroma of preservative.

250

## 251 2.6.2 Acceptance tests

252 A sensory acceptance test was performed using a 9-point structured hedonic  
253 scale, varying from “disliked very much” to “liked it very much” (Stone, Bleibaum, &  
254 Thomas, 2012). To purchase intent it was used a 5-point scale (5 = definitely buy, 3 =  
255 may buy or may not buy, 1 = definitely would not buy) (Meilgaard, Civille & Carr, 2006).

256

## 257 2.7. Statistical evaluation

258 The global experiment was repeated three times. Data (except sensory  
259 evaluation) were analysed by ANOVA using a general linear model considering the  
260 treatments as fixed effect and the replicates as random effect (n=3). Tukey's test was  
261 used to compare the averages at the 5% level of significance. Pearson's test was  
262 applied for correlational analysis using a statistical program (StatSoft, 2007). Analysis  
263 of correspondence was used to analyze data from CATA questionnaire, considering  
264 the chi-square distance (Vidal, Tárrega, Antúnez, Ares, & Jaeger, 2015), calculated on  
265 the matrix containing the frequency of use of each term for each sample. For the  
266 consumer test, a two-way ANOVA (consumers x samples) followed by Tukey's test at  
267 5% significance level ( $p < 0.05$ ) was carried out.

268

## 269 3. RESULTS AND DISCUSSION:

### 270 3.1 Physical characterization of panettones

271 In bakery products, attributes such as texture, specific volume, color and moisture  
272 are fundamental characteristics appreciated by consumers (Valcárcel-Yamani &  
273 Lannes, 2013). The results of instrumental firmness are presented in Table 3, with  
274 values varying from 3.27 to 6.87 N over 140 days, both values belonging to the control  
275 sample with calcium propionate. For the remaining treatments, the firmness, in  
276 general, the variation over the storage time was small. The softness of panettones  
277 made with LF and 75LF / 25WA did not show significant differences over time, whereas  
278 for panettones made with commercial yeast with and without calcium propionate (CP  
279 and Control) showed the greatest softness among all the treatments. However, from  
280 day 84 the treatments that demonstrated the highest averages were the CP and

281 Control. At the end of the analysis period (140 days) the best treatments for texture  
282 among the panettones made with sourdough were with the proportions of 50% *L.*  
283 *fermentum* IAL 4541 and 50% *W. anomalus* IAL 4533 and 25% *L. fermentum* IAL 4541  
284 and 75 % of *W. anomalus* IAL 4533.

285 Through the Pearson correlation analysis, it was observed that firmness on day  
286 1 correlated negatively with the specific volume ( $r = - 0.91$ ), moisture ( $r = - 0.91$ ),  
287 lightness ( $r = - 0.91$ ) and (b) ( $r = - 0.91$ ), that is, with the increase in the specific  
288 volume, moisture, clarity of the crust and the b\* (blue-yellow chromaticity coordinate)  
289 value of the panettone crumb, there was a decrease in firmness in the panettones.

290 In products with complex formulations such as panettone, texture is affected by  
291 the fat and sugar content (Benejam et al., 2009). The use of xynalase counteracted to  
292 produce softer panettones when compared with the control (Benejam, Steffolani, &  
293 León, 2009). Comparing the results of this study with the aforementioned study,  
294 panettones made with sourdough were softer throughout the 140 days of storage with  
295 averages between 5.04 and 6.09 N (Table 3) than to the 6 days of storage in  
296 temperature (minimum values of 8 N). Valcárcel-Yamani & Lannes (2013 analyzed  
297 nine trade panettone brands and obtained values of instrumental firmness ranging from  
298 2.14 to 7.55 N. Considering that in this study the panettones were purchased and  
299 evaluated with time of estimated from 30 to 90 days.

300 The results of specific volume, moisture and color ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) are described  
301 in Table 4. Regarding the specific volume (Table 4), the values obtained were close,  
302 with variation ranging from 2.88 to 3.25 cm<sup>3</sup>/g, and the lowest values were obtained in  
303 the 100% LF and in the control without calcium propionate (Control). These results are  
304 probably due to higher CO<sub>2</sub> production during the fermentation phase (Gerardo-  
305 Rodríguez et al., 2017) and subsequent expansion of these gases during delivery,  
306 which were imprisoned inside the gluten network. The treatments 75LF / 25WA, 25LF  
307 / 75WA, LF / WA and WA did not differ statistically ( $p > 0.05$ ) between each other and  
308 with CP treatment. The treatment with 100% *L. fermentum* IAL 4541 (LF) had the  
309 lowest specific volume (2.88 cm<sup>3</sup>/g). The control treatment, although elaborated only  
310 with commercial yeast, did not produce a good result of specific volume, being below  
311 the expectations. The panettones elaborated with the strain *W. anomalus* IAL 4533  
312 presented the largest volumes. This can be explained by the fact that this yeast adapts  
313 easily in a sourdough ecosystem, thus producing more CO<sub>2</sub>

314

315 (Heide-Marie, Moons, Huret, Vrancken, & De Vuyst, 2011). In the Valcárcel-Yamani &  
316 Lannes (2013) study, the nine brands of commercial panettone presented values from  
317 3.18 to 5.13 cm<sup>3</sup> / g.

318 Based on the values obtained for the luminosity (L\*) represented in Table 4, all  
319 treatments showed values of L\* above 70, which represents good sensory acceptability,  
320 according to Purlis (2011). CP treatment was the clearest, although the variation  
321 between treatments was small (74.90 to 77.79) (Table 4). According to one study  
322 reporting the effect of sourdough addition on mass (Torrieri, Pepe, Ventorino, Masi, &  
323 Cavella, 2014) it was observed a correlation between the treatments using acid mass.  
324 However, the treatment that had its color influenced in the fermentation was Control (L\*:  
325 74.90). Although the latter treatment was made only with commercial yeast, it presented  
326 the darkest color of the kernel, disagreeing with Andrade (2017) study that obtained the  
327 highest values of L\* for samples made with dry commercial yeast. The presence of  
328 enough sugar in the panettone formulation accelerates the reaction of Maillard, leading  
329 to a progressive crust and crumb darkening (Benejam et al., 2009; Valcárcel-Yamani &  
330 Lannes, 2013). With respect to the negative values of a\* we can infer that panettone  
331 samples showed slightly reddish tones and based on the positive values of b\*, the  
332 samples approach more of the yellow tint (Prati, Moretti, & Cardello, 2005).

333 Comparing the mean values of the moisture content of panettones (Table 4) with  
334 a study by Valcárcel-Yamani & Lannes (2013) on Brazilian trademarks, the results of  
335 this work ranged from 26.4 to 23.1 %. The moisture values for the panettones produced  
336 with sourdough (LF, 75LF / 25WA, LF / WA, 25LF / 75WA, WA) varied from 23.90 to  
337 25.31 and for panettones made with commercial yeast (CP and control) there was a  
338 slight increase in this parameter (24.95 and 25.36 %).

339

### 340 3.2 Results of water activity, pH, and titratable total acidity

341 Figure 3 shows the water activity - Aw (a), pH (b) and titratable total acidity - TTA  
342 (c) results. The water activity suffered a sudden drop in values from day 112. Taking a  
343 general evaluation from the beginning of the monitoring until the 140 days, during the  
344 first 28 days the treatment using calcium propionate as preservative (CP) presented the  
345 highest values of Aw. After 42 days, the observed mean values varied widely between

346 the treatments using sourdough. The treatment using commercial yeast (Control)  
347 obtained the lowest average for this attribute, with a marked drop after 112 days of  
348 storage. As for the water activity, it is perceived that it is high, favoring the growth of  
349 microorganisms, especially molds and yeasts, that develop easily in media with water  
350 activity above 0.7, thus justifying the need for the use of preservatives to increase  
351 product shelf life (Zanqui et al., 2014).

352 In relation to the pH values (Figure 3 b) monitored during the 140 days, it was  
353 observed very similar behavior with the treatments from the mixture of the selected  
354 strains (LF; 75LF / 25WA; LF / WA; 25LF / 75WA; WA) obtaining pH values between  
355 3.90 and 4.34. Panettones made with commercial yeast (Control and CP) showed  
356 higher pH values ranging from 4.79 to 5.13.

357 This separation in groups (natural yeast group and commercial yeast group)  
358 was also verified for TTA as shown in Figure 3 c. TTA values were higher, as expected,  
359 for 100 LF, 75LF / 25WA, LF / WA, 25LF / 75WA and 100 WA treatments assuming  
360 values (minimum and maximum) of 2.8 and 4.1, respectively, during the monitoring  
361 period (values expressed in mL of 0.1 N NaOH). In contrast, the lowest values of TTA  
362 (in mL of 0.1 N NaOH) were found in panettones obtained with commercial yeast  
363 (Control) and addition of calcium propionate (CP), as shown in Figure 3 c. According  
364 to the results presented in Figure 3 c, the titratable total acidity is within the maximum  
365 range established by the legislation, that is, 6 mL.

### 366 367 3.3 Shelf life and microbiological analyses of panettones

368 Table 5 provides data describing the microbiological growth of molds and yeasts in  
369 panettones. Microbiological counts of molds and yeasts were expressed in Log  
370 CFU/mL. The control panettones (Control) reached only 56 days of shelf life, while the  
371 LF / WA and WA treatments remained microbiologically stable throughout the  
372 monitoring period (> 126 days). Treatment with addition of calcium propionate (CP)  
373 preservative becomes moldy after 112 days. Based on the results of the water activity  
374 (Figure 3 - a) it is possible to say that during the complete assay panettones presented  
375 high values of Aw and therefore were susceptible to fungal deterioration (Zanqui et al.,  
376 2014). The extended shelf life of sourdough panettones could be attributed to a wide  
377 variety of organic acids and low molecular weight metabolites produced by  
378 microorganisms during the fermentation process (Hassan et al., 2015).

### 379 3.4 Check-all-that-apply (CATA)

380 Figure 4 presents the correspondence analysis (CA) used to evaluate the  
381 descriptors generated by the CATA questionnaire. The CA explained 81.68% of the  
382 total variance, with 54.61% and 27.07% in the first (F1) and second (F2) dimensions,  
383 respectively. The panettonnes were separated on the sensory map into 3 distinct  
384 groups. The first group consisted of the treatment containing the panettone LF/WA.  
385 The second group consisted of both the Commercial and CP. The third group consisted  
386 of both the WA and LF. The treatment LF/WA was characterized by the descriptors  
387 Holes in the core, Candied fruits, and raisins in the proper amount, Excessively  
388 aromatic, Sweet aroma, Bitter taste, Raw pasta, and Moist crumb. The treatments WA  
389 and LF were characterized by the descriptors Nice aroma and Remaining taste. The  
390 treatments Commercial and CP were characterized by the descriptors Aroma of  
391 preservative, Mustiness aroma, Pasta devoid of flavor, Alcohol aroma, Few candied  
392 fruits and raisins, and Yeast flavor.

393 Through the CATA test it was possible to distinguish the differences between  
394 treatments using the sourdoughs of those who used commercial yeast in their  
395 formulation. The mixture of the *L. fermentum* IAL 4541 and the *W. anomalus* IAL 4533  
396 strains in the 50% proportion coincided with the same quadrant whereas the treatments  
397 involving the separate microorganisms (WA and LF) were characterized by other  
398 sensorial attributes. In the second quadrant, it was possible to see that the attribute of  
399 preservative aroma was defined as a control (CP) and a commercial treatment.

400

### 401 3.5 Acceptance tests

402 The results for the acceptance test performed after 1 day of manufacture are  
403 presented in Table 6. The results of color, odor, flavor, softness and moisture attributes  
404 show that panettonnes were well accepted by consumers in general refers to the  
405 sensory characteristics of the product with a mean that is “moderately liked” in the  
406 scale used. Regarding color, it can be observed that the panettone made with LF / WA  
407 presented the lowest mean (7.25) and commercial panettone the best mean (7.71).  
408 However, for the odor attribute it was possible to note that the sourdough panettonnes  
409 obtained the best evaluations in comparison with the CP and commercial treatments.

410 Fermented sourdough panettones have more odor than traditionally processed  
411 panettones (with commercial yeast) showing an increase in the concentration of odor  
412 and taste precursor compounds (Torrieri et al., 2014).

413 Analyzing Table 6, it can be observed that for all formulations the evaluations  
414 were close to 7, indicating a good acceptability in relation to the flavor, and the  
415 differences found between the means, for the attributes analyzed, were not significant  
416 at a level of 5% by the ANOVA variance test, demonstrating the acceptability of the  
417 tasters in relation to all the samples. Thus, it is possible to add sourdough to the  
418 panettone without displeasing consumers' palate, since it received notes that are  
419 equivalent to "liked moderately" in the scale used.

420 Good evaluations for the odor and flavor attributes may be related to the  
421 properties of exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria (LAB) (Torrieri  
422 et al., 2014). These EPSs act as bio-thickeners or hydrocolloids that stabilize the  
423 rheological properties of the dough improving taste, odor and texture and ensure a  
424 long shelf life (Tieking & Gänzle, 2005).

425 On the other hand, for the softness attribute there was a statistical difference ( $p$   
426  $< 0.05$ ) and the best means were for the commercial treatment (7.94) and for the LF  
427 (7.74). In general, the other treatments received scores close to 7, which means good  
428 acceptability by consumers. As regards moisture, a similarity was observed with the  
429 results obtained in the physical and chemical analyses (Table 4) with the results  
430 achieved with the acceptance test (Table 6). The LF treatment presented the best  
431 score (7.42) as well as one of the highest moisture (25,31). Based on the statistical  
432 analysis performed, it was observed that the treatments presented similar averages,  
433 where only the LF / WA treatment was shown to be relatively inferior to the others.  
434 Although the treatments had significant differences ( $p < 0.05$ ), the means indicated for  
435 the moisture attribute were "moderately liked" in the scale used.

436 From the results presented in Figure 5 it can be verified that the consumers  
437 presented a positive attitude regarding the Purchase intention of the evaluated  
438 panettones. A total of 80% of consumers "probably or certainly" would buy the LF  
439 panettone, 68.6% the WA and 49.3% the LF / WA. These values for both CP and  
440 commercial panettones were 65.7%.

441 Unlike bread, panettone is a product that maintains its quality during storage  
442 and can be consumed after a long period, up to 6 months. During storage, there are

443 transformations in the product, called “apparent maturation”, which help to accentuate  
444 the flavor of the product and, in this sense, favor the sensorial quality of the final  
445 product (Valcárcel-Yamani & Lannes, 2013). In general, people always seek or  
446 accept food prepared from ingredients traditionally established and close to their  
447 eating habits, since food behavior is influenced by environmental, biological,  
448 ecological, and sociocultural factors. However, sensory and cultural characteristics,  
449 such as taste, satisfaction, and convenience, may also interfere with the choice of  
450 food and even increase the nutritional ratios for the choice of a particular food (Barker,  
451 Thompson, & McClean, 1995).

452 Panettonnes of good technological quality and good level of acceptance were  
453 produced in this work. The products developed met the legislation in the parameters  
454 of moisture and acidity. Regarding the analysis of instrumental firmness, the  
455 panettonnes elaborated with sourdough had their softness less affected during the  
456 storage if compared with panettonnes elaborated with commercial yeast, indicating a  
457 technological advantage of the use of these strains as starters. The physical and  
458 chemical analyses met the standard available in the literature. Microbiological analysis  
459 of panettonnes for molds and yeasts makes it clear that the use of *L. fermentum* IAL  
460 4541 and *W. anomalus* IAL 4533 provides an increase in the shelf life of the products.  
461 The species used as sourdough are often described in the literature as microorganisms  
462 with antifungal properties, and the treatments LF / WA and WA proved this capacity  
463 because they are the only panettonnes that not became moldy after 126 days of  
464 monitoring. These results show the economic advantage of using sourdough in  
465 panettonnes to increase shelf life without the addition of artificial preservatives, thereby  
466 reducing fungal spoilage losses. In addition, the use of sourdough in the formulating  
467 panettonnes also presented satisfactory results from the sensorial point of view.  
468 Consumers perceived differences in some attributes, especially with regard to odor. In  
469 addition, more natural and preservative-free panettonnes are more attractive to  
470 consumers than those traditionally marketed.

471 Based on the results obtained in the acceptance test, it is possible to conclude  
472 that consumers had a good acceptance regarding the taste attribute. Therefore, the  
473 use of sourdough in the preparation of panettonnes from selected strains and without  
474 artificial preservatives is shown as a more natural and promising alternative because  
475 it was well accepted sensorially with notes equivalent to “moderately liked.” The  
476 panettonnes were well accepted sensorially proving to be very competitive with respect



477 to the control and commercial panettone. Among the treatments, panettone made with  
478 LF / WA showed better physical, chemical, and microbiological characteristics,  
479 although commercial panettone presented the best marks in the acceptance test.  
480 According to the CATA test, there was a clear separation between the samples  
481 showing that the LF and WA panettones differ from the LF / WA, and the CP and  
482 commercial panettones differ from the others.

483

#### 484 4. FUNDING SOURCES

485 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
486 Nível Superior (CAPES), Brazil [Edital CAPES No. 27/2010 - Pró-Equipamentos  
487 Institucional, grant 552440/2011-6]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico  
488 e Tecnológico (CNPq), Brazil [grants 456472/2014-2, 309691/2015-0 and  
489 311554/2015-6].

490

#### 491 5. REFERENCES

492 AACCI “American Association of Cereal Chemists International”. Approved methods, St.  
493 Paul., 11th ed., 2010.

494 American Society For Testing and Materials - ASTM. Standards Sensory-evaluation.  
495 ([online] <http://www.astm.org/Standards/sensoryevaluation-standards.html> (last  
496 accessed 30 March 2018)).

497 Andrade, S. (2017). Produção de fermento natural a partir do substrato da batata  
498 (*Solanum tuberosum*) e caldo de cana (*Saccharum officinarum*). (Course Completion  
499 Work (Graduation)). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. ([online]  
500 [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/7746/1/PG\\_COALM\\_2017\\_1\\_03.](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/7746/1/PG_COALM_2017_1_03.pdf)  
501 pdf. (last accessed 30 March 2018)).

502 Aplevicz, K. S., Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Dinon, A. Z., Sebastião, E., & Anna, S. (2014).  
503 Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape  
504 sourdough. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(2), 321–327.

505 Ares, G., Castura, J. C., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., Coste, B., ... Jaeger, S. R.  
506 (2016). Comparison of two TCATA variants for dynamic sensory characterization of  
507 food products. *Food Quality and Preference*, 54(2015), 160–172.  
508 <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.07.006>

509 Ares, G., & Jaeger, S. R. (2013). Check-all-that-apply questions : Influence of attribute

- 510 order on sensory product characterization. *Food Quality and Preference*, 28, 141–153.
- 511 Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). Examination of sensory product characterization bias  
512 when check-all-that-apply (CATA) questions are used concurrently with hedonic  
513 assessments. *Food Quality and Preference*, 40, 199–208.  
514 <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.10.004>
- 515 Barker, M. E., Thompson, K. A., & McClean, S. I. (1995). Attitudinal dimensions of food  
516 choice and nutrient intake. *The British Journal of Nutrition*, 74(5), 649–59.  
517 <http://doi.org/10.1079/BJN19950168>
- 518 Benejam, W., Steffolani, M. E., & León, A. E. (2009). Use of enzyme to improve the  
519 technological quality of a panettone like baked product. *International Journal of Food  
520 Science and Technology*, 44(12), 2431–2437. [http://doi.org/10.1111/j.1365-  
521 2621.2009.02019.x](http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02019.x)
- 522 Coda, R., Cagno, R. Di, Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid  
523 bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37,  
524 51–58. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.018>
- 525 Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011).  
526 Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during  
527 sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during  
528 storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484–3492.  
529 <http://doi.org/10.1128/AEM.02669-10>
- 530 Crowley, S., & Mahony, J. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria  
531 as natural. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 93–109.  
532 <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>
- 533 Fazeli, M. R., Shahverdi, A. R., Sedaghat, B., Jamalifar, H., & Samadi, N. (2004).  
534 Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent anti-mould preservative of a  
535 traditional Iranian bread. *European Food Research and Technology*, 218(6), 554–556.  
536 <http://doi.org/10.1007/s00217-004-0898-1>
- 537 Gamel, T. H., Abdel-aal, E. M., & Tosh, S. M. (2015). LWT - Food Science and  
538 Technology Effect of yeast-fermented and sour-dough making processes on  
539 physicochemical characteristics of  $\beta$ -glucan in whole wheat / oat bread. *LWT - Food  
540 Science and Technology*, 60(1), 78–85. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.030>
- 541 Gerardo-rodríguez, J. E., Ramírez-wong, B., Ledesma-osuna, A. I., Medina-rodríguez, C.  
542 L., Ortega-ramírez, R., & Silvas-garcía, M. I. (2017). Management of freezing rate and  
543 trehalose concentration to improve frozen dough properties and bread quality. *Food*

- 544 *Science and Technology*, 37(1), 59–64.
- 545 Hassan, Y. I., Zhou, T., & Bullerman, L. B. (2015). Sourdough lactic acid bacteria as  
546 antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology*  
547 *International*, 22(1), 79–90. <http://doi.org/10.1177/1082013214565722>
- 548 Hassan, Y. I., Zhou, T., & Bullerman, L. B. (2016). Sourdough lactic acid bacteria as  
549 antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International*,  
550 22(1), 79–90. <http://doi.org/10.1177/1082013214565722>
- 551 Heck, R. T., Vendruscolo, R. G., Etchepare, M. de A., Cichoski, A. J., Menezes, C. R. de,  
552 Barin, J. S., ... Campagnol, P. C. B. (2017). Is it possible to produce a low-fat burger  
553 with a healthy n-6/n-3 PUFA ratio without affecting the technological and sensory  
554 properties? *Meat Science*, 130, 16–25. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.03.010>
- 555 Heide-Marie, D., Moons, M.-C., Huret, S., Vrancken, G., & De Vuyst, L. (2011).  
556 *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie Van*  
557 *Leeuwenhoek*, 99, 63–73. <http://doi.org/10.1007/s10482-010-9517-2>
- 558 Jaeger, S. R., Beresford, M. K., Paisley, A. G., Antúnez, L., Vidal, L., Silva, R., ... Ares,  
559 G. (2015). Check-all-that-apply ( CATA ) questions for sensory product  
560 characterization by consumers : Investigations into the number of terms used in CATA  
561 questions. *Food Quality and Preference*, 42, 154–164.
- 562 Kulp, K. (2003). Baker's Yeast and Sourdough Technologies in the Production of U.S.  
563 Bread Products Title. *Handbook of Dough Fermentations*, 97–144.
- 564 Melin, P., Schnürer, J., & Håkansson, S. (2011). Formulation and stabilisation of the  
565 biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of*  
566 *General and Molecular Microbiology*, 99(1), 107–112. [http://doi.org/10.1007/s10482-](http://doi.org/10.1007/s10482-010-9522-5)  
567 [010-9522-5](http://doi.org/10.1007/s10482-010-9522-5)
- 568 Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (2006). *Sensory evaluation techniques*. London:  
569 CRC Press.
- 570 Meyners, M. & Castura, J. C. Check-all-that-apply questions. In: P. Varela & G. Ares  
571 (Eds.), *Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling*. Boca  
572 Raton: CRC Press, 2014, p. 271–305.
- 573 Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Chinnici, F., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2014).  
574 Effects of two different sourdoughs on the characteristics of Pandoro, a typical Italian  
575 sweet leavened baked good. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 289–299.  
576 <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.045>

- 577 Najafi, M. B. H., Pourfarzad, A., Zahedi, H., Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., & Mohammad  
578 H. Haddad Khodaparast. (2016). Development of sourdough fermented date seed for  
579 improving the quality and shelf life of flat bread : study with univariate and multivariate  
580 analyses. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 209–220.  
581 <http://doi.org/10.1007/s13197-015-1956-3>
- 582 Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. (2005). Application  
583 of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional  
584 three-stage procedure. *Process Biochemistry*, 40(8), 2813–2819.  
585 <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.021>
- 586 Picozzi, C., Anchise, F. D', & Foschino, R. (2006). PCR detection of *Lactobacillus*  
587 *sanfranciscensis* in sourdough and Panettone baked product. *European Food*  
588 *Research and Technology*, 222, 330–335. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-0121-z>
- 589 Prati, P., Moretti, R. H., & Cardello, H. M. A. B. (2005). Elaboração de bebida composta  
590 por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas  
591 1. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(1), 147–152.
- 592 Purlis, E. (2011). Bread baking: Technological considerations based on process  
593 modelling and simulation. *Journal of Food Engineering*, 103, 92–102.  
594 <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.003>
- 595 Rizzello, C. G., Calasso, M., Campanella, D., Angelis, M. De, & Gobbetti, M. (2014). Use  
596 of sourdough fermentation and mixture of wheat , chickpea , lentil and bean fl ours for  
597 enhancing the nutritional , texture and sensory characteristics of white bread.  
598 *International Journal of Food Microbiology*, 180, 78–87.  
599 <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.005>
- 600 Salvucci, E., LeBlanc, J. G., & Pérez, G. (2016). Technological properties of Lactic acid  
601 bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Science and Technology*, 70,  
602 185–191. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.043>
- 603 STATISTICS. *User's guide*. Version 8.0. Tulsa: StatSoft, 2007.
- 604 Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Cavalheiro, C. P., Santos, M. L. B., Nabeshima, E.  
605 H., Copetti, M. V., & Fries, L. L. M. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-  
606 dried wheat sourdough production. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 510–  
607 517. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>
- 608 Stefanovic, E., Fitzgerald, G., & Mcauliffe, O. (2017). Advances in the genomics and  
609 metabolomics of dairy lactobacilli : A review. *Food Microbiology*, 61, 33–49.  
610 <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>

- 611 Stone, H., Bleibaum, R.N. & Thomas, H.A. *Sensory Evaluation Practices*. 4. ed. San  
612 Diego: Academic Press, 2012. 438 p.
- 613 Tieking, M., & Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated  
614 lactobacilli. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 79–84.  
615 <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.015>
- 616 Torrieri, E., Pepe, O., Ventrino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of  
617 sourdough at  
618 different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT - Food Science and  
619 Technology*, 56(2), 508–516. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.005>
- 620 Valcárcel-Yamani, B., & Lannes, S. C. da S. (2013). Quality parameters of some Brazilian  
621 panettones. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 511–519.  
622 <http://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300012>
- 623 Valerio, F., Di Biase, M., Lattanzio, V. M. T., & Lavermicocca, P. (2016). Improvement of  
624 the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of  
625 phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. *International Journal of Food  
626 Microbiology*, 222, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.011>
- 627 Vidal, L., Tárrega, A., Antúnez, L., Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). Comparison of  
628 Correspondence Analysis based on Hellinger and chi-square distances to obtain  
629 sensory spaces from check-all-that-apply (CATA) questions. *Food Quality and  
630 Preference*, 43, 106–112. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.03.003>
- 631 Zanqui, A. B., Bastiani, D., Marques, D. R., De Souza, A. H. P., Gohara, A. K., Matsushita,  
632 M., & Monteiro, A. R. G. (2014). Elaboração de Minipanetone Contendo Ômega-3 por  
633 Substituição Parcial de Farinha de Trigo por Farinha de Linhaça Dourada (*Linum  
634 usitatissimum* L.). *Revista Virtual de Química*, 6(4), 968–976.  
635 <http://doi.org/10.5935/1984-6835.20140060>  
636  
637

**Table 1.** Description of the treatments with the % used of the *Lactobacillus fermentum* strains IAL 4541 (LF) and *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (WA) in the sourdough preparation. Control trials using the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.

Treatments	<i>L. fermentum</i> IAL 4541	<i>W. anomalus</i> IAL 4533	Commercial yeast <i>S. cerevisiae</i>	Calcium propionate
LF	100%	-	-	-
75LF/25WA	75%	25%	-	-
LF/WA	50%	50%	-	-
25LF/75 WA	25%	75%	-	-
WA	-	100%	-	-
CP	-	-	3%	0.5%
Control	-	-	3%	-

**Table 2.** Panettone formulations.

Ingredients	<i>Step 1 - Sponge</i> % (b.f.)***
Wheat flour	76.0
Enzima Spring	0.045
Ascorbic acid	0.005
Datem	0.5
Monoglycerides	2.0
Gluten	3.5
Pasteurized Yolk	9.5
Dried malt	1.0
Sourdough *	0 e 30.0
Commercial Sponge **	0 e 30.0
Water	38.0
Sugar	20.5
<i>Step 2 - Dough</i> % (b.f.)	
<i>Sponge (Step 1)</i>	180.0
Wheat flour	24.0
Calcium propionate *	0.0 - 0.5
Fat (80 % lipids)	15.0
Sugar	17.5
Ascorbic acid	0.008
Salt	1.0
Sorbitol	0.15
Panettone Aroma	0.35
Fruit Blend	50.0

\* Sourdough and Calcium propionate as per Tab 1. \*\* Commercial sponge prepared with 3% commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 60% water and 40% wheat flour 15 minutes before preparation of CP and Control panettones (Tab 1). \*\*\* b.f. = base flour, i.e., the weight of the ingredients was calculated based on the total weight of the wheat flour.

**Table 3.** Monitoring the instrumental firmness of panettones during 140 days of storage.

Treatments	Firmness Instrumental (N)				SEM	Sig
	0° day	28° day	84° day	140° day		
LF	6.41 <sup>NSa</sup>	6.45 <sup>NSa</sup>	6.71 <sup>NSa</sup>	6.09 <sup>NSab</sup>	0.399	***
75LF/25WA	5.63 <sup>NSb</sup>	5.84 <sup>NSa</sup>	6.46 <sup>NSab</sup>	5.54 <sup>NSbc</sup>	0.321	***
LF/WA	4.28 Bcd	5.76 Aca	5.89 Ab	5.36 Abcd	0.167	***
25LF/75WA	4.54 Bcb	5.97 Aa	5.01 Bc	5.04 Bcd	0.158	***
WA	4.40 Bc	5.72 Aca	6.29 Aab	5.77 Abc	0.418	***
CP	3.27 Be	6.33 Aa	6.87 Aa	6.63 Aba	0.295	***
Control	3.69 Ce	3.51 Db	5.26 Ac	4.64 Bd	0.149	***
SEM	0.209	0.161	0.203	0.233		***
Sig	***	***	***	***		

<sup>A</sup> Mean values in the same row not followed by a common capital letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). NS: not significant. <sup>a</sup> Mean values in the same column not followed by a common lowercase letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). SEM: standard error of the mean. Sig.: significance; \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*  $p < 0.05$ .



**Table 4.** Physical characterization of panettones made with the strains of *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 (LF) and *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (WA) and panettones using the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.

Treatments	Specific volume (g/cm <sup>3</sup> )	Moisture (g/100g)	Instrumental color		
			L*	a*	b*
LF	2.88 c	25.31 a	76.90 bc	-0.25 b	23.12 d
75LF/25WA	3.15 ab	24.56 ab	76.60 c	0.002 a	22.76 d
LF/WA	3.25 a	23.91 b	77.03 bc	-0.15 ab	22.93 d
25LF/75WA	3.10 ab	24.50 ab	77.23 b	-0.11 ab	23.01 d
WA	3.21 ab	24.93 ab	77.21 b	-0.02 a	23.67 c
CP	3.06 abc	25.36 a	77.79 a	-0.15 ab	24.39 b
Control	3.04 bc	24.95 ab	74.90 d	-0.06 a	25.18 a
SEM	0.063	0.421	0.173	0.059	0.146
Sig	**	*	**	**	**

<sup>a</sup> Mean values in the same column not followed by a common letter differ significantly (p<0.05). SEM: standard error of the mean. Sig.: significance; \*\*\*p<0.001. \*\*p<0.01. \*p<0.05.

**Table 5.** Microbiological counts of molds and yeasts of panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 (LF), *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (WA) and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with (CP) and without calcium propionate (Control) as an artificial preservative during 140 days of storage.

Treatments	Cell counts <sup>a</sup>			
	After 28 days	After 98 days	After 112 days	After 126 days
LF	< 1	3,114	*	*
75LF/25WA	< 1	< 1	2.301	*
LF/WA	< 1	< 1	< 1	2.199
25LF/75WA	< 1	< 1	2.176	*
WA	< 1	< 1	< 1	2.438
CP	< 1	< 1	3.000	*
Control	1.477	*	*	*

<sup>a</sup> (Log CFU/ml). \*Moldy. < 1: less than 1 log CFU/mL.

**Table 6.** Results of the acceptance test of panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541, *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with calcium propionate (CP) as artificial preservative and commercial panettone.

Treatments	Color	Odor	Flavor	Softness	Moisture	Buy intention
LF	7.49 ab	7.46 a	7.45 n.s	7.74 ab	7.42 a	3.88 a
LF/WA	7.25 b	7.24 ab	6.99 n.s	6.95 c	6.71 b	3.46 b
WA	7.47 ab	7.32 ab	7.31 n.s	7.43 b	7.27 a	3.76 ab
CP	7.66 ab	6.92 b	7.18 n.s	7.29 bc	7.01 ab	3.74 ab
Comercial	7.71 a	7.04 ab	7.16 n.s	7.94 a	7.52 a	3.78 ab
SEM	0.151	0.370	0.187	0.362	0.191	0.117
Sig	*	n.s	n.s	n.s	*	*

<sup>a</sup> Mean values in the same column not followed by a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). SEM: standard error of the mean. Sig.: significance; n.s. (not significant).

\*\*\* $p < 0.001$ . \*\* $p < 0.01$ . \* $p < 0.05$ .

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Sourdough preparation scheme.

**Figure 2.** Preparation of panettones.

**Figure 3.** Water activity - Aw (a), pH (b) and titratable total acidity - TTA (c) of panettones up to 140 days of storage.

**Figure 4.** Sample representation and terms in the first (F1) and second (F2) dimensions of the correspondence analysis performed on check-all-that-apply (CATA) data questions on panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 (LF), *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (WA) and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with (CP) and without calcium propionate (Control) as artificial preservative.

**Figure 5.** Buy intention of panettones made with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541, *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with calcium propionate (CP) as artificial preservative and commercial panettone (Number of participants= 140).

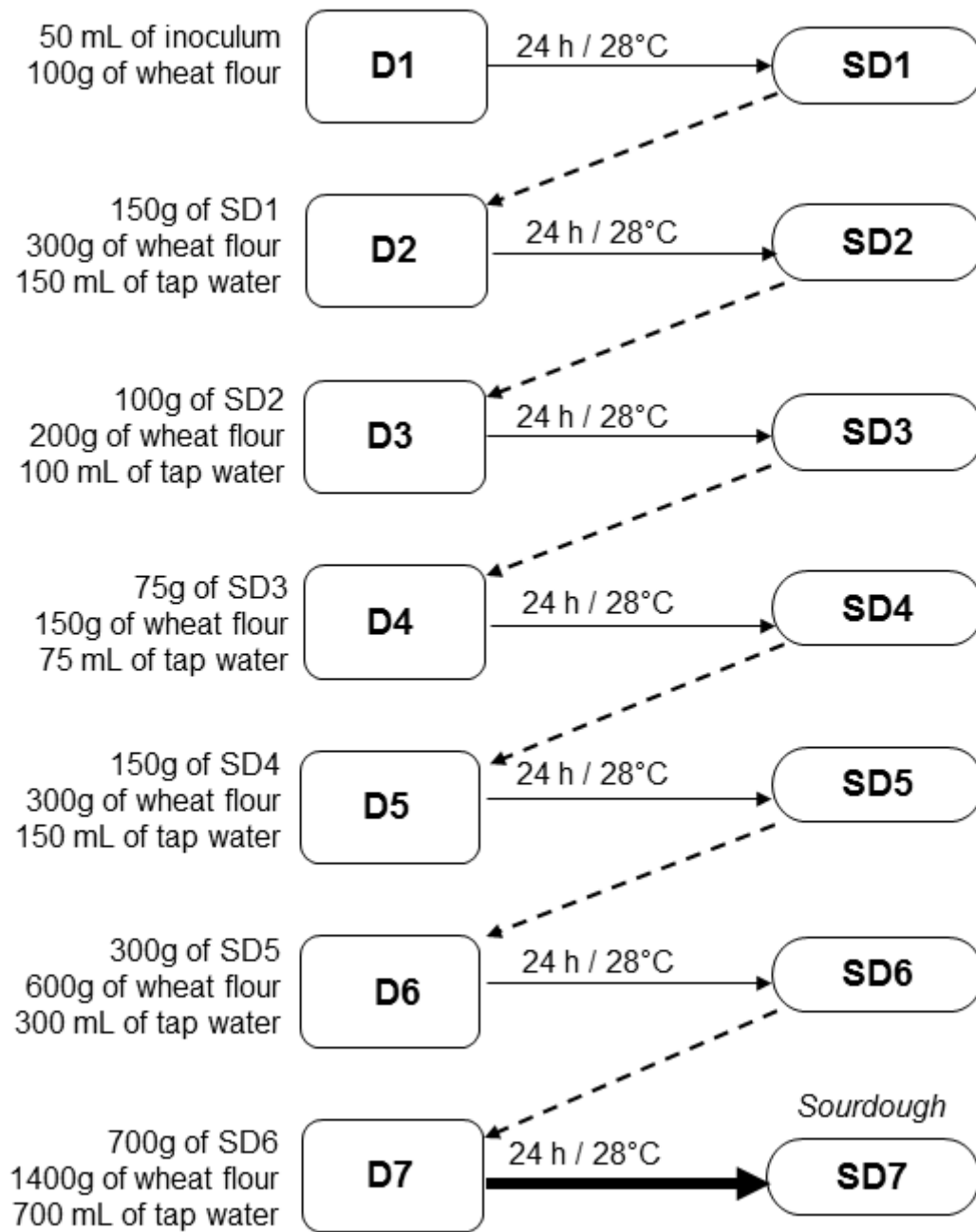
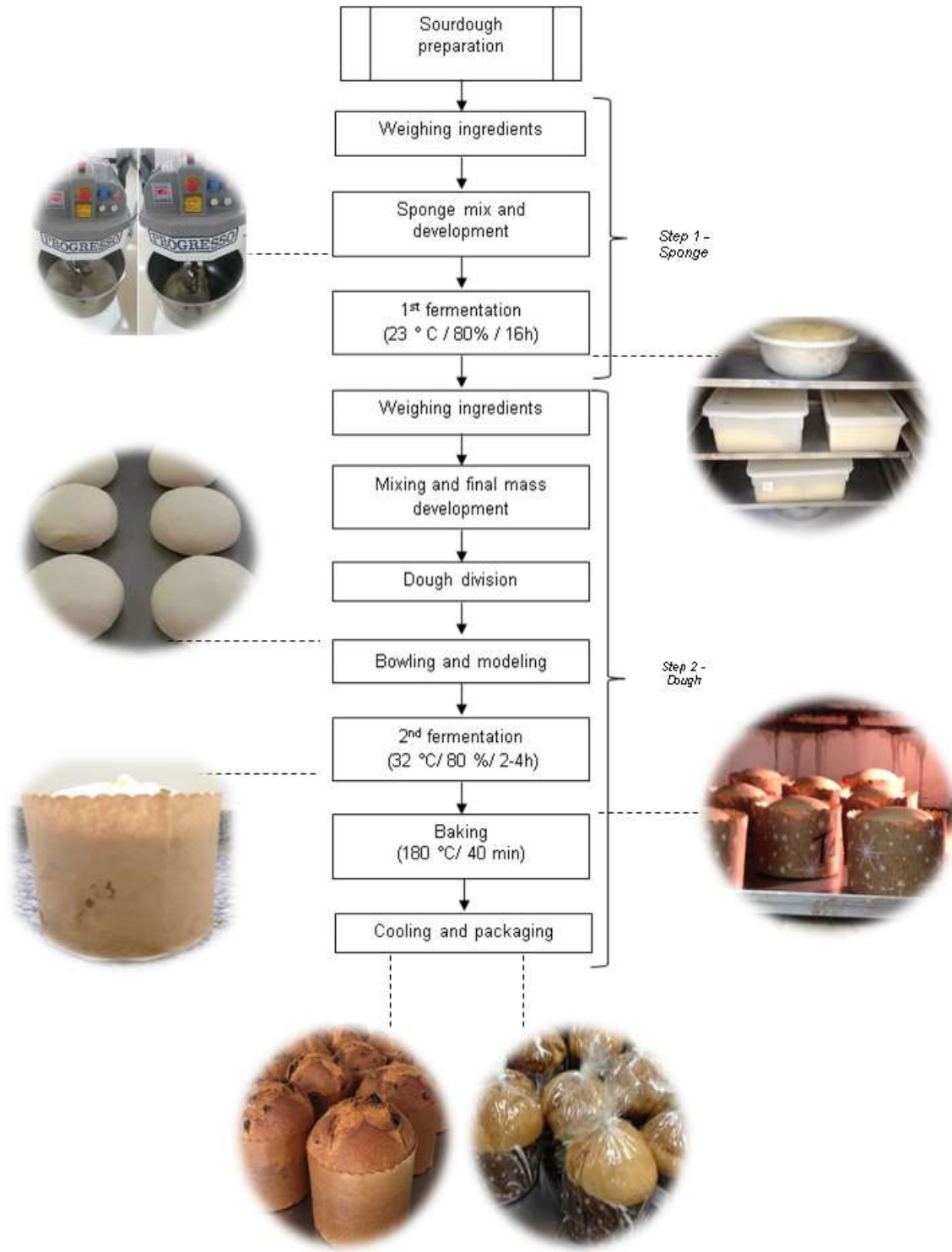


Figure 2



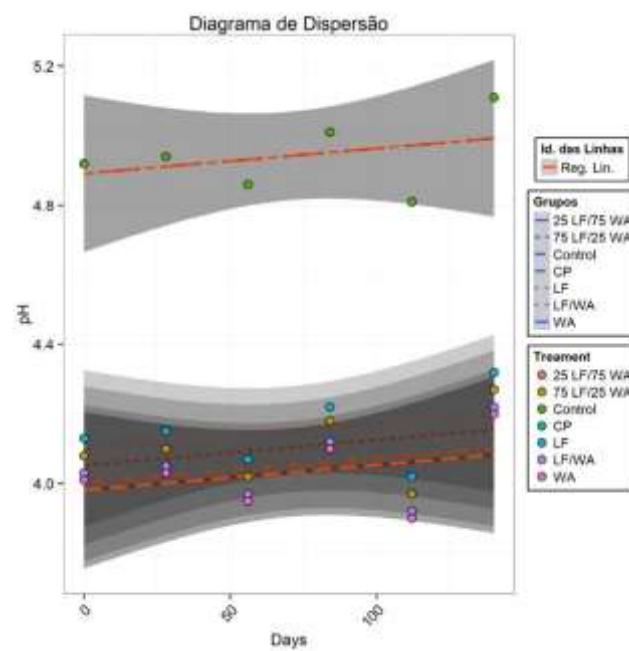
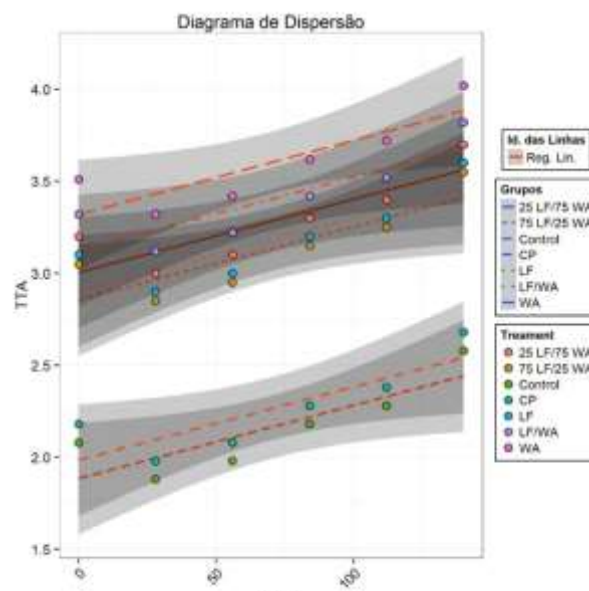
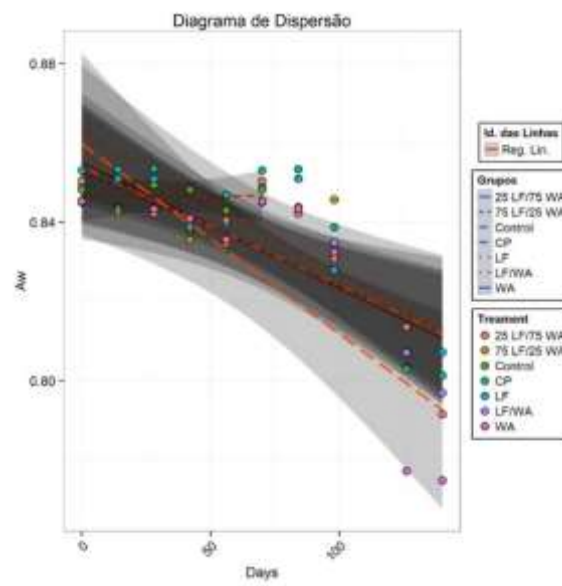
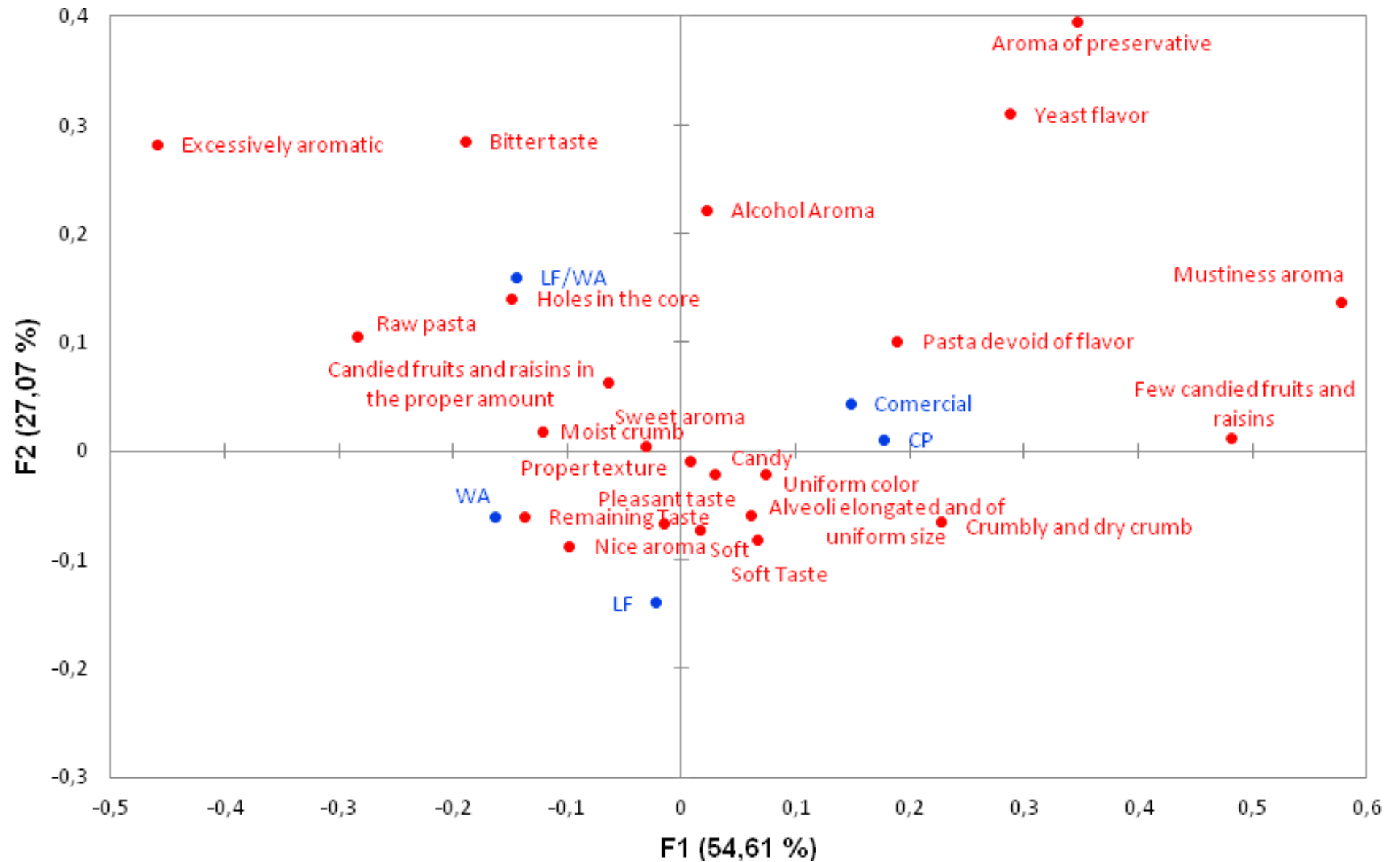
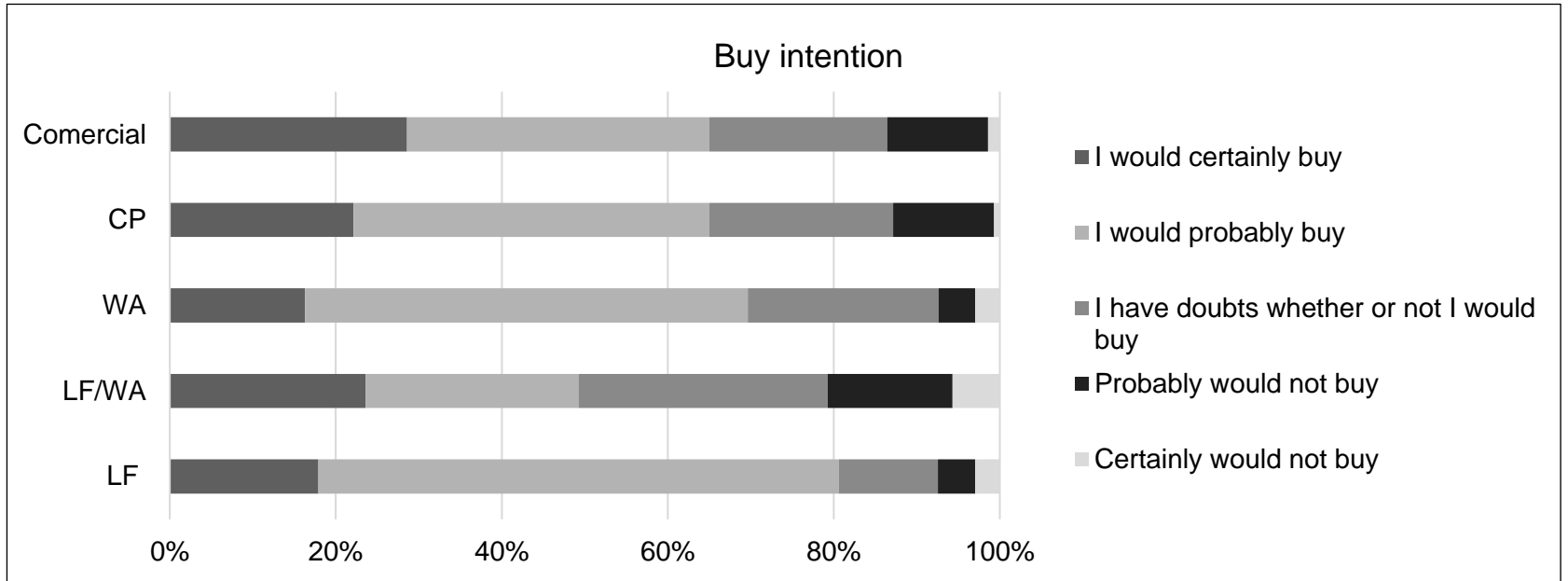


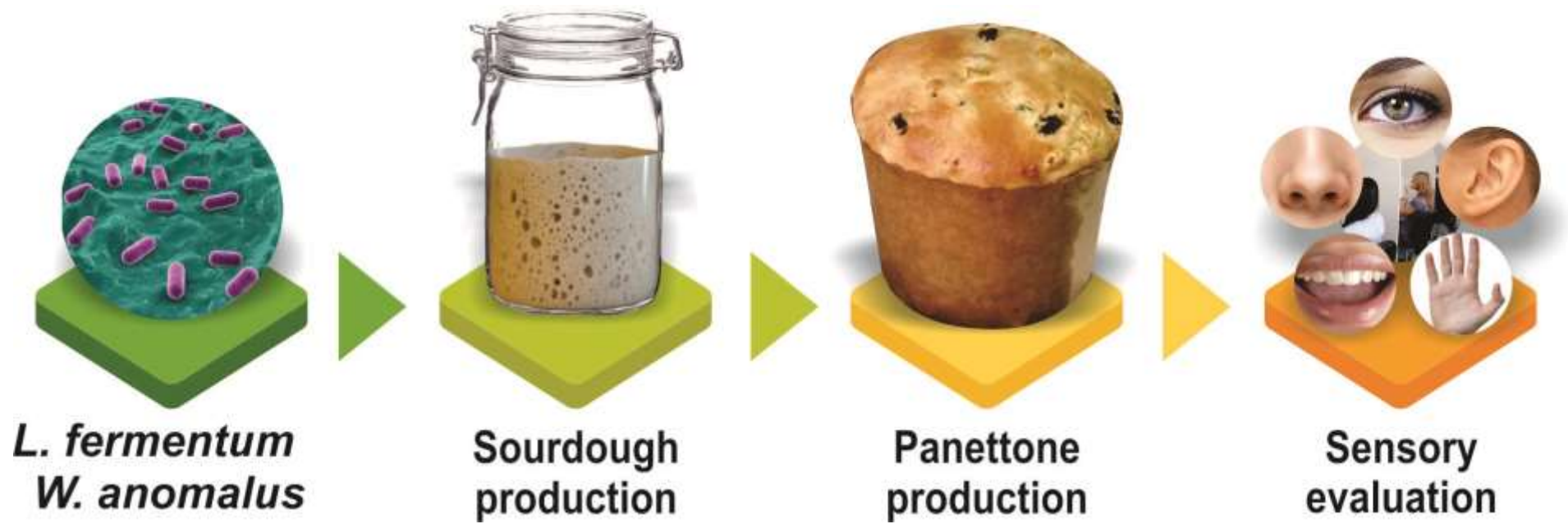
Figure 4







## Graphical Abstract



## 6 DISCUSSÃO GERAL

### 6.1 ELABORAÇÃO DO FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PREDOMINANTES

Durante o desenvolvimento do *sourdough* os micro-organismos se desenvolvem espontaneamente, e na sua maioria são oriundos da própria matéria-prima e em alguns casos da microbiota ambiental do local onde este fermento está sendo preparado (DE VUYST et al., 2014). O segundo artigo dessa tese objetivou estudar um fermento natural liofilizado e identificar os micro-organismos predominantes. Para a obtenção desse fermento natural liofilizado foi utilizado farinha de trigo refinada, farinha de trigo integral, extrato de malte e água. As amostras utilizadas para o isolamento e identificação dos micro-organismos foram as do fermento natural liofilizado, ou seja, na sua forma em pó. No entanto, outras análises microbiológicas foram realizadas para ajudar na discussão dos resultados. As análises compreenderam a enumeração de bactérias ácido lácticas e bolores e leveduras nas amostras de farinha de trigo refinada e farinha de trigo integral. A farinha de trigo integral apresentou valor ligeiramente superior (aproximadamente 2,5 ciclos log a mais) de leveduras (4,25 Log UFC/g) quando comparada com a farinha de trigo refinada (1,63 Log UFC/g). Porém a diferença observada para as contagens de bactérias ácido lácticas não diferiram em mais de 1 ciclo log, onde a farinha de trigo integral apresentou 3,41 Log UFC/g enquanto que a farinha de trigo refinada apresentou 2,90 Log UFC/g.

Conforme mencionado anteriormente a predominância das espécies depende fortemente das condições de preparo do fermento, do tipo de farinha e do ambiente do local de produção (HAMMES et al., 2005). Além de fornecer mais nutrientes para os micro-organismos durante a fermentação, a utilização de farinha de trigo integral pode ter sido um fator determinante da microbiota final do fermento natural liofilizado em vista que esse insumo foi utilizado no processo de propagação (DE VUYST et al., 2009).

Durante a preparação do *sourdough* foi possível observar a queda nos valores de pH (Tabela 1 – artigo 2) nos primeiros quatro dias de fabricação e o aumento progressivo e diretamente proporcional da acidez total titulável durante os 14 dias de fabricação (de 0,27 para 1,25). Esse comportamento resulta da produção de ácido

lático pelas BAL presentes no fermento natural (MINERVINI et al., 2012; VRANCKEN et al., 2011). Este fato ajuda a inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis e contribui para o desenvolvimento de características sensoriais do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004). Essa alteração de pH também foi observada por Minervini et al. (2012) e Vogelmann e Hertel (2011) que elaboraram *sourdough* para aplicar em pães tradicionais italianos com uma queda do pH após 12 horas de fabricação com valores entre 3,1 e 5,5.

Nos primeiros quatro dias de produção do fermento natural houve grande aumento no número de bactérias e de leveduras. Ao final dos 14 dias de fabricação as contagens microbiológicas de BAL e leveduras foram de 9,02 log UFC/g e 7,44 log UFC/g, respectivamente, ficando bem próximas aos valores reportados por Minervini et al. (2012) que encontraram 9,01 e 7,30 log UFC/g. De acordo com Belz et al. (2012), um fermento natural já pode ser considerado estável, sob o ponto de vista físico-químico e microbiológico, quando as contagens microbiológicas estiverem entre  $10^8$  UFC/g, com valores de pH ao redor de 3,90 e uma acidez total titulável de no máximo 14 mL como parâmetros de qualidade.

Os resultados da identificação molecular dos micro-organismos predominantes do *sourdough* liofilizado com diferentes concentrações de trealose estão descritos na Tabela 2 do artigo 2 da presente tese de doutorado. Foram analisadas as amostras de fermento natural liofilizado com 10% de trealose (SST10) e sem trealose (SS0). Três diferentes espécies de bactérias foram identificadas em amostras do fermento natural liofilizado, entre elas *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

Para a seleção das bactérias ácido lácticas foi usado o meio MRS não suplementado, e talvez por causa disso, alguns micro-organismos não puderam ser recuperados devido à incapacidade de se desenvolver em um meio mais simples. As espécies *L. fermentum* e *L. plantarum* conseguem se adaptar mesmo em ambientes com baixo pH, elevada acidez e pobres em nutrientes (VOGELMANN; HERTEL, 2011). Essas espécies toleram altos índices de ácido láctico (MINERVINI et al., 2012), que é principal ácido responsável pela acidez encontrada nos fermentos naturais, e dessa maneira tornaram-se dominantes no fermento natural liofilizado.

Em estudo de Lhomme et al. (2016) foram encontrados seis diferentes espécies identificadas como *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kimchi*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus hammesii* e *Lactobacillus*

*pentosus* a partir do sequenciamento do gene 16S de 520 isolados de *sourdoughs* franceses.

Como o processo de preparação do fermento natural foi afetado por parâmetros físico-químicos como pH e acidez (MINERVINI et al., 2012), as espécies heterofermentativas de bactérias ácido lácticas, ou seja, aquelas que além de ácido também liberam para o meio o gás carbônico (VRANCKEN et al., 2011), desempenharam um papel significativo na estabilidade microbiológica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não é muito tolerante em pH muito baixo e isso está relacionado com o fato da espécie *Wickerhamomyces anomalus* (também conhecida como *Pichia anomala*) ter se tornado dominante já que esta sim tolera altos níveis de acidez e pH baixos (VRANCKEN et al., 2011).

O crescimento e a multiplicação das leveduras estão bastante associados com as interações entre espécies de BAL homofermentativas e heterofermentativas (GOBBETTI et al., 1995). Fatores ecológicos também são importantes para a estabilidade e competitividade de associações microbianas entre BAL e levedura na produção de *sourdough* de forma espontânea (VOGELMANN; HERTEL, 2011). No entanto, a competição entre esses dois tipos de micro-organismos não é específica, como mostrado recentemente para algumas cepas de *Lb. sanfranciscensis* e *Lb. plantarum* (MINERVINI et al., 2011; SIRAGUSA et al., 2009). Um estudo realizado por Iacumin et al. (2009) confirmou que a presença de espécies de BAL heterofermentativas diminui a taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes pesquisadores observaram que onde *S. cerevisiae* estava presente o *Lb. plantarum* mostrou alta porcentagem de isolamento (IACUMIN et al., 2009). As BAL heterofermentativas utilizam o ácido láctico e glicose como substratos para produzir ácido acético (MARI et al., 2009) limitando o crescimento de enterobactérias e leveduras (ZOPPOLATTO et al., 2009).

Em uma investigação da composição microbiana de 21 fermentos artesanais envolvendo 11 diferentes padarias Belgas foi possível isolar 127 leveduras (VRANCKEN et al., 2010). As espécies dominantes foram *S. cerevisiae* e *W. anomalus* e *Candida glabrata*. A capacidade de assimilar maltose e a sacarose, que são os principais carboidratos da farinha, pode ser considerada como uma vantagem de *W. anomalus* e *S. cerevisiae*, levando à sua dominância em fermentações de laboratório (VRANCKEN et al. 2010). A ocorrência das leveduras *Kazachstania bulderi* (48% dos isolados) e *Candida humilis* (24%) foi verificada em *sourdough* francês, enquanto *S.*

*cerevisiae* representou menos de 0,2% dos isolados (LHOMME et al., 2016). Já no estudo de Perricone et al. (2014) as espécies *S. cerevisiae* e *Candida humilis* foram as dominantes. Diferentes combinações de leveduras (*Kazachstania unispora*, *S. cerevisiae*, *Candida krusei* e *C. glabrata*) foram detectadas em sourdough elaborado com centeio e fermentado a 30 °C, com base no sequenciamento parcial do gene 26S rRNA (BESSMELTSEVA et al., 2014).

## 6.2 VIABILIDADE CELULAR DE *Lactobacillus Fermentum* IAL 4541 E *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 À LIOFILIZAÇÃO

O artigo 3 dessa tese de doutorado estudou a viabilidade das cepas *L. fermentum* (IAL 4541) e *W. anomalus* (IAL 4533) após o processo de liofilização utilizando para isso diferentes soluções a fim de preservar o número de micro-organismos ao longo do tempo. Os resultados foram apresentados em formato de gráficos pela Figura 1 do referido artigo. Com base nos resultados, podemos observar que o processo de liofilização foi adequado para a conservação destas cepas mantendo elevados índices de viabilidade por um ano em temperatura ambiente.

Uma queda significativa na viabilidade celular de *L. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533 foi observada após a liofilização na maioria das condições. Tendo em vista os valores, em porcentagem, de viabilidade celular, obteve-se a maior taxa de sobrevivência (99,7%) quando se utilizou 10% de leite desnatado para a cepa *L. fermentum* IAL 4541. O efeito positivo do leite desnatado na sobrevivência celular está relacionado à formação de uma fina camada de proteína do leite sobre as proteínas da parede celular do micro-organismo (KING; SU, 1993). Após 12 meses, as cepas liofilizadas com a solução crioprotetora composta por 10% de leite desnatado e 5% de glutamato de sódio apresentaram taxa de viabilidade celular de 87,3% para *L. fermentum* IAL 4541 e 79,6% para *W. anomalus* IAL 4533. As cepas de *W. anomalus* IAL 4533 liofilizadas com 5% de trealose e armazenadas à temperatura ambiente mantiveram a viabilidade em torno de 71,7% após 12 meses, enquanto as cepas liofilizadas de *L. fermentum* IAL 4541 apresentaram apenas 6,7% de viabilidade após o mesmo período.

A liofilização proporciona maior viabilidade celular e é utilizada para a preservação, a longo prazo, de muitos micro-organismos (JARQUE; BITTNER; HILSCHEROVÁ, 2016). As condições de congelamento (taxa e duração do

congelamento) e a presença de crioprotetores (AMINE et al., 2014) são parâmetros importantes que se bem administrados podem aumentar a sobrevivência celular. Ainda assim, alguns tratamentos foram mais eficazes alcançando altas taxas de viabilidade celular ao longo do tempo. Isso pode ser explicado porque, durante o processo de secagem, mais especificamente a liofilização, as células sofrem estresse térmico que pode causar lesões na membrana, além da desnaturação proteica e danos irreversíveis ao DNA celular (BASHOLLI-SALIHU et al., 2014). Portanto, o processo de liofilização é uma etapa importante e se faz necessário adicionar soluções capazes de proteger as células dos micro-organismos durante o processo de secagem (BERK, 2013).

A proteção evidenciada pela trealose pode ser explicada devido sua capacidade de estabilização das proteínas (MORGAN et al., 2006). O efeito positivo demonstrado pela adição de leite desnatado pode ser explicado pela sua capacidade de fornecer uma camada de revestimento que protege as células dos micro-organismos durante a liofilização (ABADIAS et al., 2001). Os açúcares apresentam alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento em comparação com outros crioprotetores (HUBALEK, 2003), pois reduzem o ponto de congelamento e minimizam a formação de gelo intracelular (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Além disso, os componentes hidroxílicos das moléculas de açúcar têm a capacidade de proteger as células das lesões causadas pelo congelamento (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). O uso da trealose pode ser explicado pelo exposto acima, porém o mesmo não foi observado quando 10% de sacarose foi utilizada.

Os resultados mostraram que o congelamento sem o uso de crioprotetores (solução de água peptonada) afetou dramaticamente a sobrevivência das cepas testadas. O efeito positivo observado para leite desnatado e trealose na viabilidade das duas linhagens após o congelamento confirmou os resultados de estudos anteriores (STEPHAN; DA SILVA; BISUTTI, 2016). A trealose, quando usada sozinha ou em combinação com outros crioprotetores foi mais eficaz e apresentou taxa de sobrevivência entre 83% e 85% após a liofilização (ZAYED; ROOS, 2004). A viabilidade celular foi diretamente proporcional com as concentrações de trealose adicionada (de 0 até 30%) no estudo envolvendo a liofilização *Lactobacillus plantarum* (KEIVANI NAHR et al., 2015) e células de *Candida* (ABADIAS et al., 2001).

Brandão et al. (2013) estudaram quatro diferentes crioprotetores na liofilização de *Escherichia coli*. Quatro lotes foram produzidos usando solução de leite desnatado a 10% e a mesma solução contendo glicerol, sacarose e trealose. A estabilidade a longo prazo foi estudada a -70 °C, -20 °C, 4 °C, 25 °C e 35 °C durante cinco dias. A amostra contendo glicerol apresentou resultados de estabilidade insatisfatória ao final de cinco dias. As amostras contendo sacarose e trealose foram estáveis nas temperaturas estudadas e foram consideradas adequadas para a liofilização do micro-organismo em questão. Maltose (23%), trealose e sacarose foram utilizadas para aumentar a viabilidade de *Geotrichum candidum* após liofilização (Hamoudi et al., 2007).

### 6.3 PRODUÇÃO DE PANETONES A PARTIR DE *Lactobacillus Fermentum* IAL 4541 E *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 COMO STARTERS

Nos produtos de panificação, os atributos como textura, volume específico, cor e umidade são características fundamentais e são muito apreciadas pelos consumidores (VALCÁRCEL-YAMANI; LANNES, 2013). Os resultados de firmeza instrumental são apresentados na Tabela 3 do artigo 4, e os valores variaram de 3,27 a 6,87 N ao longo dos 140 dias. A maciez dos panetones elaborados com 100% de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 (LF) e 75% de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e 25% de *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 (75LF/25WA) não mostrou diferenças significativas ao longo do tempo. Já para os panetones elaborados com a levedura comercial e com propionato de cálcio (CP) e sem propionato de cálcio (Control) a maciez observada foi maior do que os outros tratamentos. No entanto, a partir dos 84 dias, os tratamentos CP e Control apresentaram os maiores valores de firmeza. Ao final do período de análise (140 dias) pode-se dizer que os panetones elaborados com *sourdough* nas proporções de 50% de *L. fermentum* IAL 4541 e 50% de *W. anomalus* IAL 4533 (LF/WA) e de 25% de *L. fermentum* IAL 4541 e 75% de *W. anomalus* IAL 4533 (25LF/75WA), foram os melhores tratamentos.

Em produtos com formulação complexa como panetone, a textura é afetada pelo teor de gordura e açúcar (BENEJAM; STEFFONALI; LEÓN, 2009). Comparando os resultados deste trabalho com o estudo citado acima, os panetones elaborados com *sourdough* se mostraram mais macios ao longo dos 140 dias de armazenamento com médias entre 5,04 e 6,09 N do que aqueles aos 6 dias de armazenamento em



temperatura ambiente (8N) do panetone produzido pelos outros pesquisadores. Em outro estudo, Valcárcel-Yamani e Lannes (2013) analisaram nove marcas de panetones comerciais e obtiveram valores de firmeza instrumental variando de 2,14 a 7,55 N.

Os resultados de volume específico, umidade e cor ( $L^*$ ;  $a^*$  e  $b^*$ ) estão descritos na Tabela 4 do artigo 4. Com relação ao volume específico, os valores obtidos foram próximos, com variação entre 2,88 a 3,25 cm<sup>3</sup>/g, e os menores valores foram obtidos nos ensaios com LF e no controle sem propionato de cálcio (Control). Esses resultados são provavelmente devido à maior produção de CO<sub>2</sub> durante a fase de fermentação (GERARDO-RODRÍGUEZ et al., 2017) e posterior expansão desses gases durante o forneamento, que ficaram aprisionados no interior da rede de glúten. O tratamento Controle, embora tenha sido elaborado somente com levedura comercial não obteve bom resultado de volume específico, ficando abaixo das expectativas. Os panetones elaborados com 100% de *W. anomalus* IAL 4533 apresentaram os maiores volumes. Isso pode ser explicado pelo fato desta levedura se adaptar com facilidade em um ecossistema *sourdough*, produzindo, conseqüentemente mais CO<sub>2</sub> (HEIDEMARIE et al., 2011).

Com base nos valores obtidos para a luminosidade ( $L^*$ ) representados na Tabela 4 do artigo em questão, e segundo estudo relatando o efeito da adição de *sourdough* na massa (TORRIERI et al., 2014), foi observado uma correlação entre os tratamentos utilizando *sourdough* e este parâmetro da cor. Todavia o tratamento que teve sua cor fortemente influenciada na fermentação foi o Controle ( $L^*$ : 74,90) discordando do estudo de Torrieri et al. (2014). Embora o tratamento controle tenha sido elaborado somente com levedura comercial, ele apresentou a cor mais escura do miolo, estando de acordo com estudo apresentado por Andrade (2017) que obteve os maiores valores de  $L^*$  para amostras elaboradas com levedura comercial seca. A presença de bastante açúcar na formulação dos panetones acelera a reação de Maillard, levando a um escurecimento progressivo da crosta e do miolo (BENEJAM; STEFFONALI; LEÓN, 2009; VALCÁRCEL-YAMANI; LANNES, 2013).

A umidade dos panetones foi avaliada e os valores não ultrapassaram os 30%, que é considerado o teor máximo de umidade permitido de acordo com as normativas brasileiras. Os panetones produzidos com *sourdough* mostraram umidade ligeiramente menor (23,90 a 25,31%) do que os panetones elaborados com levedura comercial (24,95 a 25,36%). Todavia ainda se assemelham com os valores

encontrados no estudo realizado por Valcárcel-Yamani e Lannes (2013) com panetones comerciais brasileiros (23,1 a 26,4%).

Quanto à atividade de água, durante os 140 dias de monitoramento ela se mostrou alta, favorecendo o crescimento de micro-organismos, especialmente bolores e leveduras, que se desenvolvem facilmente em meios com atividade de água acima de 0,7, justificando assim a necessidade do uso de conservantes para aumentar sua vida de prateleira (ZANQUI et al., 2014). No entanto, o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes não foi verificado nas amostras de panetones obtidos com *sourdough* e sem adição de conservantes artificiais. Esse fato demonstra claramente que o maior objetivo dessa tese foi atingida uma vez que a utilização de *sourdough* foi capaz de inibir o desenvolvimento de fungos indesejáveis.

Os dados que descrevem o crescimento microbiológico de bolores e leveduras nos panetones estão descritos na Tabela 5 do artigo 4. Os panetones controle (Control) alcançaram somente 56 dias de vida útil enquanto que os tratamentos LF/WA e WA mantiveram-se estáveis, sob o ponto de vista microbiológico, durante todo o período de monitoramento (> 126 dias). O tratamento com adição de conservante propionato de cálcio (CP) mofou após os 112 dias de armazenamento. Embora a faixa de atividade de água estivesse adequada para a suscetibilidade de fungos deteriorantes (ZANQUI et al., 2014), a vida útil dos panetones com *sourdough* elaborados sem conservantes artificiais estendeu-se por 126 dias e isso pode ser atribuído a uma grande variedade de ácidos orgânicos e metabólitos de baixo peso molecular produzidos durante o processo de fermentação (HASSAN et al., 2015).

Através do teste Check-All-That-Apply (CATA) e com base na opinião dos participantes da pesquisa foi possível distinguir as diferenças sensoriais entre os tratamentos utilizando os *sourdoughs* e os tratamentos envolvendo a levedura comercial em sua formulação, pois estes últimos estão no mesmo quadrante da figura 4 do artigo 4. A mistura das cepas *Lb. fermentum* IAL 4541 e da *W. anomalus* IAL 4533, na proporção de 50% cada, apresentou as mesmas características, na opinião dos participantes, e os pontos, quando plotados no gráfico da CATA ficaram no mesmo quadrante. Já os tratamentos envolvendo 100% de cada micro-organismos separado (WA e LF) foram caracterizados por outros atributos sensoriais ficando separados, mas em outro quadrante da Figura 4. Foi possível observar que o termo aroma de conservante foi bastante descrito para as amostras de panetones elaborados com levedura comercial (CP) e panetones comerciais.

Panetones artesanais elaborados com *sourdough* são genuinamente mais aromáticos que os panetones elaborados com levedura comercial porque apresentam mais concentração de compostos precursores de odor e sabor (TORRIERI et al., 2014). Considerando que pelo teste de aceitação, os panetones elaborados com *sourdough* receberam notas equivalentes a “gostei moderadamente” na escala utilizada confirmando dessa maneira que a sua utilização não interfere na aceitabilidade.

As boas avaliações para os atributos odor e sabor podem estar relacionados com as propriedades dos exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelas bactérias do ácido láctico (TORRIERI et al., 2014). Esses EPS agem como bio-espessantes ou hidrocolóides que estabilizam as propriedades reológicas da massa melhorando sabor, odor e textura, além de garantir um prazo de validade prolongado (TIEKING; GÄNZLE, 2005).

A partir dos resultados apresentados no teste de intenção de compra pode-se verificar que os consumidores expressaram atitude positiva perante aos panetones elaborados com *sourdough*. Ao contrário do pão, o panetone é um produto que mantém a sua qualidade durante o armazenamento podendo ser consumido após um longo período, podendo chegar a até 6 meses. Durante o armazenamento, ocorrem transformações no produto, chamadas de “maturação aparente”, que ajudam a acentuar o sabor do produto e, nesse sentido, pode favorecer a qualidade sensorial do produto final (VALCÁRCEL-YAMANI; LANNES, 2013).

De maneira geral, as pessoas sempre procuram ou aceitam melhor os alimentos preparados a partir de ingredientes tradicionalmente estabelecidos e próximos aos seus hábitos alimentares, uma vez que, o comportamento alimentar é influenciado por fatores ambientais, biológicos, ecológicos e socioculturais. No entanto, as características sensoriais e culturais, tais como sabor, satisfação e conveniência, também podem interferir para a escolha do alimento e até mesmo aumentar as razões nutricionais para a escolha de um alimento em particular (BARKER et al., 1995).



## 7 CONCLUSÃO GERAL

Considerando o preparo do fermento natural liofilizado, nos ensaios de isolamento e identificação por métodos moleculares, as espécies predominantes de leveduras foram *Saccharomyces cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus*, enquanto que *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* foram as principais espécies de bactérias.

A trealose demonstrou ser eficiente na proteção e manutenção das células de *Lb. fermentum* IAL 4541 e *W. anomalus* IAL 4533, assim como a mistura com 10% de leite em pó desnatado e 5% de glutamato de sódio apresentaram as maiores taxas de viabilidade após 365 dias para as duas cepas analisadas. Por se tratar de leite em pó reconstituído, esta matriz, quando comparada com a trealose, é um produto relativamente mais barato e economicamente mais vantajoso. Os resultados deste trabalho demonstraram as possibilidades de conservação e manutenção dessas cepas à temperatura ambiente por 1 ano, reduzindo ainda os custos de refrigeração e transporte.

A definição da formulação mais adequada a partir dos micro-organismos selecionados foi bastante dispendiosa, porém os panetones elaborados apresentaram boa qualidade tecnológica e bom nível de aceitação pelos consumidores, respeitando os padrões de identidade e qualidade da legislação brasileira no que concerne a limites máximos de umidade e acidez total titulável. Com relação à análise de firmeza instrumental, os panetones elaborados com as cepas selecionadas tiveram sua maciez menos afetada durante o tempo de armazenamento do que os panetones elaborados com levedura comercial. A utilização de *Lb. fermentum* IAL 4541 e de *W. anomalus* IAL 4533 proporcionou aumento da vida útil quando comparada aos demais panetones controles elaborados com levedura comercial. O tratamento envolvendo a utilização de 50% de *Lb. fermentum* IAL 4541 e de 50% de *W. anomalus* IAL 4533 e o com 100% de *W. anomalus* IAL 4533 comprovaram possuir ação antifúngica por terem sido os únicos panetones que não mofaram após 126 dias de monitoramento.

A utilização de *sourdough* na formulação dos panetones apresentou boa aceitação em relação ao atributo sabor. De acordo com o teste check-all-that-apply (CATA) houve uma nítida separação entre as amostras mostrando que os panetones elaborados somente com *Lb. fermentum* IAL 4541 e somente com de *W. anomalus* IAL 4533 se distinguiram sensorialmente, do elaborado com a mistura destes micro-

organismos, assim como os panetones elaborados com propionato de cálcio e daquele adquirido no comércio local.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desta pesquisa possibilitou um maior entendimento sobre isolamento e conservação de micro-organismos com potencial do uso como *starters* e de como pode ser vantajoso o uso de *sourdough* produzido a partir de cepas selecionadas e capazes de imprimir características de estabilidade à fungos, para a elaboração de panetones com maior vida útil, sem a adição de conservantes químicos. Além do mais, panetones mais naturais e sem conservantes podem ser mais atrativos para os consumidores do que os tradicionalmente comercializados. Portanto, a utilização de *sourdough* no preparo de panetones a partir de cepas selecionadas e sem adição de conservantes artificiais, mostra-se como uma alternativa mais natural e promissora tendo em vista que foi bem aceito sensorialmente com notas equivalendo a “gostei moderadamente”.

A presente pesquisa agregou conhecimentos científicos para a comunidade acadêmica, gerando um trabalho de revisão bibliográfica sobre bioconservação e três artigos científicos explorando o uso de *sourdough* e seus aspectos físico-químicos, tecnológicos, microbiológicos e sensoriais em panetones artesanais.





## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em decorrência da estabilidade dos panetones elaborados a partir das cepas de *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 e *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533, seria de grande relevância investigar quais compostos produzidos por estes microorganismos apresentaram ação conservante. Um estudo, através de técnicas moleculares, da dinâmica da população microbiana e acompanhamento da produção e acúmulo de compostos voláteis e ácidos orgânicos durante as etapas de produção do *sourdough* e do panetone com cepas selecionadas poderá ser bastante esclarecedor para justificar a estabilidade destes produtos.

Em virtude da maior vida-útil dos panetones contendo os sourdoughs produzidos com as cepas selecionadas, também seria interessante desafiar (através de “*challenge tests*”) este produto através de inoculações de espécies de fungos deteriorantes isolados de panetone, avaliando sua estabilidade e comparando com formulações convencionais.



## REFERÊNCIAS

ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIAS, I.; Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*.

**International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 3, p.173–182, May 2001.

ALVARENGA, V. O. **Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar**. 2008. 228 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of analysis**: method 76-3301 - damaged starch-amperometric method by SDmatic.11. ed. St. Paul, MN, EUA, 10 outubro de 2007.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Approved methods of analysis**. 11. ed. St. Paul, 2010. Disponível em <<http://methods.aaccnet.org/toc.aspx>>. Acesso em: 11 abril de 2018.

AMINE, K. M.; CHAMPAGNE, C. P.; SALMIERI, S.; BRITTEN, M.; St-GELAIS, D.; FUSTIER, P.; LACROIX, M. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 111–117, Abril 2014.

ANDRADE, S. **Produção de fermento natural a partir do substrato da batata (*Solanum tuberosum*) e caldo de cana (*Saccharum officinarum*)**. 2017. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, 2017.

ANJUM, F. M.; PASHA, I.; GHAFOR, K.; ISSA KHAN, M.; ALI RAZA, M. Preparation of sourdough bread using a blend of bacterial culture and baker's yeast. **Nutrition & Food Science**, v. 38, n. 2, p. 146 – 153, 2008.

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

ASADZADEH, J.; TEYMORI, R.; GHAZANFARIRAD, N.; FAKHERNIA, M.; HAGHIGHAT-AFSHAR, N.; BLOUKI, M.; KHEIRI, A.; HASSANZADAZAR, H.; BAHMANI, M. Fungal contamination of produced wheat flour in West Azerbaijan, northwest of Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2 p. S836–S839, Set. 2014.

BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M. M.; BO, L.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 139-150, Set. 2007.

BAILEY, C. P.; VON HOLY, A. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. **Food Microbiology**, v.10, n. 4, p. 287-294, Aug. 1993.

BARKER, M. E.; THOMPSON, K. A.; MCCLEAN, S. I. Attitudinal dimensions of food choice and nutrient intake. **The British Journal of Nutrition**, v. 74, n. 5, p. 649–59, Nov. 1995.

BATISH, V. K.; LAL, R.; GROVER, S. Effect of nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* biovar. *Diacetylactis*. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 45, p. 74-76, 1990.

BATISH, V. K.; ROY, U.; LAL, R.; GROVER, S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 209–225, 1997.

BELZ, M. C. E.; MAIRINGER, R.; ZANNINI, E.; RYAN, L. A. M.; CASHMAN, K. D.; ARENDT, E. K. The effect of *sourdough* and calcium propionate on the microbial shelf life of salt reduced bread. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 493-501, Oct. 2012.

BENEJAM, W.; STEFFOLANI, M. E.; LEÓN, A. E. Use of enzyme to improve the technological quality of a panettone like baked product. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 2431- 2437, Nov. 2009.

BESMELTSEVA, M.; VIIARD, E.; SIMM, J.; PAALME, T.; SARAND, I. Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. 1–12, Apr. 2014.

BIRO, D.; JURACEK, M.; KACANIOVA, M.; SIMKO, M.; GALIK, B.; MICHALKOVA, J.; GYONGYOVA, E. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 16, p. 227– 232, 2009.

BLACKBURN, C. **Food Spoilage Microorganisms**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, Apr., 4 2006. 763p.

BRANDÃO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; COSTA, J. C. B.; MEDEIROS, V. M.; WARNKEN, M. B. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: *estafilococos* coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. **Revista Analytica**, v. 63, p. 60-71, fev./mar. 2013.

BRANDÃO M.L.L.; ROSAS C.D.O.; BRICIO, S.M.L.; DA COSTA, J.D.C.B.; MEDEIROS, V.D.M.; WARNKEN, M.B.; DE LA CRUZ, M.H.C.; NOBREGA, A.W. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 2, p. 124–130, 2013.

BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Einfluß von Fructosanen auf die Sauerteigfermentation. **Getreide Mehl und Brot**, v. 55, p. 341-345, 2001.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº 383, de 05 de agosto de 1999. Aprova o Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 7- Produtos de Panificação e Biscoitos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 ago.1999. 22p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. Regulamento técnico do trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 29, p. 2, 1 dez. 2010. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. **ANVISA**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 out. 2000. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2000/90\\_00rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2000/90_00rdc.htm)>. Acesso em: 23 de abril de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 11 de abril de 2018.

BASHOLLI-SALIHU, M.; MUELLER, M.; SALAR-BEHZADI, S.; UNGER, F. M.; VIERNSTEIN, H. Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. **LWT - Food Science and Technology**, v.57, n. 1, p. 276–282, Jun. 2014.

CANELLA-RAWLS, S. **Pão: arte e ciência**. 2. ed. São Paulo: Editora Senac, 2006. 320p.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, Feb. 2002.

CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de “leite” de soja enriquecido com cálcio. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 86-91, jan./mar. 2005.

CAUVAIN, S. P., YOUNG, L. S. Bread Spoilage and Staling. In: **Technology of Breadmaking**, 2. ed. New York: Springer International Publishing, 2007. p. 272-292.

CAUVAIN, STANLEY P.; YOUNG, LINDA S. **Tecnologia da Panificação**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2009. 418 p.

CHAUDHARY, M.S. Baking industry in Pakistan. **Food Science News**, v. 1, p. 1-4, 1991.

CHEHRI, K.; SALLEH, B.; YLI-MATTILA, T.; SOLEIMANI, M. S.; YOUSEFI, A. R. Occurrence, pathogenicity and distribution of *Fusarium* spp. in stored wheat seeds

Kermanshah Province, Iranian. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 24, p. 1178–1186, Dec. 2010.

CHEN, Q.; MA, E.; BEHAR, K. L.; XU, T.; HADDAD, G. G. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3274–3279, Feb. 2002.

CIZEIKIENE, D.; JUODEIKIEN, G.; PASKEVICIUS, A.; BARTKIENE, E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, v. 31, n.2, p. 539-545, June 2013.

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; NIGRO, F.; DE ANGELIS, M.; ARNAULT, P.; GOBBETTI, M. Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and *sourdough* lactic acid bacteria during bread storage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n. 23, p.7391–7398, Dec. 2008.

CODA, R.; NIONELLI, L.; RIZZELLO, C. G.; DE ANGELIS, M.; TOSSUT, P.; GOBBETTI, M. Spelt and emmer flours: characterization of the lactic acid bacteria microbiota and selection of mixed starters for bread making. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 925-935, Feb. 2010.

CODA, R.; CASSONE, A.; RIZZELLO, C. G.; NIONELLI, L.; CARDINALI, G.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during *sourdough* fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3484-3492, Mar. 2011.

COLLINS, N. E.; KIRSCHNER, L. M.; VON HOLY, A. Characterization of *Bacillus* isolated from rOPY bread, bakery equipment and raw materials. **South African Journal of Science**, v. 87, n. 1-2, p. 62-66, Jan.1991.

COOK, F. K.; JOHNSON, B. L. **Microbiological Spoilage of Cereal Products - Compendium of the Microbiological Spoilage of Food and Beverages**. 1. ed. New York: Springer. 2009. p. 223-244.

CORNEA, C. P.; CIUCĂ, M.; VOAIDES, C.; GAGIU, V.; POP, A. Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: A molecular approach. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 1, p. 5863–5871, Jan. 2011.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. *Sourdough* lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 347-351, Mar.,1998.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Antimould activity of *sourdough* lactic acid bacteria : identi® cation of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 253–256, Aug.,1998.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. *Lactobacilli* in *sourdough* fermentation: A review. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 539-558, June 2007.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; GARCIA, N.; VINAS, I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 793-800, Nov. 2000.

DAGNAS, S.; MEMBRÉ, J. M. Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products-995 Review. **Journal of Food Protection**, v. 76, n.3, p. 538-551, Mar. 2013.

DAGNAS, S.; ONNO, B.; MEMBRÉ, J. M. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 95–104, Sep. 2014.

DAL BELLO, F.; CLARKE, C.I.; RYAN, L.A.M.; ULMER, H.; SCHOBBER, T.J.; STROM, K.; SJORGREN, J.; VAN SINDEREN, D.; SCHNURER, J.; ARENDT, E.K. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. **Journal of Cereal Science**, v.45, n. 3, p. 309–318, May 2007.

DAVIDSON, M. P. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, I. J. (Eds.). **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington: ASM press, 2001. p. 385–392.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, Apr. 1960.

DE VUYST, L.; VRANCKEN, G.; RAVYTS, F.; RIMAUX, T.; WECKX, S. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. **Food Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 666–675, July 2009.

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

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 370–380, 2010.

DIANAWATI, D.; SHAH, N. P. Enzyme stability of microencapsulated Bifidobacterium animalis ssp. lactis Bb12 after freeze drying and during storage in low water activity at room temperature. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M463-M471, Aug. 2011.

EDEMA, M. O. A Modified *Sourdough* Procedure for Non-Wheat Bread from Maize Meal. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 7, p. 1264-1272, 2011.

EFFAT, B. A.; IBRAHIM, G. A.; TAWFIK, N. F.; SHARAF, O. M. Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. **Egyptian Journal of Dairy Sciences**, v. 29, p. 251-262, 2001.

EGLEZOS, S. Microbiological quality of wheat grain and flour from two mills in Queensland, Australia. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1533–1536, Aug. 2010.

FAZELI, M. R. SHAHVERDI, A. R.; SEDAGHAT, B.; JAMALIFAR, H.; SAMADI, N. Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent anti-mould preservative of a traditional Iranian bread. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 554–556, May 2004.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 85–102, Nov. 1996.

GALVEZ, A.; LUCAS-LOPEZ, R.; ABRIOUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, n. 2, p.125-152, 2008.

GARCIA, E. A.; MOLINO, A de B.; BERTO, D. A.; PELÍCIA, K.; OSERA, R.; H.; FAITARONE, A. B. G. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com semente de urucum (*Bixa orellana* L.) moída na dieta. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 689-697, dez. 2009.

GAROFALO, C.; SILVESTRI, G.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. PCR-DGGE Analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of panettone. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 243-254, Feb. 2008.

GAROFALO, C.; ZANNINI, E.; AQUILANTI, L.; SILVESTRI, G.; FIERRO, O.; PICARIELLO, G.; CLEMENTI, F. Selection of *sourdough* lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7719-7728, July 2012.

GERARDO-RODRÍGUEZ, J. E.; RAMÍREZ-WONG, B.; LEDESMA-OSUNA, A. I.; MEDINA-RODRÍGUEZ, C. L.; ORTEGA-RAMÍREZ, R.; SILVAS-GARCÍA, M. I. Management of freezing rate and trehalose concentration to improve frozen dough properties and bread quality. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, jan./mar. 2017.

GEREZ, L. C.; TORINO, I. M.; ROLLAN, G.; DE VALDEZ, F. G. Prevention of Bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 144-148, Feb. 2009.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.



**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 3, p. 229-233, mai./jun. 2004.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose-negative strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 939–944, Mar. 1995.

GOBBETTI, M. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts in sourdoughs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 7, p. 267–274, July 1998.

GOBBETTI, M.; GÄNZLE, M. G. *Sourdough* applications for bread production: industrial perspectives. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 149, 2007.

GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M. How the *sourdough* may affect the functional features of leavened baked goods. **Food Microbiology**, v.37, p. 30-40, Feb., 2014.

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

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, n. 1, p.51–64, Nov., 1996.

HALIM, N.I.A.; PHANG, I.C. Salicylic acid mitigates pb stress in *Nicotiana tabacum*. **Science Heritage Journal**, v. 1, n. 1, p. 16–19, Jan. 2017.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALM, M.; OSEI-YAW, A.; HAYFORD, A. E.; KPODO, K. A.; AMOA- AWUA, W.K.A. Experiences with the use of starter culture in the fermentation of maize for 'kenkey' production in Ghana. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 531–536, Sep. 1996.

HAMMES, W.P.; GÄNZLE, M.G. *Sourdough* breads and related products. In: WOOD, B. J. B. 2nd ed. **Microbiology of Fermented Foods**, vol. 1. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 199–216.

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, n. 1-3, p. 4-11, Jan./Mar. 2005.

HAMOUDI, L.; GOULET, J.; RATTI, C. Effect of Protective Agents on the Viability of *Geotrichum candidum* during Freeze-Drying and Storage. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 45-49, Mar. 2007

HANSEN, A.; HANSEN, B. Flavour of *sourdough* wheat bread crumb. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 202, n. 3, p. 244-249, May 1996.

HASSAN, Y. I.; BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* against *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* in a liquid culture setting. **Journal of Food Protection**, v.71, n. 11, p. 2213– 2216, Nov. 2008.

HASSAN, Y. I.; ZHOU, T.; BULLERMAN, L. B. Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxincontrolling agents. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 1, p. 79-90, Jan. 2015.

HEIDE-MARIE, D.; MOONS, M.-C.; HURET, S.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 63–73. Jan. 2011.

HOSENEY, R.C, **Principios de ciencia y tecnologia de los cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991. 321 p.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205-229, June 2003.

HUANG, L.; LU, Z.; YUAN, Y.; LÜ, F.; BIE, X. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 55-61, Jan. 2006.

IACUMIN, L.; CECCHINI, F.; MANZANO, M.; OSUALDINI, M.; BOSCOLO, D.; ORLIC, S.; COMI, G. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 128–135, Nov. 2009.

INCQS. Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 3º Rodada Contagem de Bactérias Mesófilas Matriz Leite em Pó Rodada EP MIB03/11. Relatório final. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2012a. 22p.

INCQS. Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 4º Rodada Contagem de *Bacillus cereus* Matriz Leite em Pó Rodada EP MIB04/11. Relatório final. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2012b. 22p.

INDÚSTRIA de Panetones Vai Gerar Mais de R\$ 500 Mi. **Revista DataMark – Market Intelligence Brazil**, 13 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.datamark.com.br/noticias/2017/12/industria-de-panetones-vai-gerar-mais-de-r-500-mi-237745/>>. Acesso em: 23 abr 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008. v.1, p. 25-26.

JARQUE, S.; BITTNER, M.; HILSCHEROVÁ, K. Freeze-drying as suitable method to achieve ready-to-use yeast biosensors for androgenic and estrogenic compounds. **Chemosphere**, v. 148, p. 204–210, Apr. 2016.

KANDLER, O.; WEISS, N. Lactobacillus. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S. SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's of systematic bacteriology**. 2 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1029-1234.

KATINA, K.; HEINIO, R. L.; AUTIO, K.; POUTANEN, K. Optimization of *sourdough* process for improved sensory profile and texture of wheat bread. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1189-1202, Dec. 2006.

KEIVANI NAHR, F.; MOKARRAM, R. R.; HEJAZI, M. A.; GHANBARZADEH, B.; SOWTI KHIYABANI, M.; ZOROUFCHI BENIS, K. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried Lactobacillus plantarum using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 326–332. Nov. 2015.

LAI, H. M.; LIN, T. C. Bakery products. In: HUI, Y. H. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: CRC Press. 2006. p.1-52.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the *sourdough Lactobacillus plantarum* Strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n. 9, p. 4084-4090, Sep. 2000.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against moulds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.634–640, Jan. 2003.

LEGAN, J. D.; VOYSEY, P. A. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, n. 5, p.361-371, May 1991.

LEGAN, J. D. Moulds spoilage of bread: the problem and some solutions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, n. 1-3, p.33-53, 1993.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, Oct. 1995.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, Feb. 2004.

LHOMME, E.; ORAIN, S.; COURCOUX, P.; ONNO, B.; DOUSSET, X. The predominance of Lactobacillus sanfranciscensis in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, n. 20, p. 40–48, Nov. 2015.

LHOMME, E.; LATTANZI, A.; DOUSSET, X.; MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; LACAZE, G.; ONNO, B.; GOBBETTI, M. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, n. 23, p. 11-170, Dec. 2015.

LHOMME, E.; URIEN, C.; LEGRAND, J.; DOUSSET, X.; ONNO, B.; SICARD, D. Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. **Food Microbiology**, v. 53, pt. A, p. 41–50, Feb. 2016.

LIN, D. D.; CHEN, T. C. Relative antifungal efficacies of phosphoric acid and other compounds on fungi isolated from poultry feed. **Animal feed science technology**, v. 54, n. 1-4, p. 217–226, Aug. 1995.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115-131, June 2003.

LORENZ, K.; BRUMMER, J. M. Preferments and sourdoughs in German breads. In: KULP, K.; LORENZ, K. **Handbook of dough fermentations**. New York: Marcel Dekker Inc. 2003. pp. 247-267.

MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROOS, S.; SJÖGREN, J.; SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 129–135, Feb. 2003.

MARI, L. J.; SCHMIDT, R. J.; NUSSIO, L. G.; HALLADA, C. M.; KUNG JR., L. Short communication: An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1174-1176, Mar. 2009.

MARIN, S.; GUYNOT, M.E.; NEIRA, P.; BERNADO, M.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 203-211, Dec. 2002.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 2008. 255p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.

MEROTH, C.; WALTER, J.; HERTEL, C.; BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p.475–482, Jan. 2003.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from *sourdoughs* - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 31–43, Jan. 2002.

MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; PINTO, D.; SIRAGUSA, S.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters

during daily propagation of wheat flour *sourdough* type I. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 897-908, Oct. 2010.

MINERVINI, F.; PINTO, D.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Scouting the application of *sourdough* to frozen dough Bread technology. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 3, p. 296-304, Nov. 2011.

MINERVINI, F.; DI CAGNO, R.; LATANZZI, A.; DE ANGELIS, M.; ANTONIELLI, L.; CARDINALI, G.; CAPPELLE, S.; GOBBETTI, M. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1251-1264, Feb. 2012.

MINOLTA. **Precise color communication: color control form feeling to instrumentation**. Osaka: Minolta Camera Co. Ltd., 1993. 49p.

MONTANARI, C.; BARGOSSO, E.; LANCIOTTI, R.; CHINNICI, F.; GARDINI, F.; TABANELLI, G. Effects of two different sourdoughs on the characteristics of Pandoro, a typical Italian sweet leavened baked good. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 289–299, Nov. 2014.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183-93, Aug. 2006.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington DC: ASM Press, 2003. 2113p.

NAKHCHIAN, H.; TABATABAEI, F.; MORTAZAVI, S. A.; MOHEBBI, M. Isolation, Identification and Growth's Comparison of Molds Types in a Cake. Factory Environment and Final Products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 2505– 2517, Aug. 2014.

NIELSEN, P. V.; DE BOER, E. Food preservatives against fungi. In SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-and airborne fungi**. Utrecht: Central Bureau voor Schimmelcultures, 2000. p. 357–363.

NIELSEN, P.V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 219-229, Sep. 2000.

NIELSEN, P. V. Packaging, quality control, and sanitation of bakery products. In HUI, Y. H.; TOLDRA, T.; NIP, W. K. **Handbook of fermented food and beverage**. New York: Marcel Dekker Inc. 2003. p. 783-797.

OLIVEIRA, G. R. O.; SANTOS, J. T. S.; CAMPOS, A. F. P.; NUNES, T. P.; RUSSO, S. L.; OLIVEIRA, A. M. Prospecção tecnológica: processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 1, p. 92-102, 2012.

OLIVER, A. E.; HINCHA, D. K.; CROWE, J. H. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. **Comparative Biochemistry Physiology Part A**, v. 131, n. 3, p. 515-525, Mar. 2002.

OTTOGALLI, G.; GALLI, A.; FOSCHINO, R. Italian bakery products obtained with *sourdough*: characterization of the typical microflora. **Advances in Food Science**, v. 18, p. 131-144, Feb.1996.

PARAMITHIOTIS, S.; CHOULIARAS, Y.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2813–2819, July 2005.

PATERAS, I. M. C. Bread spoilage and staling. In: CAUVAIN, S.P.; YOUNG, L.S. (Eds.), **Technology of Breadmaking**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 240-261.

PERRICONE, M.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. **Food Microbiology**, v. 38, p. 26–35, Apr. 2014.

PERTUZATTI, P. B.; ESTEVES, S. M. R.; ALVES, J. E.; LIMA, L. C.; BORGES, J. E. Sensory Evaluation of Bakery and Confectionery Products Prepared through Semi-Industrial and Artisanal Processes. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4A, p. 32–36, Oct. 2015.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Le Lait**, v. 71, n. 5, p. 525-541, June 1991.

PICOZZI, C.; ANCHISE, F. D; FOSCHINO, R. PCR detection of *Lactobacillus sanfranciscensis* in sourdough and Panettone baked product. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3-4, p. 330–335, Feb. 2006.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. Berlím: Springer, 2009. 519 p.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; MANTZOURANI, I.; KOUTINAS, A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Application of novel starter culture for *sourdough* bread production. **Anaerobe**, v. 17, n. 3, p. 486-489, Dec. 2011.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; BEKATOROU, A.; BEZIRTZOGLU, E. Kefir immobilized on corn grains as biocatalyst for lactic acid fermentation and *sourdough* bread making. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 12, p. 1256-1262, Dec. 2012.

RIZZELLO, C. G.; CASSONE, A.; CODA, R.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *sourdough* fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. **Food Chemistry**, v.127, n. 3, p. 952–959, Aug. 2011.

ROCKEN, W. Applied aspects of *sourdough* fermentation. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.18, p. 212–216, 1996.

ROSAS, C. O.; BRANDAO, M. L. L.; BRICIO, S. M. L.; MEDEIROS, V. M.; BERNARDO, S. P. C.; DE LA CRUZ, M. H. C.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de Material de Referência em Microbiologia de Alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.1, p. 15-22, 2010.

ROSENKVIST, H.; HANSEN, A. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 353–363, Aug. 1995.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 3-16, Nov. 2002.

ROY, U.; BATISH, V. K.; GROVER, S.; NEELAKANTAN, S. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, n. 1-2, p. 27–34, Nov. 1996.

RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 274–278, July 2008.

RYAN, L. A. M.; ZANNINI, E.; DAL BELLO, F.; PAWLOWSKA, A.; KOEHLER, P.; ARENDT, E. K. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel foodgrade antifungal agent for bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v.146, n. 3, p. 276–283, Apr. 2011.

SADEGHI, A. The Secrets of Sourdough; A review of miraculus potentials of sourdough in bread shelf life. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 7, n. 3, p. 413–417, Mar. 2008.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; DE LA RUE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; ALVES, S. H. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamyospores production for livestock use. **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 1-4, p. 344-346, Oct. 2009.

SATHE, S. J.; NAWANI, N. N.; DHAKEPHALKAR, P. K.; KAPADNIS, B. P. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2622-2628, Dec. 2007.

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, n. 1-3, p.70–78, Jan./Mar. 2005

SCHWENNINGER, S.M.; VON AH, U.; NIEDERER, B.; TEUBER, M.; MEILE, L. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 111–119, Jan. 2005.

SIRAGUSA, S.; DI CAGNO, R.; ERCOLINI, D.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Taxonomic Structure and Monitoring of the Dominant Population of Lactic Acid Bacteria during Wheat Flour Sourdough Type I Propagation Using *Lactobacillus sanfranciscensis* Starters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1099–1109, Feb. 2009.

SMAOUI, S.; ELLEUCH, L.; BEJAR, W.; KARRAY-REBAI, I.; AYADI, I.; JAOUADI, B.; et al. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1132-1146, Oct. 2010.

SMITH, J.; DAIFAS, D. P.; EL-KHOURY, W.; KOUKOUTSIS, J.; EL- KHOURY, A. Shelf life and safety concerns of bakery products – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n. 1, p.19–55, 2004.

STEFANELLO, R. F.; MACHADO, A. A. R.; CAVALHEIRO, C. P.; SANTOS, M. L. B.; NABESHIMA, E. H.; COPETTI, M. V.; FRIES, L. L. M. Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 510–517, Mar. 2018.

STEPHAN, D.; DA SILVA, A. P. M.; BISUTTI, I. L. Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. **Biological Control**, v. 94, p. 74–81, Mar. 2016.

STRÖM, K.; SJÖRGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-14-OH-L-Pro) and phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, Sep. 2002.

TEDRUS, G. de A. S. **Efeito da fermentação por *Lactobacillus brevis* e *Saccharomyces cerevisiae* na qualidade tecnológica do panetone**. 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, Dec. 1997.

TIEKING, M.; GÄNZLE, M. G. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 79–84, Jan./Mar. 2005.



TORRIERI, E.; PEPE, O.; VENTORINO, V.; MASI, P.; CAVELLA, S. Effect of *Sourdough* at Different Concentrations on Quality and Shelf Life of Bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 508–16, May 2014.

TURCO, Denise. Fome de Mercados. Pão de queijo, biscoitos e bebidas *made in Brazil* conquistam o paladar lá fora. **Revista PIB**, 11 maio 2008. Disponível em: <[http://www.revistapib.com.br/noticias\\_visualizar.php?id=1094](http://www.revistapib.com.br/noticias_visualizar.php?id=1094)>. Acesso em: 23 abr 2018.

UNIÃO EUROPÉIA. European Parliament and Council Directive (1995). No 95/2/EC of 20 February 1995: Food additives other than colours and sweeteners. **Official Journal L 061**, March 18, 1995. 53 p. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31995L0002>>.

VALCÁRCEL-YAMANI, B.; CAETANO, S. S. L. Quality parameters of some Brazilian panettones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n.3, p. 511-519, July/Sep. 2013.

VANDENBERGH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, n. 1-3, p. 221–238, Sep.1993.

VEGA, M. C; MARTINEZ, M. C; ALBISU, M. Un problema de conservacion en productos de bolleria en fase de comercializacion. **Alimentaria**, v. 292, p. 77-80, 1998.

VERA, A.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Comparative study of culture media used for *sourdough* lactobacilli. **Food Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 728–733, Oct. 2009.

VOGELMANN, S.A.; HERTEL, C.; Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food microbiology*, v. 28, n. 3, p. 583-589, May 2011.

VRANCKEN, G.; VUYST, L.D.; VAN DER MEULEN, R.; HUYS, G., VANDAMME, P.; DANIEL, H.M. Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 471-481, June 2010.

VRANCKEN, G.; DE VUYST, L.; RIMAU, T.; ALLEMEERSCH, J.; WECKX, S. Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a Wheat Sourdough Isolate, to Growth in Wheat Sourdough Simulation Medium at Different pH Values through Differential Gene Expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3406–3412, May 2011.

WANG, H.; HWANG, C.; TZENG, Y; HWANG, W.; MAU, J. Quality of white bread made from lactic acid bacteria-enriched dough. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 6, p. 553-559, Dec. 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press. 1990. p. 315–322.

YANG, C.; ZHU, X.; FAN, D.; MI, Y.; LUO, Y.; HUI, J.; SU, R. Optimizing the Chemical Compositions of Protective Agents for Freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 5, p. 930-936, Oct. 2012.

ZANQUI, A. B.; BASTIANI, D.; SOUZA, A. H. P.; MARQUES, D. R., GOHARA, A. K., MATSUSHITA, M.; MONTEIRO, A. R. G. Developing of Mini Panettone Containing Omega-3 in Partial Substitution of Wheat Flour for Golden Linseed Flour (*Linum Usitatissimum* L.). **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 968-976, Maio 2014.

ZAYED, G.; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1081–1086, May 2004.

ZHANG, C.; BRANDT, M. J.; SCHWAB, C.; GÄNZLE, M. G. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in *sourdough*. **Food Microbiology**, v.27, n. 3, p.390–395, 2010.

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, n .2, p. 333–338, May 2005.

ZOPPOLATTO, M.; DANIEL, J. L. P. NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 170-189, July 2009.

## APÊNDICE A – APARELHOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO.



Glutomatic



SD Matic – Amido danificado

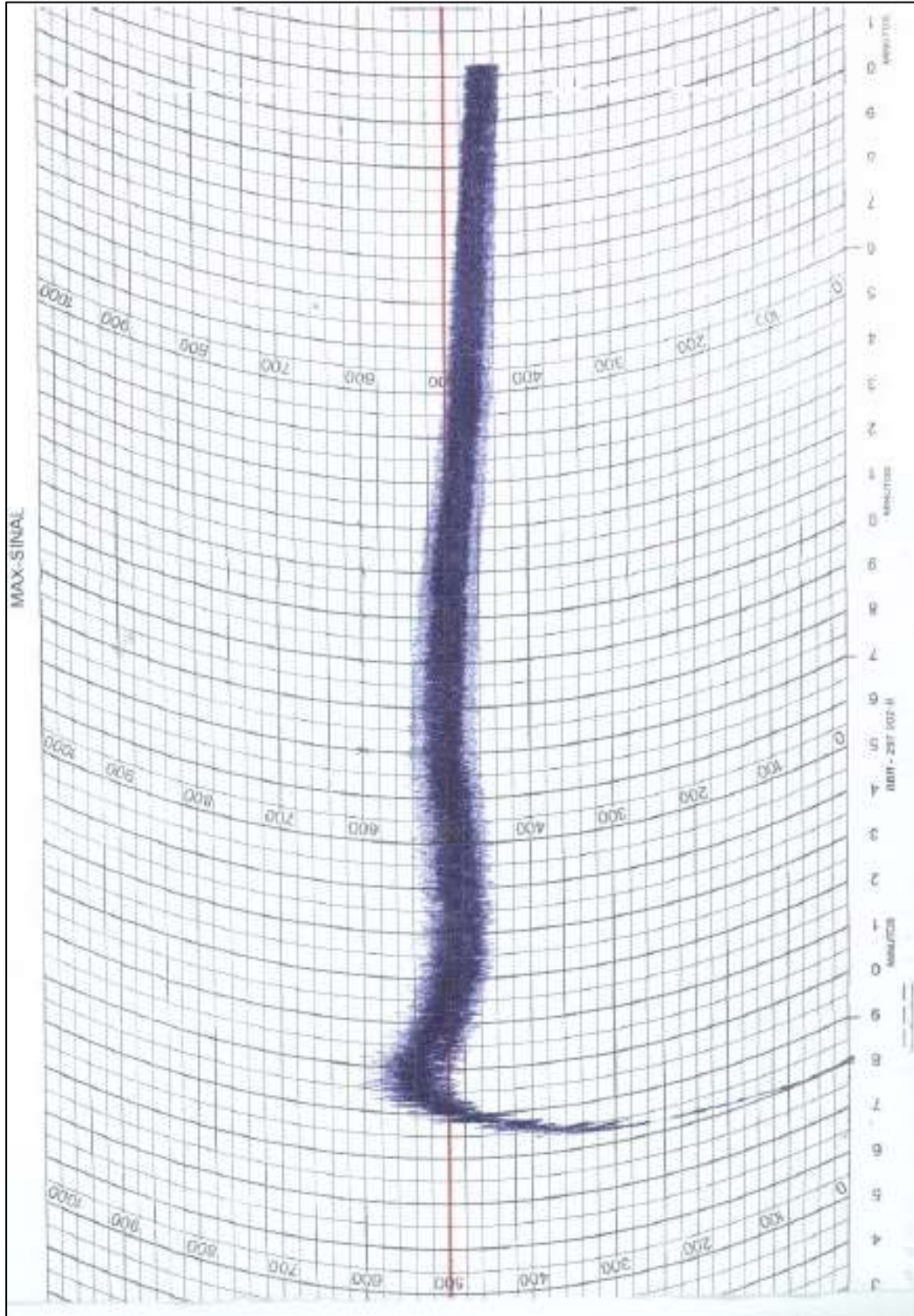


Farinógrafo Brabender



Alveógrafo Chopin



**APÊNDICE B – RESULTADO DA FARINOGRAFIA.**









## APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Título do projeto: Atividade antifúngica de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de fermento natural liofilizado obtido artesanalmente.

Pesquisador responsável: Raquel Facco Stefanello

Telefone para contato: (55) 9-9941 0026

Instituição/Departamento: UFSM - Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

Pesquisadores participantes: Orientador(a) Dra. Leadir Lucy Martins Fries

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. A pesquisa está relacionada com a atividade antifúngica de compostos formados pelos micro-organismos a fim de promover uma vida útil maior em panetones com frutas fermentados naturalmente. Adicionalmente objetiva-se diminuir a adição de conservantes químicos a fim de elaborar um produto mais natural e que atenda as especificações de qualidade e também organolépticas dos consumidores. Você será convidado a experimentar amostras de panetones com frutas elaborados com fermento natural, ou seja, um fermento composto por bactérias ácido lácticas e leveduras, e avaliar alguns atributos de qualidade, aceitabilidade e de intenção de compra. Você não deve participar deste estudo se tiver algum tipo de problema, rejeição ou aversão em relação ao consumo de derivados do trigo (glúten), ovos e açúcar, tais como doença celíaca, alergias, intolerância ou diabetes. Excetuando-se o descrito acima, não existe nenhum risco previsto decorrente da participação nesta pesquisa. Não há benefício direto para o participante, a não ser o de colaboração que desde já agradeço. Trata-se de estudo experimental testando a possibilidade de incremento de qualidade e durabilidade de panetones a partir de formulações com fermento natural. Somente no final do estudo poderemos concluir a respeito do real benefício que a utilização de fermentação natural poderá causar nos produtos e posteriormente nos consumidores. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. O período de participação ocorrerá durante o segundo semestre de 2016 e o primeiro semestre de 2017 e você, participante, se aceitar participar dessa pesquisa, terá o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

Dessa forma, Eu, concordo em participar do estudo e fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Atividade antifúngica de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de fermento natural liofilizado obtido artesanalmente”. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido nesta pesquisa.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Raquel Facco Stefanello  
Pesquisador (a) responsável

\_\_\_\_\_  
Dra. Leadir Lucy Martins Fries  
Orientador (a)

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009. Email: [comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br](mailto:comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br). Web: [www.ufsm.br/cep](http://www.ufsm.br/cep)



## APÊNDICE E – CONVITE PARA A REALIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PANETONES







# CONVITE

Gostaria de convidar à todos para participar da Análise sensorial de Panetones a ser realizada nos dias 1º e 2/12/16 no Centro de Ciências Rurais (CCR) da UFSM.

**Local: Sala 3212\* / Prédio 42 (2º andar)**

**Horários:** Quinta (01/12/16) das 9h às 16h. Sexta (02/12/16) das 11h30min às 18h. (Você poderá participar no intervalo do seu almoço, estarei lhe aguardando).



**BOAS FESTAS**

\*Hall do prédio 42, sobe a escada em frente ao caixa eletrônico (Banco do Brasil) e dobra à direita (2ª porta). Não haverá nenhum custo!



## APÊNDICE F - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DISTRIBUÍDA PARA OS PARTICIPANTES

### ANÁLISE SENSORIAL DE PANETONE COM FRUTAS

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Faixa etária: ( ) 17-25 anos ( ) 26-35 anos ( ) 36-45 anos ( ) > 45 anos

Amostra N° \_\_\_\_\_

ACEITABILIDADE: Prove a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou das mesmas em relação aos atributos: Cor, Odor, Sabor, Maciez e Umidade.

	Cor	Odor	Sabor	Maciez	Umidade
Gostei muitíssimo					
Gostei muito					
Gostei moderadamente					
Gostei ligeiramente					
Nem gostei/nem desgostei					
Desgostei ligeiramente					
Desgostei moderadamente					
Desgostei muito					
Desgostei muitíssimo					

INTENÇÃO DE COMPRA: Assinale na escala abaixo o quanto você estaria disposto a comprar para cada amostra codificada:

- ( ) certamente compraria
- ( ) provavelmente compraria
- ( ) tenho dúvidas se compraria ou não
- ( ) provavelmente não compraria
- ( ) certamente não compraria

Check-all that apply (CATA): Por favor, observe, aspire e depois, prove a amostra. Em seguida, marque todas as opções que você considera adequadas para descrever o produto.

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Alvéolos alongados e com tamanho uniforme                   | <input type="checkbox"/> Sabor suave                                 |
| <input type="checkbox"/> Aroma de mofo   | <input type="checkbox"/> Aroma adocicado                             |
| <input type="checkbox"/> Aroma agradável   | <input type="checkbox"/> Aroma de álcool                             |
| <input type="checkbox"/> Buracos no miolo  | <input type="checkbox"/> Textura adequada                            |
| <input type="checkbox"/> Cor uniforme  | <input type="checkbox"/> Gosto amargo                                |
| <input type="checkbox"/> Gosto remanescente  | <input type="checkbox"/> Massa com aspecto cru                       |
| <input type="checkbox"/> Doce  | <input type="checkbox"/> Macio                                       |
| <input type="checkbox"/> Massa desprovida de sabor                                   | <input type="checkbox"/> Poucas frutas cristalizadas e passas de uva |
| <input type="checkbox"/> Frutas cristalizadas e passas de uva na quantidade adequada | <input type="checkbox"/> Sabor agradável                             |
| <input type="checkbox"/> Miolo esfarelento e seco                                    | <input type="checkbox"/> Gosto de fermento                           |
| <input type="checkbox"/> Excessivamente aromático                                    | <input type="checkbox"/> Miolo úmido                                 |
|  | <input type="checkbox"/> Aroma à conservante                         |









## APÊNDICE H – FORMULAÇÕES DO PANETONE (PARTE 2).

TESTE 5 – Aumentou a quantidade de glúten (de 80g para 105g) na Fase 1.

TESTE 6 – Aumentou a quantidade de glúten (de 105g para 120g) na Fase 1.  
Aumentou a gordura (de 140g para 210g) na Fase 2. A Equácia TM foi retirada.

TESTE 7 e 8 – Somente produção do *sourdough*. Não foi elaborado.

TESTE 4			TESTE 9			TESTE 10		
Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	75,9	1260,0	Farinha de trigo	75,9	630,0	Farinha de trigo	75,9	630,0
Água	33,7	560,0	Água	39,8	330,0	Água	36,1	300,0
Sourdough	36,1	600,0	Sourdough	36,1	300,0	Sourdough	36,1	300,0
Açúcar	20,5	340,0	Açúcar	20,5	170,0	Açúcar	20,5	170,0
Glúten vital	4,8	80,0	Glúten vital	3,6	30,0	Glúten vital	4,8	40,0
Enzima Spring	0,054	0,90	Enzima Spring	0,054	0,45	Enzima Spring	0,054	0,45
Ácido ascórbico	0,006	0,10	Ácido ascórbico	0,006	0,05	Ácido ascórbico	0,006	0,05
Monoglicérides (PH 300)	2,4	40,0	Monoglicérides (PH 300)	2,4	20,0	Monoglicérides (PH 300)	2,4	20,0
Gemas pasteurizadas	9,6	160,0	Gemas pasteurizadas	9,6	80,0	Datem	0,6	5,0
Malte seco	1,2	20,0	Malte seco	1,2	10,0	Gemas pasteurizadas	9,6	80,0
						Malte seco	1,2	10,0
Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	24,1	400,0	Farinha de trigo	24,1	200,0	Farinha de trigo	24,1	200,0
Fase 1	184,4	3061,0	Fase 1	189,2	1570,5	Fase 1	187,4	1555,5
Gordura	8,4	140,0	Gordura	12,7	105,0	Gordura	14,5	120,0
Açúcar	14,5	240,0	Açúcar	14,5	120,0	Açúcar	14,5	120,0
Sal	1,0	16,0	Sal	1,0	8,0	Sal	1,0	8,0
Fibra Equácia TM	1,2	20,0	Ácido ascórbico	0,01	0,08	Ácido ascórbico	0,01	0,08
Ácido ascórbico	0,01	0,16	Aroma de panetone	0,6	5,0	Ácido ascórbico	0,01	0,08
Aroma de panetone	0,6	10,0	Aroma de baunilha citrica	0,2	1,5	Aroma de panetone	0,7	6,0
Aroma de baunilha citrica	0,2	3,0	Gotas de chocolate	0,0	0,0			
Gotas de chocolate	16,9	280,0						
TESTE 11			TESTE 12			TESTE 13		
Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	75,9	630,0	Farinha de trigo	76,0	760,0	Farinha de trigo	76,0	760,0
Água	36,1	300,0	Enzima Spring	0,045	0,45	Enzima Spring	0,045	0,45
Sourdough	36,1	300,0	Ácido ascórbico	0,005	0,05	Ácido ascórbico	0,005	0,05
Açúcar	20,5	170,0	Datem	0,5	5,0	Datem	0,5	5,0
Glúten vital	3,61	30,0	Monoglicérides (PH 300)	2,0	20,0	Monoglicérides (PH 300)	2,0	20,0
Enzima Spring	0,05	0,45	Glúten	3,5	35,0	Glúten	3,5	35,0
Ácido ascórbico	0,01	0,05	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0
Monoglicérides (PH 300)	2,41	20,0	Malte seco	1,0	10,0	Malte seco	1,0	10,0
Datem	0,6	5,0	Sourdough	30,0	300,0	Sourdough	30,0	300,0
Gemas pasteurizadas	9,64	80,0	Água	36,0	360,0	Água	36,0	360,0
Malte seco	1,2	10,0	Açúcar	20,5	205,0	Açúcar	20,5	205,0
Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	24,1	200,0	Farinha de trigo	24,0	240,0	Farinha de trigo	24,0	240,0
Fase 1	186	1545,5	Fase 1	179,1	1790,5	Fase 1	179,1	1790,5
Gordura	14,5	120,0	Gordura	15,0	150,0	Gordura	15,0	150,0
Açúcar	14,5	120,0	Açúcar	14,5	145,0	Açúcar	17,5	175,0
Sal	0,96	8,0	Ácido ascórbico	0,008	0,08	Ácido ascórbico	0,008	0,08
Ácido ascórbico	0,01	0,08	Sal	1,0	10,0	Sal	1,0	10,0
Mel	1,2	10,00	Mel	1,2	12,0	Mel	2,0	20,0
Sorbitol	0,12	1,00	Sorbitol	0,1	1,0	Sorbitol	0,1	1,0
			Aroma de panetone	0,6	6,0	Aroma de panetone	0,6	6,0
			Gotas de chocolate	35,0	350,0	Gotas de chocolate	35,0	350,0



## APÊNDICE I – FORMULAÇÕES DO PANETONE (PARTE 3)

TESTE 14			TESTE 15			TESTE 16		
Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	76,0	760,0	Farinha de trigo	76,0	760,0	Farinha de trigo	76,0	760,0
Enzima Spring	0,045	0,45	Enzima Spring	0,045	0,45	Enzima Spring	0,045	0,45
Ácido ascórbico	0,005	0,05	Ácido ascórbico	0,005	0,05	Ácido ascórbico	0,005	0,05
Datem	0,5	5,0	Datem	0,5	5,0	Datem	0,5	5,0
Monoglicérideos (PH 300)	2,0	20,0	Monoglicérideos (PH 300)	2,0	20,0	Monoglicérideos (PH 300)	2,0	20,0
Glúten	3,5	35,0	Glúten	3,5	35,0	Glúten	5,0	50,0
Gemas pasteurizadas	9,5	95,0	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0
Malte seco	1,0	10,0	Malte seco	1,0	10,0	Malte seco	1,0	10,0
Sourdough	30,0	300,0	Sourdough	30,0	300,0	Sourdough	30,0	300,0
Água	36,0	360,0	Água	36,0	360,0	Água	36,0	360,0
Açúcar	20,5	205,0	Açúcar	20,5	205,0	Açúcar	20,5	205,0
Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	24,0	240,0	Farinha de trigo	24,0	240,0	Farinha de trigo	24,0	240,0
Fase 1	179,1	1790,5	Fase 1	179,1	1790,5	Fase 1	179,1	1790,5
Gordura	15,0	150,0	Gordura	15,0	150,0	Gordura	15,0	150,0
Açúcar	17,5	175,0	Açúcar	17,5	175,0	Açúcar	17,5	175,0
Ácido ascórbico	0,008	0,080	Ácido ascórbico	0,008	0,080	Ácido ascórbico	0,008	0,080
Sal	1,0	10,0	Sal	1,0	10,0	Sal	1,0	10,0
Mel	2,0	20,0	Mel	2,0	20,0	Mel	2,0	20,0
Sorbitol	0,2	2,0	Sorbitol	0,3	3,0	Sorbitol	0,3	2,5
Aroma de panetone	0,6	6,0	Aroma de panetone	0,6	6,0	Aroma de panetone	0,6	6,0
Gotas de chocolate	35,0	350,0	Gotas de chocolate	35,0	350,0	Gotas de chocolate	35,0	350,0
						OU Blend de frutas	0,0	350,0
TESTE 17			TESTE 18			TESTE 19		
Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 1)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	76,0	760,0	Farinha de trigo	76,0	760,0	Farinha de trigo	76,0	760,0
Enzima Spring	0,05	0,45	Enzima Spring	0,045	0,45	Enzima Spring	0,045	0,45
Ácido ascórbico	0,01	0,05	Ácido ascórbico	0,005	0,05	Ácido ascórbico	0,005	0,05
Datem	0,5	5,0	Datem	0,5	5,0	Datem	0,5	5,0
Monoglicérideos (PH 300)	0,5	5,0	Monoglicérideos (PH 300)	0,5	5,0	Monoglicérideos (PH 300)	0,5	5,0
Glúten	3,5	35,0	Glúten	4,0	40,0	Glúten	4,5	45,0
Gemas pasteurizadas	9,5	95,0	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0	Gemas pasteurizadas	9,5	95,0
Malte seco	1,0	10,0	Malte seco	1,0	10,0	Malte seco	1,0	10,0
Sourdough	30,0	300,0	Sourdough	30,0	300,0	Sourdough	30,0	300,0
Água	37,0	370,0	Água	37,0	370,0	Água	37,5	375,0
Açúcar	20,5	205,0	Açúcar	20,5	205,0	Açúcar	20,5	205,0
Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)	Ingredientes (Fase 2)	%	Peso (g)
Farinha de trigo	24,0	240,0	Farinha de trigo	24,0	240,0	Farinha de trigo	24,0	240,0
Fase 1	178,6	1785,5	Fase 1	179,1	1790,5	Fase 1	180,0	1800,5
Gordura	15,0	150,0	Gordura	15,0	150,0	Gordura	15,0	150,0
Açúcar	17,5	175,0	Açúcar	17,5	175,0	Açúcar	17,5	175,0
Ácido ascórbico	0,008	0,080	Ácido ascórbico	0,008	0,080	Ácido ascórbico	0,008	0,080
Sal	1,0	10,0	Sal	1,0	10,0	Sal	1,0	10,0
Mel	2,0	20,0	Mel	2,0	20,0	Mel	2,0	20,0
Sorbitol	0,0	0,2	Sorbitol	0,0	0,2	Sorbitol	0,0	0,2
Aroma de panetone	0,6	6,0	Aroma de panetone	0,6	6,0	Aroma de panetone	0,8	8,0
Gotas de chocolate	50,0	500,0	Gotas de chocolate	50,0	500,0			
						Blend de frutas	50,0	500,0



## ANEXO A – DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE LINHAGENS



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CENTRO DE PROCEDIMENTOS INTERDISCIPLINARES  
NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS



São Paulo, 17 de novembro de 2016.

### DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE LINHAGENS

Declaro pelo presente que a senhora Raquel Facco Stefanello depositou no Núcleo de Coleção de Micro-organismos – NCMO do Instituto Adolfo Lutz, 06 linhagens, oriundas da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Após os processos de manutenção e autenticação as linhagens receberam o acrônimo de acesso na coleção do NCMO conforme a seguir:

LINHAGEM	NÚMERO DE ORIGEM	DATA DE ENTRADA	NÚMERO IAL	DATA DE DEPÓSITO
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN0c	03/05/16	IAL 4533	03/05/16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FN 10A	03/05/16	IAL 4539	17/11/16
<i>Candida glabrata</i>	FBB	03/05/16	IAL 4540	17/11/16
<i>Lactobacillus fermentum</i>	RF 02	03/05/16	IAL 4541	17/11/16
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RF 32	03/05/16	IAL 4542	17/11/16
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RF 04	03/05/16	IAL 4543	17/11/16

Tânia Sueli de Andrade  
Diretor Técnico I  
Núcleo de Coleção de Micro-organismos

TSA/tsa

- 1 -  
Av. Doutor Arnaldo, n° 351 – 10º Andar – Cerqueira César  
São Paulo/SP – CEP: 01248-902 – Tel: (11) 3068-2884  
coleccional@ial.sp.gov.br