

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

**PRODUÇÃO, LIOFILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
FERMENTO NATURAL EM PÃO TIPO *SOURDOUGH***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raquel Facco Stefanello

Santa Maria, RS, Brasil

2014

PRODUÇÃO , LIOFILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FERMENTO NATURAL EM PÃO TIPO *SOURDOUGH*

Raquel Facco Stefanello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stefanello, Raquel Facco
Produção , liofilização e aplicação de fermento natural
em pão tipo Sourdough / Raquel Facco Stefanello.-2014.
160 p.; 30cm

Orientador: Leadir Lucy Martins Fries
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. Liofilização 2. Trealose 3. Fermento natural 4.
Sourdough I. Fries, Leadir Lucy Martins II. Título.

© 2014

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: raquelfacco@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO, LIOFILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FERMENTO
NATURAL EM PÃO TIPO *SOURDOUGH***

elaborada por
Raquel Facco Stefanello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leadir Lucy Martins Fries, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Roberta Cruz Silveira Thys , Dr^a. (UFRGS)

Marlene Terezinha Lovatto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 11 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Jaime e Ana Rita. Amo muito vocês. Obrigada por tudo.

Ao meu querido irmão, que amo muito, Tobias, sua esposa Franceli e minha afilhada Laura.

Aos meus entes queridos, que de alguma forma ou outra estiverem sempre presentes, mesmo que em oração (Vô Eduardo, Vó Duzo e Vó Antônio), enviando pensamentos positivos e bênçãos. Obrigada à minha querida Vó Maria por suas abençoadas orações.

Ao meu namorado Cleber e toda a sua família pela compreensão e paciência.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, por ter tornado possível a realização deste experimento.

A CAPES, pelo fornecimento da Bolsa de Pesquisa.

À minha amiga e orientadora, professora Leadir Lucy Martins Fries, uma pessoa especial. Obrigada pela amizade, pelo carinho, compreensão e companheirismo durante esses dois anos de trabalho. Sua ajuda e orientação foram e são muito importantes. Agradeço pela sua generosidade e por ensinar-me a doutrina da pesquisa científica.

Ao co-orientador, professor Cristiano R. Menezes, pela colaboração e na pessoa dele também agradeço o pessoal do Laboratório de Microencapsulação por toda a estrutura e acolhimento.

À professora Marina Copetti e suas orientandas. Obrigada!

À professora Marlene Lovatto pela atenção e por ter sido uma das primeiras pessoas a acreditar no mérito da minha pesquisa.

À Cláudia Baggio, da biblioteca setorial do CCR, que sempre esteve disposta a me ajudar com as minhas dúvidas sobre as formatações e referências bibliográficas.

Ao professor Luis Carlos Gutkoski, da UPF, e por todos os colaboradores da CEPA, especialmente à Tânia, Israel, Tais, Barbara e Carla.

Aos professores do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da UFSM, obrigada pela disponibilidade e pela ajuda.

Aos funcionários do departamento de tecnologia de alimentos, que sem dúvida, são essenciais para qualquer pesquisa e fazem parte de nossa metodologia de trabalho. Sem o apoio deles, a rotina de laboratório ficaria totalmente sem graça. Ao pessoal da limpeza dos prédios, o meu agradecimento também.

Ao Felipe e a Amanda por toda ajuda, responsabilidade, dedicação com o trabalho. Também pela seriedade e confiança estabelecidas durante o experimento.

Às empresas Prozyn (ao Nadal, especialmente), Triângulo Alimentos e Tradbor pelo fornecimento de insumos e embalagens para o trabalho.

À parceria do Moinho Ipiranga (Adelino Antoniazzi Indústria Moageira Ltda) e por toda a sua equipe de trabalho. Obrigada pelas farinhas e por todo o acolhimento.

À Cisbra pelo fornecimento das farinhas e por acreditarem na idéia de inovação do trabalho e pelo depoimento concedido e anexado no final desta dissertação, o meu agradecimento sincero.

À Martha Z. Miranda da Embrapa pela sua atenção e informações.

À Paula Mattana e Jamile, “muitíssimo obrigada”, pelo esforço e empenho. A ajuda de vocês foi valiosíssima e acrescentou muitos resultados positivos nessa dissertação de mestrado.

À minha prima Roberta por escutar minhas inquietações. A sua experiência me alertou e me abriu os olhos.

Às queridas amigas e companheiras de apartamento. Obrigada pelo carinho e compreensão e também pelos momentos de alegria e diversão.

Às minhas amigas especiais e colegas do mestrado, muito obrigada pela amizade e companheirismo. Obrigada por estarem junto nessa etapa de minha vida.

A padaria Barbarella Bakery e Benjamin Abrahão pelas informações.

A todos que me ajudaram, de forma direta ou indireta, sou muito grata por tudo. Obrigada!

"Nunca deixe para fazer amanhã aquilo que pode ser feito hoje."

(Vó Duzo, *em memória*)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO, LIOFILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FERMENTO NATURAL EM PÃO TIPO *SOURDOUGH*

AUTORA: RAQUEL FACCO STEFANELLO

ORIENTADOR: LEADIR LUCY MARTINS FRIES

CO-ORIENTADOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de março de 2014.

O processo de fermentação em produtos de padaria é a etapa mais importante e é, por sua vez, responsável pelo aroma do pão, pois durante essa etapa são produzidos os compostos aromáticos e voláteis aos quais identificamos como o odor característico do produto. O desenvolvimento de fermento natural é uma metodologia difícil e necessita de várias etapas de manutenção. Tendo em vista esse aspecto bem como o de produção que o objetivo deste trabalho foi produzir um fermento natural liofilizado, adicionado de diferentes concentrações de trealose, monitorando os aspectos físico-químicos e microbiológicos envolvidos durante sua fabricação realizando análises para estudar a viabilidade celular, os efeitos envolvidos no processo de congelamento e liofilização e aplicar esse produto em pão tipo *sourdough* para avaliar os aspectos sensoriais e de vida de prateleira. Produziu-se três tipos de fermento natural liofilizado, um sem a adição (FNL 0) de trealose, um com a adição de 10% (FNL 10) e outro com a adição de 15% (FNL 15). As contagens ($\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) de bactérias ácido lácticas e de bolores e leveduras antes e depois do processo de liofilização mostraram que a trealose protegeu as células dos microrganismos, viabilizando o processo de liofilização, com diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos com maior concentração (10 e 15%) desse composto. A partir dos fermentos naturais liofilizados, pães tipo *sourdough* foram elaborados para avaliar os aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais e comparados com pães fabricados com fermento comercial. Os resultados indicaram uma inibição microbiológica de bactérias e de fungos nos tratamentos fabricados com fermento natural liofilizado nas diferentes concentrações de trealose, apresentando médias estatisticamente ($p < 0,05$) menores que nos pães com fermento comercial. Na avaliação sensorial, os pães com fermento natural liofilizado utilizando 15% de trealose (FNL 15) obtiveram um conceito razoável pelo painel treinado de provadores.

Palavras-chave: Liofilização. Trealose. Fermento natural. *Sourdough*.

ABSTRACT

Master Dissertation
Program of Post graduation in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

PRODUCTION, LYOPHILIZATION AND APPLICATION OF NATURAL YEAST IN BREAD TYPE SOURDOUGH

AUTHOR: RAQUEL FACCO STEFANELLO

ADVISOR: LEADIR LUCY MARTINS FRIES

CO-ADVISOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Defense Place and Date: Santa Maria, March 11st, 2014.

The process of fermentation in products of bakery is the most important step and it is, in turn, responsible for the aroma of bread, because during this stage the aromatic and volatile compounds which we identify as the characteristic odor of the product are produced. The development of natural yeast is a difficult methodology and requires several steps of maintenance. Considering this aspect as well as the production that the aim of this work was to produce a lyophilized natural yeast, added different concentrations of trehalose, monitoring the physico-chemical and microbiological aspects involved during its manufacture performing analyzes to study cellular viability, the effects involved in the process of freezing and lyophilization and apply this product in bread type sourdough to evaluate the sensory and shelf life aspects. It was produced three types of lyophilized natural yeast, one without addition (FNL 0) of trehalose, one with the addition of 10% (FNL 10) and other with the addition of 15% (FNL 15). The counts ($\log \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$) of lactic acid bacteria and of molds and yeasts acid before and after the lyophilization process showed that trehalose has protected the cells of the microorganisms, enabling the lyophilization process, with significant differences ($p < 0,05$) in the treatments with higher concentrations (10 and 15%) of this compound. From the lyophilized natural yeast, breads of sourdough type were elaborated to evaluate the physico-chemical, microbiological and sensory before a treatment with commercial yeast aspects. The results indicated a microbiological inhibition of bacteria and of fungi in treatments made with lyophilized natural yeast in different concentrations of trehalose, showing averages statistically ($p < 0,05$) lower than in commercial breads with yeast. In the sensory evaluation, the breads with lyophilized natural yeast using 15% trehalose (FNL 15) obtained a reasonable concept by trained panel of tasters.

Key-words: Lyophilization. Trehalose. Natural yeast. Sourdough.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microrganismos presentes no fermento natural40

ARTIGO 1

Figura 1: Determinação de pH (A) e acidez total titulável (ATT)(B) no fermento natural preparado a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral durante 14 dias de armazenamento a temperatura de 30°C.....59

Figura 2: Contagem microbiológica de bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras (LEV) do fermento natural preparado a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral durante os 14 dias de fabricação.61

ARTIGO 2

Figura 1. Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos realizadas nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, e com fermento comercial durante 24 dias de armazenamento.83

Figura 2. Contagens de bolores e leveduras realizadas nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, e com fermento comercial durante 24 dias de armazenamento.84

Figura 3. Efeito do fermento comercial e do fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, sobre o volume específico de pães.85

Figura 4. Valores de pH (A) e acidez total titulável (B) dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.86

Figura 5. Aparência dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose. FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose. FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.....88

Figura 6: Alterações causadas por bolores e leveduras nos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose após 24 dias de armazenamento em temperatura ambiente.90

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1:** Contagens de bactérias ácido láticas (BAL) e bolores e leveduras (LEV) nas amostras de farinha de trigo branca e de farinha de trigo integral.57
- Tabela 2.** Valores da umidade e atividade de água (Aa) do fermento natural fresco (FNF) e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (FNL 0), (FNL 10) e (FNL 15).62
- Tabela 3:** Viabilidade celular de bactérias ácido láticas (BAL) realizadas nos fermentos naturais no estado fresco (-3), congelado (-2) com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização.63
- Tabela 4:** Viabilidade celular de bolores e leveduras (LEV) realizadas nos fermentos naturais no estado fresco (-3), congelado (-2) com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização.64

ARTIGO 2

- Tabela 1:** Formulação utilizada para a produção de pães com fermento natural e comercial.77
- Tabela 2.** Contagem de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfitorreduzidor a 46°C e *Salmonella* sp realizadas em pães produzidos com fermento natural liofilizado (FNL) com diferentes concentrações de trealose e fermento comercial (FC), logo após a fabricação.82
- Tabela 3:** Contagem de bolores e leveduras no fermento comercial e nos fermentos naturais liofilizados, com diferentes concentrações de trealose, antes da fabricação dos pães.82
- Tabela 4.** Firmeza das fatias de pães produzidos com fermento comercial e com fermento natural liofilizado produzido com diferentes concentrações de trealose, avaliadas nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.85
- Tabela 5.** Atividade de água (Aa) dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.87
- Tabela 6.** Características externas, internas, aroma e gosto e avaliação global dos pães elaborados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose.89

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma da hidratação do Fermento Natural Liofilizado	119
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	120
Apêndice C – Ficha de avaliação sensorial apresentada para o painel treinado....	121
Apêndice D – Depoimento de empresa a respeito da aplicabilidade industrial do fermento natural liofilizado.	122
Apêndice E – Valores de pH, acidez total titulável e contagens de bactérias ácido lácticas e de bolores e leveduras durante a fabricação do fermento natural a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral.	123
Apêndice F – Contagens de bactérias ácido lácticas (A) e bolores e leveduras (B) em fermentos naturais liofilizados (F _i) tratados com três concentrações de trealose.	123
Apêndice G – Esquema de fabricação do fermento natural a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral pelo tempo de 14 dias. FHA: farinha.	124
Apêndice H – Etapas para a liofilização do fermento natural com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) obtido a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral após 14 dias de produção.	124
Apêndice I – Etapas de preparação dos pães tipo <i>sourdough</i> utilizando fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) e pães com fermento comercial.	125
Apêndice J – Resultados das análises de pH, acidez total titulável, contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras dos pães fabricados com fermento comercial e com fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose durante os 24 dias de armazenamento.....	126
Apêndice K – Laudo de análise.....	127
Apêndice L – Laudo de análise (farinha integral).....	128
Apêndice M – Laudo de análise (farinha integral).....	129
Apêndice N – Laudo de análise (farinha branca).....	130
Apêndice O – Laudo de análise (farinha branca).....	131

LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Normas para formatação e submissão à revista científica Brazilian Journal of Microbiology	135
Anexo B –	Normas para formatação e submissão à revista científica Food Microbiology	147

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Objetivos	26
1,2 Objetivo Geral	26
1.3 Objetivos específicos	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 História do pão	29
2.2 Pães especiais	29
2.3 Principais ingredientes	30
2.3.1 Farinha de trigo	31
3.3.2 Água.....	31
3.3.3 Sal	32
3.3.4 Açúcar	32
3.3.5 Gordura	33
3.3.6 Fermento	33
3.4 Tipos de fermentação.....	34
3.4.1 Fermentação natural	35
3.5 Fermento natural	36
3.5.1 Produção de fermento natural	38
3.5.2 Aspectos microbiológicos do fermento natural	39
3.5.3 Mudanças Físico-Químicas	41
3.6 Pães com fermento natural (tipo <i>sourdough</i>)	42
3.7 Conservação do pão	45
3.8 Liofilização.....	46
3.8.1 Trealose	47
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	49
ARTIGO 1 PRODUCTION AND LYOPHILIZATION OF NATURAL YEAST	49
RESUMO.....	51
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO	52
MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES	65
AGRADECIMENTOS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ARTIGO 2 MANUFACTURE OF BREAD TYPE SOURDOUGH WITH NATURAL YEAST LYOPHILIZED	71
RESUMO.....	73
DESTAQUES	73
ABSTRACT	74
HIGHLIGHTS	74
INTRODUÇÃO	75
MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
RESULTADOS	81

DISCUSSÃO.....	90
CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
5 DISCUSSÃO	99
6 CONCLUSÃO GERAL	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICES.....	117
ANEXOS.....	133

1 INTRODUÇÃO

O pão tem sido produzido pelo homem há mais de dois mil anos e pode ser considerado um dos alimentos mais comuns nas mais distintas sociedades. Os conceitos básicos de pão e de seu respectivo processo sofreram inúmeras transformações ao longo dos anos, quanto a qualidade das matérias primas envolvidas na formulação, a tecnologia de fabricação e os hábitos alimentares da sociedade. Por ser um alimento consumido quase que diariamente, sua versatilidade aceita as mais variadas formulações e combinações, não restringindo este produto a nenhuma faixa etária ou classe social.

Os produtos de panificação, principalmente os pães, são fabricados usando leveduras como agentes de fermentação. O fermento biológico comercial é composto basicamente por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. O amido presente na farinha de trigo se transforma em açúcares fermentescíveis pela ação enzimática. Esses açúcares são metabolizados pelo fermento, produzindo etanol e dióxido de carbono (CAUVAIN; YOUNG, 2009). Há também os fermentos naturais, que são fermentos utilizados no preparo de pães especiais em muitos países, porém com pouca representação no Brasil, pois necessitam de tempo e mão-de-obra capacitada para seu desenvolvimento e não possibilitam uma padronização na produção.

Entende-se por fermento natural, uma mistura de farinha de trigo branca e água, considerada um micro *habitat* natural e espontâneo, onde leveduras e bactérias lácticas coexistem em equilíbrio dinâmico (VOGELMANN; HERTEL, 2011) após alguns dias de fermentação. O uso de fermento natural como agente de fermentação indireta de pães apenas predomina para a produção de pães especiais e poucas padarias empregam esse tipo de fermento (GOBBETTI, GÄNZLE, 2007; BRANDT, 2007). Para que esse tipo de fermento seja usado industrialmente, é necessário investir em pesquisa para desenvolver tecnologias apropriadas para tornar essa forma de fermentação um meio mais acessível aos profissionais desse ramo. Portanto, a matéria prima a ser utilizada, a microbiota existente, a manutenção desta microbiota e a disponibilidade do fermento na forma liofilizada necessita de estudos mais aprofundados.

Para o desenvolvimento da massa para panificação os métodos mais aplicados são o método direto e o método indireto, que também é conhecido por *esponja* (CAUVAIN; YOUNG, 2009). O primeiro método se baseia na mistura de todos os ingredientes da formulação para desenvolver uma massa que é deixada fermentar para depois ser dividida, modelada e colocada no forno para assar (HOSENEY, 1994). No segundo método de fermentação, os ingredientes são misturados em dois estágios: primeiro é elaborado uma esponja leve e líquida constituída por parte da farinha da formulação, água e fermento biológico comercial ou fermento natural. A esponja passa por uma extensa pré-fermentação variando de 1 a 4 horas ou até mesmo 16 horas. No segundo estágio, os demais ingredientes são acrescentados à esponja e a massa formada é levada à fermentação final antes de assar (CANELLA-RAWLS, 2009; CAVANAGH et al., 2010). No método (indireto) de fermentação, o fermento natural é o mais utilizado.

A importância da fermentação natural na vida moderna é ressaltada pelo amplo espectro de alimentos fermentados e que são comercializados atualmente, não só pelo benefício da preservação e segurança, mas também por seus atributos sensoriais altamente apreciados e por modular as propriedades nutricionais em uma série de maneiras, tais como aumento dos níveis ou biodisponibilidade de compostos bioativos além de retardar a digestibilidade do amido (FLANDER et al., 2011).

A produção de fermento natural vem se modificando e se aprimorando com o passar dos tempos. Desde os tempos mais remotos até hoje, a batata, por exemplo, é usada para iniciar um processo de fermentação juntamente com farinha de trigo branca e água. Além dos tubérculos e raízes, frutas e iogurte natural são utilizados para dar início ao processo de fermentação natural.

Os produtos naturais estão ganhando espaço entre os consumidores que buscam uma alimentação mais saudável e que atenda as características nutricionais e de aceitabilidade. Em produtos panificados a utilização de grãos integrais enriquecidos por fibras é bastante difundida e têm contado com a aceitação dos consumidores mais exigentes.

Quanto maior for o grau de extração da farinha de trigo, maiores serão os teores de cinzas e fibras. A utilização deste tipo de farinha, comumente designada de farinha integral, em processos fermentativos conserva a maioria de suas propriedades funcionais e também colabora com o processo fermentativo, pois

apresenta enzimas endógenas que agem no enriquecimento do produto (SCHEIRLINCK et al., 2009) porém deve-se tomar o cuidado com a proporção adicionada pois as fibras agem como lâminas nas redes de glúten, diminuindo o volume dos pães.

Logo, a farinha de trigo integral, ainda não utilizada na produção de fermento natural, é uma ótima opção considerando a diversidade e quantidade de compostos e nutrientes que a compõem.

Para produção industrial de um fermento natural, necessitamos preservar os microrganismos ali existentes. Vários microrganismos *starters* são freqüentemente preservados por congelamento e também por secagem. No entanto, ocorre uma considerável inativação das células durante esses processos, por isso se faz necessário estudar as respostas fisiológicas dos microrganismos durante o congelamento e também durante a secagem (KETS et al., 1996).

A trealose é um dissacarídeo com funções protetoras e em um estudo recente (SELVA et al., 2013) relataram sobre a sua eficácia na preservação de microrganismos sob condições ambientais adversas, tais como temperaturas baixas e processos de secagem. Embora o mecanismo pelo qual este dissacarídeo exerça a proteção ainda esteja em discussão, o seu uso como crioprotetor está sendo cada vez mais estudado e aprimorado.

A liofilização é um processo de remoção de água por sublimação, ou seja, a água previamente congelada (sólido) na amostra é evaporada sem passar pelo estado líquido originando um produto seco, muito usada para obter diversos produtos industriais (SANTO et al, 2013). O fermento biológico comercial já existe na forma instantânea devido ao processo de liofilização. No entanto não há na literatura nenhum trabalho que aborde a liofilização de um fermento natural, contemplando microrganismos e farinha, para ser aplicado a nível industrial no preparo de pães. O que existe são fermentos naturais secos, originalmente específicos para conferir aroma e sabor aos produtos. A Vallens Food (Farroupilha, RS) comercializa esses tipos de fermentos. Este trabalho inovou com a idéia da liofilização de toda a massa de fermento, sem fazer o isolamento dos microrganismos. Para tanto a sobrevivência dos microrganismos submetidos ao processo de liofilização deve ser estudada.

Embora a liofilização como método de preservação de leveduras promova alta taxa de inativação celular, a viabilidade celular remanescente permanece estável

durante o período de estocagem (SILVA et al., 1992; COSTA e FERREIRA, 1991; JAY, 2005).

Dessa forma, o presente estudo tem por finalidade fabricar um fermento natural liofilizado a partir da mistura de farinha de trigo branca e integral para utilização industrial na elaboração de pão tipo *sourdough*.

1.1 Objetivos

1.2 Objetivo geral

Este estudo tem por finalidade produzir um fermento natural liofilizado a partir da mistura de farinha de trigo branca e integral para utilização industrial na elaboração de pão tipo *sourdough*.

1.3 Objetivos específicos

- Produzir um fermento natural a partir da mistura de farinha de trigo branca e integral;
- Monitorar o pH, a acidez total titulável (ATT) e o crescimento dos microrganismos no fermento natural, durante sua produção;
- Analisar a umidade e atividade de água no fermento natural antes de ser liofilizado;
- Verificar o efeito da trealose adicionada ao fermento antes de realizar a liofilização das amostras;
- Analisar a umidade, a atividade de água, o rendimento e a sobrevivência dos microrganismos nos fermentos naturais liofilizados;
- Avaliar a vida de prateleira do fermento natural liofilizado através da viabilidade celular;

- Elaborar o pão tipo *sourdough* com o fermento natural liofilizado através da fermentação indireta;
- Analisar os aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais dos pães produzidos;
- Avaliar a aplicabilidade industrial do fermento natural liofilizado e as considerações a cerca de sua utilização em empresas ligadas com o setor de panificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História do pão

A história do pão começa a ser contada cronologicamente a partir do momento que o homem dominou a técnica do fogo, fez misturas de cereais com a água e cozinhou essa pasta sobre a pedra quente. História que segue com a descoberta do fermento natural que transforma o pão ancestral, também conhecido por ázimo, em um produto com volume e leveza. História que passa pelas transformações tecnológicas dos tempos modernos e pela tradição espiritual, já que o pão, apesar de ser feito pelo homem, é também alimento sagrado (CANELLA-RAWS, 2006).

Em suas diversas formas, o pão é um dos alimentos mais consumidos pela humanidade. Tradicionalmente, origina-se da farinha derivada do trigo. Diversos outros tipos de cereais, leguminosas e até legumes podem ser moídos, produzindo uma farinha. No entanto, a capacidade das proteínas presentes no trigo de transformar o mingau de farinha e água em uma massa glutinosa, que se torna pão, limita-se em geral ao trigo e a algumas outras sementes de cereais habitualmente utilizadas (CAUVAIN, 2009).

O pão é um alimento base, consumido por todo o mundo e é produzido, tradicionalmente, por farinha de trigo, água, sal e levedura (ULZIJARGAL et. al. 2013). O termo “pão” é usado de forma genérica, pois existe uma variedade imensa de diferentes tipos de pães, refletidos nos costumes e cultura local (LAMPIGNANO, et al., 2013).

2.2 Pães especiais

O estilo de vida mais saudável vem mudando os hábitos alimentares de um número cada vez maior de pessoas. Os consumidores estão ficando cada vez mais

exigentes e as indústrias de panificação assim como as demais devem buscar o aprimoramento de seus produtos para oferecer uma gama variada de alimentos com benefícios à saúde.

Conforme a Resolução nº 263 (BRASIL, 2005), *pães* são os produtos obtidos da farinha de trigo e ou outras farinhas, adicionados de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos.

De acordo com BRASIL (2000) podemos identificar o *Pão de forma* como o produto obtido pela cocção da massa em formas, apresentando miolo elástico e homogêneo, com poros finos e casca fina e macia. Sendo *Pão integral* um produto preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo e farinha de trigo integral e/ou fibra de trigo e/ou farelo de trigo.

Para a obtenção da farinha integral o grão é triturado mantendo-se tudo como produto único. A farinha branca representa de 30% a 60% de extração e a farinha mais ou menos escura corresponde de 76% a 80% ou mais de extração. Assim, conforme Ornellas (1995), quanto mais refinada for a farinha, menor será o rendimento de extração e mais destituída o produto estará de vitaminas e minerais.

Dessa forma há uma grande tendência pela preferência pelos alimentos naturais, ricos em fibras e com o mínimo de conservantes para promover o bem-estar e a qualidade de vida dentre os consumidores. De acordo com Gandra et al. (2008), existem duas razões para se adicionar fibras em pães, sendo a primeira, o aumento do teor de fibra alimentar, e a segunda, o decréscimo do conteúdo calórico destes pães.

2.3 Principais ingredientes

Existe uma diversidade de tipos de pães e por isso as formulações são bastante variadas, porém, na sua simplicidade, o pão consiste de poucos ingredientes, como, por exemplo, farinha de trigo, fermento, sal e água. No decorrer dos tempos, as formulações foram sendo aperfeiçoadas e alguns ingredientes foram adicionados ou substituídos para criar sabores, aromas e formatos diferentes. Em particular, neste trabalho apenas citaremos os principais.

2.3.1 Farinha de trigo

Entre as farinhas mais utilizadas na panificação, a de trigo merece destaque, principalmente devido suas características únicas de formação de rede protéica através do glúten (PALLÁRES et al., 2007). O glúten é composto de uma mistura heterogênea de proteínas, constituído principalmente por gliadinas e gluteninas, com solubilidade em água (DAMODARAN, et al., 2010).

As proteínas do trigo são divididas em dois grandes grupos (as solúveis e as insolúveis em água): as proteínas que irão formar o glúten, constituindo 75-80% das proteínas na farinha e aquelas que não o formam, representando 25-20% do total (PALLÁRES et al., 2007). O desdobramento parcial das moléculas protéicas através do amassamento em presença de água facilita interações hidrofóbicas, com intercâmbio de sulfidril-dissulfeto juntamente com formação de pontes de hidrogênio, resultando assim em formação de polímeros em forma de rede, capaz de reter os gases da fermentação (DAMODARAN et al. 2010).

A atividade da fermentação melhora quando é usada a farinha de trigo integral, porque o farelo é rico em minerais que são alimentos naturais para o fermento, no entanto prejudica a retenção dos gases durante a fermentação (SUAS, 2012).

Muitos dos ingredientes utilizados na confecção dos produtos fermentados contribuem de forma significativa para seu sabor. A farinha tende a ter sabor relativamente suave, com a maior parte dessa contribuição vinda dos óleos do gérmen (embrião) e das partículas do farelo de trigo presentes. É previsível esperar que as farinhas de trigo integral e as brancas enriquecidas com farelo e gérmen de trigo produzirão um pão mais saboroso do que as feitas somente com farinhas brancas (CAUVAIN, 2009).

3.3.2 Água

Na panificação esse ingrediente tem grande importância, dado que a formação do glúten depende do trabalho mecânico entre a mistura da farinha de

trigo e água, formando uma espécie de gel, cujo papel é aprisionar o gás produzido pelas leveduras contribuindo para um maior volume, maciez e características sensoriais benéficas no produto final (PALLÁRES et al. 2007). Assim a água cria o ambiente úmido apropriado para o desenvolvimento de intensa atividade enzimática e inicia o processo de fermentação (CANELA-RAWS, 2006).

3.3.3 Sal

O sal é um dos principais ingredientes que influenciam nas características tecnológicas e sensoriais no produto de panificação (NOORT, BULT & STIEGER, 2012). O sal também é necessário para dar sabor ao pão, pois sem ele, o pão ficaria insípido (CAUVAIN; YOUNG, 2009). A quantidade de sal afeta as relações do crescimento microbiano e, conseqüentemente, a vida de prateleira (BELZ et al. 2012). No entanto, sua adição deve ser limitada, pois em demasia causa inibição das leveduras responsáveis pela fermentação (PALLARÉS et al. 2007) e alteração na qualidade do glúten, com valor ótimo de 2% em relação ao peso da farinha, apresentando nestas proporções melhores resultados tecnológicos (QUAQLIA, 1991).

Logo, a adição de valores inferiores a 2% de sal na formulação, como por exemplo 1,25%, pode assumir particular importância para a fabricação de pães de acordo com as novas exigências da ANVISA para a diminuição da concentração de sódio (NaCl) nos produtos.

3.3.4 Açúcar

Dentre os açúcares mais utilizados na panificação, a sacarose fica em destaque. É um diglicerídeo constituído por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose (RIBEIRO & SERAVALLI, 2007). Na panificação seu uso está relacionado, principalmente, com aumento da disponibilidade de açúcares

fermentescíveis e por proporcionar reações de escurecimento não enzimático, no caso de açúcares redutores (QUAQLIA, 1991; PALLARÉS et al., 2007).

3.3.5 Gordura

Os lipídeos desempenham um papel importante na qualidade dos produtos panificados, pois podem contribuir em atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica. Uma gama enorme destes componentes pode ser usada com propriedades funcionais específicas de maciez, sensação bucal, integridade estrutural, umectação, entre outros em diversos produtos alimentícios, como tortas, pães, massas, produtos fritos e assados (DAMODARAN et al., 2010).

Na panificação o uso de gorduras está ligado à diminuição do enrijecimento da crosta que se acentua com o passar do tempo e também com a estabilização das bolhas de gás presentes na massa entre outras funcionalidades (MOULINEY et al. 2011).

3.3.6 Fermento

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2000), considera-se como *Fermento biológico natural* aquele obtido a partir de uma autoseleção natural de cepas de leveduras e lactobacilos presentes na farinha de trigo. De acordo com a mesma resolução, *Fermento biológico industrial* é uma seleção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* obtida através de processo industrial.

Sob critérios morfológicos e fisiológicos, o fermento é uma cultura de microrganismos, composta por seres microscópicos capazes de alimentar-se, reproduzir e eliminar suas próprias sobras (CO₂). Eles se alimentam dos açúcares resultantes da hidrólise do amido presente na farinha de trigo utilizada no preparo da massa de pão. O açúcar é metabolizado pelos fermentos, eliminando álcool e desenvolvendo o gás necessário para a explosão do produto (CANELA-RAWS, 2006).

O fermento comercial é um fermento biológico resultante do cultivo industrial de culturas apropriadas de estoques selecionados, podendo ser liofilizado ou não (instantâneo). O fermento biológico comercialmente produzido (*Saccharomyces cerevisiae*) apresenta qualidade uniforme. O pão elaborado com esse fermento apresenta uma acidez relativamente baixa (em torno de 6 g.%) sendo dominado pelo sabor e aroma derivado da farinha de trigo (CANELA-RAWS, 2006).

O fermento natural é resultante de uma cultura primária de agentes (bactérias e fungos) encontrados no meio ambiente e na própria farinha. É a preparação de parte do pão, feita 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 acarretando produtos com qualidade específica. O fermento natural pode ser de consistência firme, bastante líquido ou até, simplesmente, uma sobre de massa de pão. Alguns pré-fermentos, como também são chamados, contêm sal, outros não; alguns contêm açúcar. Outros contêm uma quantidade de fermento comercial, ou se iniciam com algumas bactérias que ocorrem naturalmente (CANELA-RAWS, 2006).

3.4 Tipos de fermentação

O processo de panificação pode ser dividido em duas fases distintas: o período da mistura e o período da fermentação, quando as características da massa são transformadas. Ambas as fases são essenciais para a qualidade final do pão. O estilo ou o modo da fermentação determina o sabor e o aroma final do pão (SUAS, 2012). Existem dois tipos principais de fermentação, o método indireto e o método direto.

O método tradicional de fermentação (chamado rotineiramente de método indireto) inicia-se com a elaboração de uma esponja (uma porção de massa que é fermentada e então adicionada à massa final) usando fermento natural ou fermento comercial (SUAS, 2012) para dar reforço a próxima fase no processo. Durante a fermentação da esponja haverá uma diminuição evidente do pH com fermentação crescente (provocada pelas mudanças de tempo, temperatura ou ambas). A duração

da fermentação da esponja pode variar consideravelmente (de 2 a 24h), assim como a sua composição (CAUVAIN, 2009). Após esse período de fermentação primária, os demais ingredientes são misturados e a massa passa pelo o que chamamos de fermentação final ou de prova, gerando os compostos responsáveis pelo sabor e originando o volume dos produtos pela transformação de açúcar em CO₂, álcool e compostos aromáticos (SUAS, 2012).

Depois que a massa atingir um crescimento esperado, ela é dividida e pré-moldada de acordo com peso e formato definidos. As massas divididas são postas para descansar até atingir o formato final. Essas massas moldadas passam, então, para o próximo estágio de fermentação, quando o fermento produz o gás carbônico (CO₂), gerando volume e textura suficiente para serem levadas ao forno (SUAS, 2012).

No método direto de fermentação nenhum pré-fermento ou esponja é desenvolvido. Trata-se de um método simples e é o mais utilizado recentemente devido sua rapidez e produtividade. Nesse processo, como o próprio nome diz, os ingredientes são diretamente incorporados (de uma única vez) para fazer a massa de pão, obviamente seguindo uma ordem determinada. É mais rápido do que o método indireto, porém produz pão com miolo menos macio, com textura diferenciada e aromas menos desenvolvidos (CANELA-RAWS, 2006).

3.4.1 Fermentação natural

Nos processos naturais de fermentação, novos produtos de sabor são gerados na massa. Tanto a intensidade desses sabores como as “notas” particulares de sabor que são desenvolvidas mudam com o tempo crescente da fermentação. As alterações mais observadas são aquelas associadas ao desenvolvimento de sabores ácidos a partir da atividade microbiana na massa, prontamente detectados no sabor do miolo do pão. Nem toda essa atividade ligada ao sabor advirá da adição de fermento; alguma resultará de fermentos silvestres e bactérias, em especial bactérias do ácido lático, que estão presentes naturalmente na farinha (CAUVAIN, 2009).

Com mais de dois mil anos de existência, o fermento natural é um fermento à base de massa envelhecida. Wood (1998) ressalta: “A adição de água em cereais moídos resulta na formação de uma massa a qual, depois de um tempo, irá se tornar *sourdough* (*Sourdough* é *levain* em inglês, cujo significado é massa ácida) caracterizado pelo gosto ácido, aroma e aumento de volume devido a formação de gás.” A fermentação natural tem sido usada desde os tempos mais remotos e o aumento da qualidade dos produtos bem como o incremento na sua vida de prateleira estão sendo amplamente discutidos (ZHANG et al., 2010).

Segundo Anquier (1997), o autor desta descoberta foi um padeiro que morava às margens do Nilo e que misturou, por acaso, um pedaço da massa velha à massa que fazia naquele dia. Ao colocar o pão para assar o padeiro teria sido surpreendido por uma massa crescida e mais leve. Chegou-se assim a um dos primeiros processos fermentativos da humanidade.

Em geral, a fermentação natural aumenta a concentração dos compostos fenólicos da farinha de trigo (KATINA et al, 2005) e auxilia na atividade da fitase, degradando o ácido fítico, um excelente quelante de minerais tais como Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} e Zn^{++} , melhorando, assim, a biodisponibilidade destes nutrientes na dieta (FEBLES et al., 2002).

3.5 Fermento natural

O fermento natural é o resultado da cultura simbiótica entre bactérias e leveduras, encontrados no meio ambiente e na própria farinha (CANELLA-RAWLS, 2006). Consiste em uma mistura geralmente composta por farinha de trigo e água, sendo fermentada por leveduras e bactérias ácido lácticas (CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST, NEYSENS, 2005; DE VUYST, VANCANNEYT, 2007; DE VUYST et al., 2009). O fermento natural também pode ser obtido utilizando frutas, iogurte, tubérculos e raízes amiláceas (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

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 bactérias ácido

láticas (BAL) ($\geq 10^8$ UFC·g⁻¹) em comparação com leveduras ($\geq 10^7$ UFC·g⁻¹). O fermento natural, por natureza, é composto por bactérias ácido lácticas (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 microrganismos que habitam esse meio fermentativo (GOBBETTI; GANZLE, 2007).

Arendt et al. (2007) observaram a influência do fermento natural na textura dos produtos e outros efeitos positivos nas propriedades tecnológicas, nutricionais e funcionais dos pães. Além disso, o uso do fermento natural proporciona ótima qualidade em sabor e conservação nos produtos finais obtidos (HAMMES et al., 2005). Por esse motivo, o uso de fermento natural em produtos panificados tem sido melhorado nos últimos tempos e hoje sabemos que, durante o processo, as leveduras e as bactérias presentes produzem componentes que são responsáveis pelas características específicas de produtos feitos por fermentação natural como, por exemplo, presença de ácido láctico e acético que proporcionam aromas específicos (BIANCHINI, 2004).

O ácido láctico, liberado pelas BAL, é responsável pelo retardo da fermentação, pois em concentrações elevadas, tanto a bactéria láctica quanto as leveduras são inibidas. Este é o fator crucial que torna a fermentação natural mais lenta que a convencional (SUAS, 2012). No entanto existe consenso por parte dos pesquisadores a respeito dos efeitos positivos do fermento natural na produção de pães, tais como o incremento de volume, melhora da estrutura da casca (CORSETTI et al., 2000; CROWLEY et al., 2002) e o aumento da vida de prateleira (LAVERMICOCCA et al., 2000).

Zhang et al. (2010) relatam que a adição de fermento natural, com linhagens específicas de *Lactobacillus*, no processo de panificação permite a acumulação de propionato e representa um processo para aumentar as capacidades antifúngicas no pão e sugere que modificações nos processos utilizados atualmente podem permitir uma fermentação utilizando fermento natural sem o uso de conservantes artificiais em escala industrial.

3.5.1 Produção de fermento natural

De acordo com o processo de inoculação, três maneiras de produção de fermento natural podem ser distinguidas (CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST, NEYSENS, 2005; DE VUYST, VANCANNEYT, 2007; DE VUYST et. al., 2009). A primeira representa um processo de fermentação espontânea de fermento natural com base em *backslopping*, ou seja, com a incorporação, repetidas vezes, de farinha e água mantendo parte da produção anterior, sendo chamada esta de massa mãe, tradicionalmente realizada à temperatura ambiente (25-28°C). Graças à habilidade e manutenção de massas mãe, durante anos, uma enorme variedade de produtos de padaria produzidos a partir de fermento natural existe.

Considerando que a farinha abriga vários microrganismos, abrangendo várias leveduras e bactérias, incluindo diversas espécies, a estabilidade do fermento natural deste tipo é alcançada dentro de uma semana (SIRAGUSA et. al., 2009; VAN DER MEULEN et. al., 2007; WECKX et al., 2011).

Dessa forma, as características e a qualidade (enzimática, microbiológica e nutricional) da farinha utilizada são de extrema importância, já que esta matéria prima é de fato uma importante fonte de nutrientes (aminoácidos, ácidos graxos, sais minerais e vitaminas), enzimas endógenas, bactérias ácido lácticas e leveduras (VAN DER MEULEN et al., 2007; SCHEIRLINCK et al., 2009; VRANCKEN et al., 2010).

A segunda maneira de se produzir um fermento natural é a partir do resultado da adição de uma cultura de arranque, adicionada a mistura de farinha e água. Em geral, tais fermentações são realizadas em temperatura mais elevadas (acima de 30°C) e geralmente duram de um a três dias. Os fermentos produzidos dessa maneira são comercializados como produtos semi-líquidos, tratados termicamente, ou secos (GAGGIANO et al., 2007).

E por fim, a terceira maneira de produzir um fermento natural é adicionando uma cultura de arranque (geralmente uma estirpe de bactéria ácido láctica) a uma massa mãe iniciada no formato tradicional (por *backslopping*) evoluindo, conforme as etapas descritas anteriormente, para uma fermentação controlada em laboratório que poderá servir de cultura para a fabricação de outros produtos (SIRAGUSA et al., 2009).

Em um trabalho sobre produção de fermento natural semi-líquido, Gaggiano et al. (2007) propuseram um protocolo para a produção e uso de uma massa fermentada contendo várias espécies de bactérias ácido lácticas e leveduras a fim de satisfazer as exigências industriais. Este trabalho representa uma ferramenta muito interessante a nível industrial do fermento para obter produtos com qualidade superior aos preparados de outro modo. No entanto os autores sugerem mais pesquisa para definir a influência deste tipo de fermento na textura e nas propriedades sensoriais dos produtos de panificação.

A fermentação espontânea ocorre a partir de uma microflora naturalmente presente na matéria-prima e o fermento natural (ou *sourdough*) contém principalmente uma cultura simbiótica de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras (SAEED et al., 2009). Autores afirmam que essa mistura, combinada de cultura simbiótica, é responsável pela acidificação da massa, pela síntese de alguns aromas e compostos antifúngicos e também pela qualidade nutricional do produto, uma vez que diminui ou aumenta os níveis de compostos, aumentando ou retardando a biodisponibilidade de nutrientes (POUTNANEN et al., 2009).

Sabe-se que a adição de farinha de trigo integral no preparo de um fermento natural é favorável, pois aumenta a carga microbiana no momento da fermentação (POUTANEN et al., 2009). Durante o processamento do grão de trigo, boa parte da carga microbiana é removida nas etapas de moagem e peneiramento, logo, quanto mais integral a farinha de trigo utilizada nos processos de fermentação melhor, pois haverá maior disponibilidade de microrganismos e nutrientes (POUTANEN et al., 2009).

3.5.2 Aspectos microbiológicos do fermento natural

Bianchini (2004) aborda a identificação dos microrganismos presentes em fermentos naturais de farinha de trigo branca, e nesse trabalho o pesquisador encontrou composições muito próximas (Figura 1): 30% das bactérias lácticas isoladas foram *Lactobacillus sanfranciscensis*, 20% foram *Lb. alimentarius*, 14% foram *Lb. brevis*, 12% foram *Leuconostoc citreum*, 7% foram *Lb. plantarum*, 6%

foram *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4% foram *Lb. fermentum* e *Lb. acidophilus*, 2% foram *Weissela confusa* e 1% foi *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.

Segundo trabalho de LACUMIN et al. (2009) a caracterização de um fermento natural pode ser realizada por meio da utilização de técnicas analíticas combinadas, incluindo contagem de placa, isolamento e identificação bioquímica para explorar as comunidades microbianas dentro de um fermento natural.

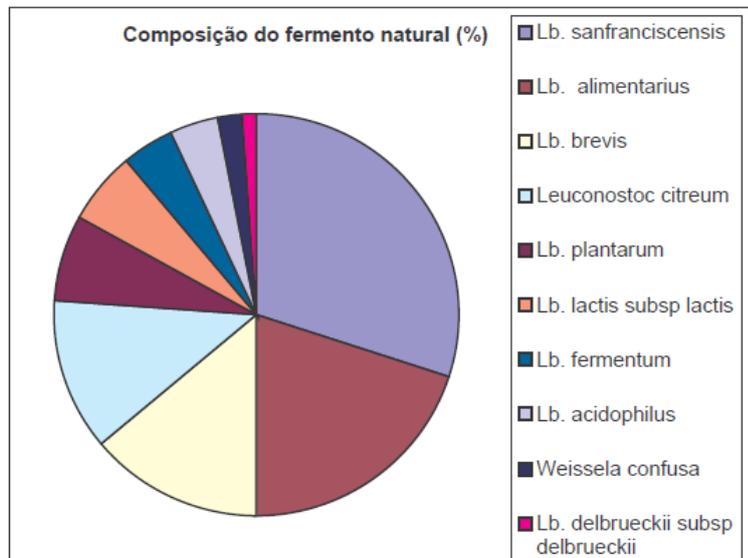


Figura 1 – Microrganismos presentes no fermento natural

Fonte: BIANCHINI (2004).

Já Wood (1998) aponta o *Lactobacillus plantarum*, como o principal microrganismo encontrado nos fermentos naturais, seguido das espécies heterofermentativas *L. brevis* e *L. fermenti* que produzem etanol, CO₂ e também ácido acético, que conferem às massas ácidas aromas característicos. As leveduras freqüentemente encontradas são *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida holmii*.

3.5.3 Mudanças Físico-Químicas

O fermento natural inclui, obrigatoriamente, bactérias homofermentativas e facultativamente, bactérias ácido lácticas heterofermentativas (HAMMES; VOGEL, 1995), mas, ao contrário da maioria das outras produções de alimentos fermentados, o papel mais determinante destas bactérias em produtos fermentados naturalmente é desempenhado pelas cepas heterofermentativas. Isto é devido à produção de ácido acético e do ácido láctico a partir da fermentação de hidratos de carbono.

O ácido acético contribui fortemente para o aroma e a estrutura dos produtos finais (CORSETTI; SETTANNI, 2007). Além disso, as espécies heterofermentativas contribuem parcialmente para o processo de fermentação de massa (GOBBETTI et al., 1995). A produção de ácido nos fermentos naturais é de responsabilidade, quase que inteiramente, das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (CORSETTI; SETTANNI, 2007).

A temperatura de fermentação é um fator determinante na dinâmica e na cinética dos metabólitos formados no processo fermentativo de um fermento natural (BANU et al., 2011; DECOCK; CAPPELLE, 2005; KATINA et al., 2006; VOGELMANN; HERTEL, 2011). É observado um aumento da produção de ácido láctico em temperaturas mais altas (> 30°C) de fermentação, favorecendo a acidificação. Alternativamente, as temperaturas baixas (25-28°C) favorecem o crescimento das leveduras, a produção de etanol e a formação de sabor (MORONI et al., 2011; VOGELMANN & HERTEL, 2011).

A acidificação, a temperatura ambiente e o processamento lento criam um ambiente propício para as enzimas endógenas da farinha de trigo exercerem suas funções. O fermento natural, quando aplicado corretamente, exerce influências não só na qualidade sensorial, textura e prazo de validade, mas também pode ter um impacto significativo sobre as propriedades nutricionais dos alimentos fermentados (POUTANEN, 2014).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias ácido lácticas melhora o volume, a textura e aumenta o teor de fibra dietética nos pães fermentados por fermento natural (KORAKLI et al., 2003; PEPE et al., 2004). No entanto, o efeito benéfico de exopolissacarídeos em relação a textura dos pães pode ser mitigado pela acidez excessiva (GALLE; ARENDT, 2013). Em um trabalho anterior

(PALOMBA et al., 2012), foi observado que uma massa de pão tipo *sourdough* obtida com cepas selecionadas de bactérias ácido lácticas produtoras de EPS, após 15 horas de fermentação a 30 °C, resultou em pães com melhores propriedades viscoelásticas.

Logo, provavelmente, as cepas produtoras de exopolissacarídeos (EPS) e as condições de fermentação precisam ser encontradas para maximizar a produção de EPS, ao mesmo tempo aperfeiçoar a produção de ácido láctico, dentro do aceitável, para conseguir a estrutura do miolo e sabor desejado dos pães. Assim, quando cepas de bactérias ácido lácticas produtoras de EPS são selecionadas para aplicações em pães tipo *sourdough*, os metabólitos formados, o valor do pH no final da fermentação e a concentração de ácido láctico devem ser consideradas (TORRIERI et al., 2014).

A este respeito vários autores têm relatado efeitos benéficos da acidificação biológica nas características envolvendo a qualidade dos pães devido aos metabólitos formados durante a fermentação (KADITZKY et al., 2008; PEPE et al., 2004) e, em particular, por causa da atividade proteolítica das bactérias ácido lácticas (THIELE et al., 2004).

3.6 Pães com fermento natural (tipo *sourdough*)

Pães elaborados com fermento natural, também conhecidos como *sourdough*, apresentam vantagens relacionadas com a textura, sabor e vida de prateleira. Além disso, possuem modificações enzimáticas endógenas, de acordo com a matriz de cereais utilizada, que acabam refletindo em produtos com menor teor de glúten contribuindo para o sucesso do uso de fermento (DE VUYST et al., 2014).

O fermento natural, com sua capacidade de melhorar a qualidade e prolongar a vida de prateleira de pão tem sido amplamente descrito (ARENDETT et al., 2007; GOCMEN et al., 2007; KATINA et al., 2006). Fermentação utilizando fermento natural pode retardar o endurecimento do pão fabricado com farinha de trigo e ainda reduzir o índice glicêmico do pão elaborado com farinha de centeio (KATINA et al., 2005; SCAZZINA et al., 2009).

Embora que as bactérias ácido lácticas (BAL) estão primariamente envolvidas no desenvolvimento das características sensoriais de massa fermentada, vários produtos gerados durante a fermentação por leveduras também contribuem para a melhoria da complexidade organoléptica das massas resultantes de fermentação natural (VALMORRI et. al., 2010).

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

O uso de fermento natural seco na produção de pães tende a simplificar o processo de fabricação de pães especiais em padarias, tendo como vantagem a elaboração de pré-misturas funcionais ao alcance de qualquer estabelecimento. Os fermentos naturais na forma seca garantem um padrão e uniformidade no produto final devido suas características da qualidade e a possibilidade de variações de dosagem na receita além da utilização como *starters* para outros tipos de fermentos (MEUSER et. al., 1995).

Para a produção de um fermento natural (GAGGIANO et. al., 2007), cepas definidas como cultura *starter* são escolhidas com base, principalmente, na sua capacidade de acidificar rapidamente a mistura de farinha e água e/ou a sua capacidade para produzir sabores específicos. Exemplos dessas cepas são, por exemplo, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* e *Lb. sanfranciscensis*, que são utilizados, com ou sem o acompanhamento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estudos sobre a microbiota de fermento natural produzido a partir de diferentes cereais diferentes (CORSETTI & SETTANNI, 2007) têm revelado uma grande biodiversidade da microflora e contribuído para aumentar o interesse pelas culturas *starters*, especialmente para aquelas que apresentam propriedades de reforço nutricional e aspectos de qualidade sensorial satisfatórios.

O fermento natural, se utilizado corretamente, pode melhorar o volume, a textura, o sabor e o valor nutricional dos pães tipo *sourdough*, aumentando a vida de prateleira, retardando o processo de endurecimento do pão e protegendo o pão da deterioração bacteriana e causada por fungos (GOBBETTI et al., 2008).

O fermento natural tem sido tradicionalmente usado como agente de fermentação em produtos especiais, porém poucas padarias empregam o fermento natural em escala industrial. O uso industrial deste tipo de fermento visa predominantemente, a melhoria da qualidade do pão e a substituição dos aditivos. Para tanto, vem sendo desenvolvidas tecnologias de fermentação e novos fermentos com propriedades metabólicas definidas (GOBBETTI & GÄNZLE, 2007; BRANDT, 2007).

A fermentação dos pães tipo *sourdough* pode ser diferenciada do processo convencional (fermentação direta) através de dois fatores principais: em primeiro lugar, a presença de bactérias ácido lácticas aumenta o potencial metabólico deste grupo heterogêneo de microrganismos sobre o potencial metabólico de leveduras (DECOCK & CAPELLE, 2005; VUYST & NEYSENS, 2005). Em segundo lugar, o tempo de fermentação de processos com fermento natural varia entre 8 horas (utilizando a esponja) a mais de 144 horas (BRANDT, 2007). Este tempo de fermentação longo comparado com os processos de fermentação direta permite uma contribuição substancial de enzimas endógenas para as conversões bioquímicas na massa de pão.

Uma acidez acentuada pode afetar negativamente a qualidade do pão, uma vez que pode causar sabores desagradáveis e reduzir volume do pão, bem como sua suavidade (KADIZKY et al., 2008). Estes resultados estão de acordo com Katina et al. (2009) que observaram uma diminuição de aproximadamente 10% no volume do pão na presença de 40% de fermento natural em comparação com o tratamento controle (sem fermento natural). Normalmente, o nível de adição de fermento natural no preparo de pães de trigo é entre 7,5 e 10% sob o peso de farinha (LORENZ & BRUMMER, 2003), uma vez que intensa acidificação pode diminuir o volume do pão (KADITZKY et al., 2008).

Segundo Torrieri et al. (2014), a adição de 30% de fermento natural, juntamente com bactérias ácido lácticas produtoras de exopolissacarídeos (EPS), teve um efeito positivo sobre o volume do pão e a textura do miolo. Os pães fabricados com 30% de fermento natural apresentaram maior teor de umidade, melhores propriedades mecânicas durante o armazenamento do que as amostras elaborados com 20% de fermento natural (TORRIERI et al., 2014). Além disso, o uso de 30% de fermento natural mostrou um efeito protetor sobre o endurecimento do pão, confirmando, assim, o efeito da concentração de fermento e o papel positivo

dos compostos formados pelas bactérias ácido lácticas com propriedades funcionais (GALLE & ARENDT, 2013).

Como relatado por Gocmen et al. (2007), os efeitos de melhoria de um fermento natural e utilizado para a fermentação de pães tipo *sourdough* bem como seu desempenho é dependente da temperatura de incubação, do nível de fermento natural adicionado e do tempo de fermentação final.

3.7 Conservação do pão

Os produtos de padaria, em geral, apresentam um tempo de vida muito curto e a qualidade desses produtos está relacionada com o período de tempo entre o cozimento e consumo. Durante o armazenamento, o pão perde a sua qualidade em fatores como o aumento na dureza do miolo produzindo a perda de aceitação do consumidor conhecido como endurecimento (ARENDETT et al., 2007).

O envelhecimento tem sido definido como "um termo que indica a diminuição da aceitação do consumidor por produtos de padaria causada por mudanças na estrutura e nas características dos produtos diferentes daquelas provenientes da ação de microrganismos de deterioração" (ARENDETT et al., 2007). O processo geral de envelhecimento é causado principalmente por dois processos distintos: o efeito de firmeza causado pela transferência de umidade do miolo para a casca e a firmeza intrínseca do material da parede celular, que está associada por sua vez à recristalização do amido durante o armazenamento (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

As embalagens com atmosfera modificada, irradiação e adição de conservantes estão entre as ferramentas mais utilizadas para a prevenção da deterioração no pão (CORSETTI & SETTANNI, 2007). A utilização de fermento natural representa uma ferramenta natural para melhorar a vida de prateleira de pão, uma vez que pode impedir que a deterioração microbiana e também retardar o envelhecimento do pão. A acidificação é bastante importante para a conservação do pão. O pH do fermento natural (4,5-3,5) pode inibir microrganismos deteriorantes como *Bacillus subtilis* ou *Clostridium*, os quais causam o *rope*, um tipo de esporo bastante resistente ao calor, que permanece vivo após o processo de panificação. Um dos mais comuns é o *Bacillus subtilis*, cujos esporos vivos podem se multiplicar

rapidamente, sob certas condições, para produzir o *rope*. Estas bactérias não causam doenças nos seres humanos, mas propiciam a desintegração do miolo transformando-o em uma massa castanha, gomosa e com odor desagradável de decomposição (EI-DASH, 1982).

Em relação aos bolores, a vida de prateleira dos pães tipo *sourdough* é maior do que o de pães fermentados com levedura comercial (WOOD, 1998). Dessa forma, o uso de fermento natural associado a técnicas de processamento podem resultar em pães isentos de aditivos químicos e com maior vida de prateleira.

3.8 Liofilização

Liofilização é um processo de estabilização, no qual uma substância é previamente congelada e então a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção, para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas (atividade de água baixa); e passam pelos processos de congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária (RATTI, 2001). O congelamento deve ser rápido para que se formem microcristais de gelo, pois ao contrário pode causar rompimento da membrana celular e conseqüente perda do líquido citoplasmático, ocasionando perdas em qualidade (OLIVEIRA et al., 2012).

A vantagem deste processo são as mínimas perdas de nutrientes e uma rápida reidratação do produto seco. Por este motivo, mostra-se aplicável à indústria de alimentos já que proporciona a obtenção de produtos de alto valor agregado, no entanto, quanto menores as perdas nutricionais mais onerosos são os processos de secagem, sendo a liofilização a melhor operação para obter esse resultado (OLIVEIRA et al., 2012).

A liofilização, que é considerada um dos mais efetivos métodos de preservação para a maioria dos microrganismos, consiste na remoção do vapor de água diretamente de amostras congeladas e continuada secagem sob vácuo, até produção de material estável. Embora a liofilização como método de preservação de leveduras promova alta taxa de morte, a viabilidade celular remanescente

permanece estável durante o período de estocagem (SILVA et al., 1992; COSTA & FERREIRA, 1991; JAY, 2005).

3.8.1 Trealose

A trealose, um hidrato de carbono de armazenamento conhecido em bactérias e fungos funciona como protetor aos estresses de congelamento e descongelamento (MOMOSE et al., 2010), preservando a integridade da membrana plasmática e estabilizando proteínas (MAHMUD et al., 2009).

A trealose é conhecida por seu papel protetor contra muitos estresses ambientais (BANDARA et al. de 2009). Este açúcar parece desempenhar dois papéis muito importantes relacionados à proteção dos microrganismos que são: a preservação da integridade da membrana através da substituição da água e da ligação com os grupos polares de fosfolipídios e a estabilização de proteínas durante as injúrias causadas na célula, mantendo estável a conformação que a molécula poderia sofrer durante o de congelamento (MAGAZÚ et al., 2005).

Originalmente, a trealose, juntamente com o glicogênio, era considerada substâncias de reserva energética para a levedura, porém, recentemente, vários autores (STRASSER et al., 2009 ;DE GIULIO et al., 2005) sugerem que a trealose possua função de proteção para a célula de levedura durante processos de estresse, tais como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação.

Além de agir protegendo os microrganismos em condições industriais estressantes, a trealose foi estudada (TREVISOL et al., 2011) em algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a fim de verificar se havia algum efeito relacionado com a produção de etanol e esses autores observaram que a trealose também causa uma melhoria na capacidade fermentativa e de conservação destas leveduras

Trealose e sacarose são capazes de preservar a estrutura e a funcionalidade de proteínas isoladas durante a secagem. Esta habilidade de estabilizar as proteínas resulta da formação de ligações de hidrogênio com proteínas quando a água é removida, prevenindo assim, a sua desnaturação (LESLIE et. al., 1995).

Em um trabalho de De Giulio et al. (2005), o efeito de crioprotetores na taxa de sobrevivência de diferentes cepas de bactérias ácido lácticas após os procedimentos de congelamento ou liofilização, foi comparado e a partir dos resultados eles concluíram que o efeito protetor da trealose foi evidente para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e que a trealose poderia ser facilmente utilizada tanto para melhorar a viabilidade de culturas como para obter formulações probióticas mais resistentes a uma variedade de condições de stress.

O uso de trealose tem se mostrado bastante eficaz em sistemas que utilizam o congelamento, pois reduz os danos mecânicos causados nas estruturas celulares durante a formação de cristais de gelo (CROWE et al., 1996). Alguns autores observaram que a presença destes solutos em água tem, na verdade, um efeito sobre a rede de ligações do hidrogênio com a água, reduzindo a quantidade de água congelável a baixas temperaturas (BRANCA, et al., 1999).

A utilização de trealose mostrou ser um potente estabilizador na liofilização de lipossomas e biomacromoléculas considerando a resistência contra as alterações causada pela água absorvida (IZUTSU et al., 2011).

Um número crescente de publicações (SELVA et al., 2013; NERI et al. 2014) relata sobre a eficácia da trealose na preservação de microrganismos sob condições ambientais adversas, tais como temperaturas extremas e processos de secagem. Embora o mecanismo pelo qual este dissacarídeo exerça sua proteção ainda esteja em discussão seu uso como estabilizador está sendo cada vez mais estudado e aprimorado.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1

PRODUCTION AND LYOPHILIZATION OF NATURAL YEAST

PRODUÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DE FERMENTO NATURAL

*Artigo em fase final de revisão. Após as considerações da comissão examinadora, o artigo será traduzido para o inglês e submetido à revista *Brazilian Journal of Microbiology*.
Configuração e formatação segundo as normas da revista (Anexo A).

PRODUÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DE FERMENTO NATURAL
PRODUCTION AND LYOPHILIZATION OF NATURAL YEAST

Raquel Facco Stefanello^{1*}, Leadir Lucy Martins Fries², Cristiano R. Menezes²,
Amanda Aimée Rosito Machado³

^{1*}Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Av. Roraima nº1000 – Cidade universitária – Bairro Camobi – Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: raquelfacco@hotmail.com

²Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Av. Roraima nº1000 – Cidade universitária – Bairro Camobi – Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: lucymicro@yahoo.com.br

³Graduanda em Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Av. Roraima nº1000 – Cidade universitária – Bairro Camobi – Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: amanda.rosito@gmail.com

PRODUÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DE FERMENTO NATURAL

PRODUCTION AND LYOPHILIZATION OF NATURAL YEAST

RESUMO

O fermento natural pode ser produzido de várias maneiras e com uma variedade de matérias primas. A manutenção de um fermento natural necessita de cuidados especiais e a sua utilização, na forma de um fermento natural fresco não confere uma padronização nos produtos fabricados em função das transformações durante o processo. A liofilização já vem sendo usada para a conservação de fermento biológico comercial, no entanto essa tecnologia não é muito difundida para o fermento natural. O objetivo desse trabalho foi produzir um fermento natural a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral e avaliar a viabilidade celular após a liofilização com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%). Observou-se um efeito crioprotetor nas amostras de fermento natural liofilizado contendo 10 (FNL 10) e 15% (FNL 15) de trealose pelas contagens microbiológicas de bactérias ácido lácticas (BAL) e de bolores e leveduras (LEV) nos estados fresco (-3), congelado (-2), liofilizado (0) e durante os 45 dias de armazenamento das amostras após o processo de liofilização.

Palavras-chave: Fermento natural. Liofilização. Trealose. Viabilidade celular.

ABSTRACT

The natural yeast can be produced in various ways and with a variety of raw materials. The maintenance of a natural yeast needs special care, because for the fermentation to be successful it is necessary that the microorganisms are in ideal growing conditions to obtain a quality product, but with all these aspects, the use of a fresh natural yeast does not provide a standardization in the products manufactured according to the transformation during the process. The lyophilization is already being used for the conservation of commercial yeast, however this technology is not widely disseminated to the natural yeast. The aim of this work was to produce a natural yeast from white wheat flour and whole wheat flour and evaluate the cell

viability after lyophilization with different concentrations of trehalose (0, 10 and 15%). It was observed a cryoprotectant effect on the samples of natural yeast lyophilized containing 10 (FNL 10) and 15% (FNL 15) of trehalose by microbiological counts of lactic acid bacteria (LAB) and of molds and yeasts (LEV) in fresh state (- 3) frozen (- 2), lyophilized (0) and during the 45 days of storage of the samples after the process of lyophilization.

Key-words: Natural yeast. Lyophilization. Trehalose. Cellular viability.

INTRODUÇÃO

De acordo com o processo de inoculação, três maneiras de produção de fermento natural podem ser distinguidas (CORSETTI, SETTANNI, 2007; DE VUYST, NEYSENS, 2005; DE VUYST, VANCANNEYT, 2007; DE VUYST et. al., 2009). A primeira representa um processo de fermentação espontânea de fermento natural com base em *backslopping*, ou seja, com a incorporação, repetidas vezes, de farinha e água mantendo parte da produção anterior, tradicionalmente realizada à temperatura ambiente ou em temperaturas mais altas.

Outra forma de produção de fermento natural é o resultado da adição de uma cultura de arranque, adicionada a mistura de farinha e água. Em geral, tais fermentações são realizadas em temperatura mais elevada do que no processo *backslopping* e geralmente duram de um a três dias (GAGGIANO et al., 2007).

E por fim, a terceira forma de produzir um fermento natural é adicionando uma cultura de arranque (geralmente uma estirpe de bactéria ácido láctica) a uma massa iniciada no formato tradicional (*backslopping*) evoluindo, conforme as etapas descritas anteriormente, para uma fermentação controlada em laboratório que poderá servir de cultura para a fabricação de outros produtos (SIRAGUSA et al., 2009).

A preocupação com a manutenção desses fermentos iniciou-se simultaneamente à descoberta dos meios artificiais de cultivo, pois a viabilidade celular dos microrganismos e a padronização dos produtos sempre foram consideradas essenciais. Embora a liofilização como método de preservação de leveduras promova alta diminuição da viabilidade, a viabilidade celular remanescente

permanece estável durante o período de estocagem (SILVA et al., 1992; COSTA e FERREIRA, 1991; JAY, 2005).

A liofilização, uma técnica baseada na remoção de água por sublimação, é usada para obter diversos produtos industriais (SANTO et al, 2013). O fermento biológico comercial já existe na forma instantânea devido ao processo de liofilização. No entanto, há poucos estudos na literatura que abordem a liofilização de um fermento natural para ser aplicado a nível industrial no preparo de pães. Para tanto a sobrevivência dos microrganismos submetidos ao processo de liofilização deve ser estudada. Em um estudo recente (SELVA et al., 2013) os autores relatam sobre a eficácia da trealose na preservação de microrganismos sob condições ambientais adversas, tais como temperaturas baixas e processos de secagem.

O presente estudo visa produzir um fermento natural a partir da mistura de farinha branca e farinha integral de trigo e avaliar a viabilidade celular desse fermento frente ao processo de liofilização na presença de um agente crioprotetor, a trealose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria prima

As farinhas utilizadas nesse trabalho foram obtidas pelas empresas Adelino Antoniazzi Indústria Moageira Ltda. (Santa Maria, RS) e Cisbra® (Panambi, RS). A trealose utilizada no congelamento das amostras de fermento foi fornecido pela Prozyn® (São Paulo, SP). A água mineral utilizada para o preparo dos fermentos naturais foi adquirida no comércio local. O extrato de malte foi adquirido pela empresa Alquimia da Cerveja (Porto Alegre, RS).

As farinhas utilizadas no preparo do fermento natural foram armazenadas em sacos plásticos, em porções individuais, com aproximadamente um quilo cada, e foram conservadas em freezer (-20°C) a fim de retardar as reações enzimáticas e manter as características microbiológicas deste produto durante a realização deste trabalho. Laudos com especificações técnicas sobre a matéria-prima encontram-se na seção dos Apêndices.

Análises na matéria prima

Foram determinados o extrato etéreo, proteína, cinzas, fibra alimentar (solúvel e insolúvel) e carboidratos dessas farinhas segundo as metodologias do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Essas análises foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da UFSM, em triplicata.

Análise microbiológica das farinhas de trigo branca e integral

Para a análise microbiológica das farinhas, vinte e cinco gramas de cada amostra foi suspensa em 225 mL de água salina peptonada, homogeneizada em BagMixer durante 1 minuto e a seguir a diluição em série. As contagens de BAL foram realizadas utilizando agar MRS e as placas foram incubadas anaerobicamente durante 48 h a 36° C (American Public Health Association, 2001). Para a contagem de bolores e leveduras foi utilizado o ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico até pH 3,5 (Brasil, 2003). As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata, e os valores expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

Produção e propagação do fermento natural

A produção e propagação do fermento natural foram adaptadas de algumas metodologias (Abrahão, 1999; Suas, 2012; ; Minervini, 2007; Minervini, et al., 2011)

Para tanto, o fermento natural foi preparado a partir de 70g de farinha de trigo branca (Antoniazzi Ind. Moageira Ltda), 70g de farinha integral de trigo (Farinhas Integrais CISBRA Ltda.), 3g de extrato de malte (UNIMALT-WC) e 120 ml de água deionada para preparar 263g de massa. O fermento natural em elaboração foi colocado em um becker de 1L, esterilizado e incubado por 14 dias (336h) em estufa bacteriológica (Cienlab), a temperatura de 30°C e adaptada para manter umidade relativa em torno dos 70% (Moroni et. al., 2011). A partir do 3° dia e a cada 12h, o fermento foi alimentado retirando-se 150g de massa do lote anterior e a essa porção adicionou-se mais 50g de farinha de trigo branca e 50 ml de água mineral (Conforme Apêndice G).

Liofilização do fermento natural

No 14º dia de alimentação, o fermento natural fresco (FNF) foi dividido em três béquers com 600g de massa. Em cada béquer foi adicionado uma concentração diferente de trealose, assim o tratamento FNF 0 não recebeu trealose (0%), o tratamento FNF 10 recebeu 60g (10%) e o tratamento FNF 15 recebeu 90g de trealose (15%). Dessa forma, os tratamentos FNF 0, FNF 10 e FNF 15 ficaram, respectivamente, com 600g, 660g e 690g de conteúdo do fermento natural produzido. Em recipientes esterilizados, com capacidade para 60g aproximadamente, os tratamentos foram sendo divididos em porções individuais, contendo de 50 a 60 g de massa. Após o preenchimento dos recipientes com os tratamentos do fermento natural, os potes foram lacrados e levados para o ultrafreezer (Thermo Scientific 900 series, USA) para serem congelados (-80 °C por 24 horas).

A liofilização dos fermentos naturais produzidos foi realizada num liofilizador LS 3000 (Terroni Equipamentos, São Paulo, Brasil) e a metodologia seguiu a descrita por Strasser *et al.* (2009), com adaptações. As amostras ficaram 60 horas no aparelho (vácuo: 0,200-0,300 mmHg e temperatura do condensador: -37 °C). Após a liofilização, as amostras de fermento natural foram moídas em moinho analítico básico (ITASUL) e reservadas para as demais análises.

Os fermentos naturais liofilizados foram armazenados a temperatura ambiente, em embalagens metálicas (Tradbor), com sistema de fechamento simples (em forma de zíper) e foram usadas para as análises e conservados em local seco, sem odores e ventilado até a última análise em cada repetição do experimento (viabilidade monitorada durante 45 dias, com uma periodicidade de 15 dias).

Análises no fermento natural fresco e liofilizado

Análises físico-químicas

No fermento natural fresco, foi analisado pH em potenciômetro Digimed®, acidez total titulável (Lacumin et al, 2009) nos dias 1, 4, 6, 8, 10 e 14. Ao final dos 14 dias, a umidade (AOAC, 1995) e a atividade de água (Aa) foi medida diretamente,

por meio de um analisador de atividade de água da marca AquaLab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25 °C).

Após o término do processo de liofilização, o rendimento dos fermentos naturais liofilizados (sem trealose (FNL 0), com 10% de trealose (FNL 10) e com 15% de trealose (FNL 15) foi calculado através da fórmula $PI \times R = 100 \times PF$ com base na pesagem dos recipientes contendo as amostras, onde PI = peso inicial (g), R = rendimento (%) e PF = peso final (g). A umidade (AOAC, 1995) dos fermentos naturais liofilizados (FNL 0, FNL 10 e FNL 15) e a atividade de água (Aa) foi medida diretamente, por meio de um analisador de atividade de água da marca AquaLab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25 °C).

Análises microbiológicas

No fermento natural fresco, antes e após o congelamento e liofilizado foram realizadas as contagens de bactérias lácticas (BAL) (American Public Health Association, 2001) e de bolores e leveduras (Brasil, 2003) conforme descrito no item 2.2.

A contagem dos microrganismos no fermento natural fresco sem a adição de trealose e antes de ser liofilizado foi avaliada nos dias 1, 4, 8 e 14 de produção. As demais contagens foram realizadas nos fermentos naturais já adicionados de trealose antes e após o congelamento e depois de serem liofilizados, nos dias 0, 15, 30 e 45 dias.

Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Foram avaliados três fermentos e seis tempos resultando em 18 tratamentos. Os dados foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey considerando o nível de significância de 5%. O modelo matemático adotado foi o seguinte: $y_{ijk} = \mu + F_i + T_j + (F * T)_{ij} + rep_k(F)_i + \varepsilon_{ijk}$. Em que: y= variáveis dependentes; μ = média geral de todas as observações; F_i = efeito do tipo de fermento ($i= 1...3$); T_j = efeito dos tempos ($j= 1...6$); $(F * T)_{ij}$ = efeito da interação tipo de fermento * tempo; $rep_k(F)_i$ = erro a ($k= 1...4$); ε_{ijk} = erro aleatório residual (erro b). Foi utilizando o software SAS Versão 9.4 (Statistical Analysis

Sistema Institute Inc., EUA). As análises microbiológicas foram realizadas em três tipos de fermentos naturais liofilizados (F_i) em seis períodos de tempo (T_j). Os fermentos naturais liofilizados variaram de acordo com a concentração de trealose adicionada (0% para FNL 0; 10% para FNL 10 e 15% para FNL 15) e os períodos conforme o estado (-3 para Fresco; -2 para Congelado; 0 para Liofilizado) e também pelo número de dias decorridos após o processo de liofilização (15, 30 e 45 dias). O estado fresco quer dizer que os fermentos naturais foram analisados após 14 dias de fabricação, no estado congelado foi imediatamente após a retirada do ultrafreezer, no estado liofilizado foi imediatamente após a retirada do liofilizador e os demais estados conforme o número de dias decorridos após o processo de liofilização. Todo experimento foi repetido três vezes com análises em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises na matéria prima

A farinha de trigo branca apresentou uma umidade de 12,37%, cinzas (0,46%), proteínas (10,52%), fibra bruta (1,16%), extrato etéreo (0,89%) e carboidratos (74,59%), enquanto que a farinha de trigo integral apresentou para os mesmos parâmetros 9,63%, 1,54%, 11,89%, 2,68%, 1,59% e 72,66% respectivamente. O teor de umidade das farinhas de trigo branca (12,37%) e de trigo integral (9,63%) se encontrava dentro do padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 1996).

Tabela 1: Contagens de bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras (LEV) nas amostras de farinha de trigo branca e de farinha de trigo integral.

	Farinha de trigo branca	Farinha de trigo integral
BAL	2,90 ^a ± (0,58)	3,41 ^a ± (0,13)
LEV	1,63 ^b ± (0,27)	4,25 ^a ± (0,08)

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si estatisticamente na linha ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O resultado das contagens de bactérias ácido lácticas na farinha de trigo branca foi de 2,90 log UFC·g⁻¹ e de 3,41 log UFC·g⁻¹ na farinha de trigo integral, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). A contagem de bolores e leveduras foi de 1,63 log UFC·g⁻¹ para farinha de trigo branca e 4,25 log UFC·g⁻¹ para farinha de trigo integral apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras (Tabela 1). O presente estudo optou por produzir um fermento natural a partir de farinha integral devido a característica deste tipo de farinha de conter a microbiota de leveduras em maior número que na farinha de trigo branca (Tabela 1).

Análises no fermento natural fresco (FNF)

Grande parte das modificações físico-químicas em um fermento natural são conseqüências dos metabólitos formados e liberados pelas bactérias ácido lácticas e pelas leveduras (Minervini et. al., 2012; Vrancken et. al., 2011).

Segundo Board (1995), o pH entre 3,9 e 4,5 é o ideal para utilizarmos um fermento natural como agente fermentativo no pão. Quando recém alimentado, o fermento natural possui um pH em torno de 5,5 e, 12 horas depois, seu pH já está próximo a 3,1. Por isto, segundo o autor, o melhor momento para se utilizar o fermento natural, como meio de cultura para o pão, é 8 horas depois da alimentação, considerando que este esteja acondicionado em temperaturas ao redor de 25-30°C.

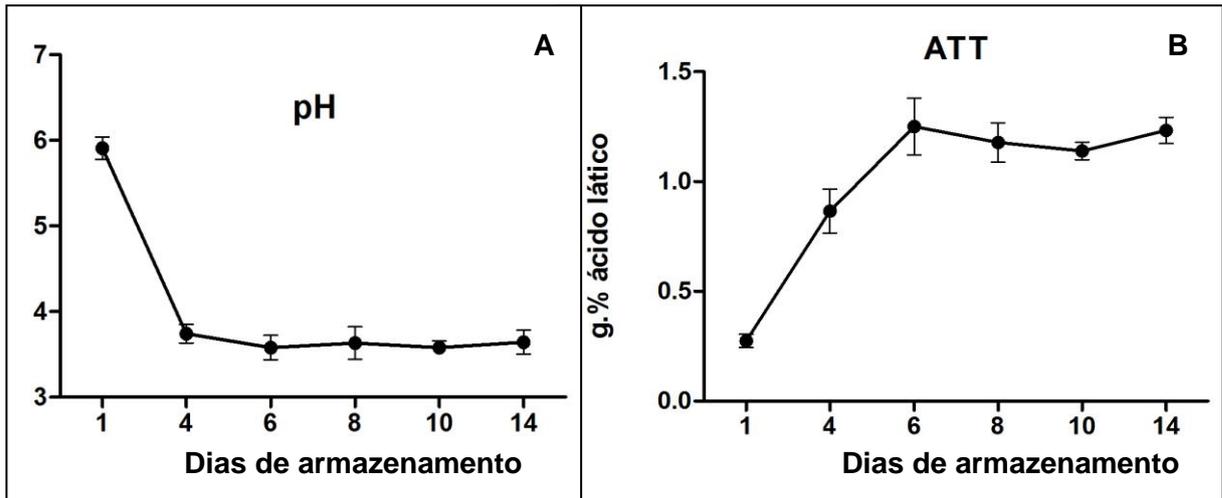


Figura 1: Determinação de pH (A) e acidez total titulável (ATT)(B) no fermento natural preparado a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral durante 14 dias de armazenamento a temperatura de 30°C.

A Figura 1 (A) mostra a variação do pH observada durante o período de elaboração do fermento natural que causou uma redução significativa ($p < 0,05$) do pH logo nos primeiros quatro dias (5,91-3,74) seguido de uma estabilização a partir do sexto dia (3,58) de fabricação. Considerando os resultados obtidos para o pH ao longo do período de fabricação do fermento natural pode-se observar que a partir do sexto dia não houve diferenças estatísticas para esta variável, apresentando pH de 3,64 no 14º dia de fabricação.

A acidez total titulável (ATT) revelou um comportamento um pouco diferente do que visualizado com o pH. Observa-se na Figura 1 (B) um aumento crescente e significativo ($p < 0,05$) ao longo dos primeiros seis dias de fabricação com valores (g.% ácido láctico) entre 0,274 (1º dia) e 1,250 (6º dia). Do sexto dia até o décimo dia de fabricação houve uma redução significativa ($p < 0,05$) seguida de um ligeiro aumento ($p < 0,05$), apresentando 1,139 g.% ácido láctico no 10º dia e 1,233 g.% ácido láctico no 14º dia de produção.

Em um estudo realizado por Vogelmann e Hertel (2011) os valores de pH durante a produção de fermento natural se mantiveram entre 3,8 e 3,9 corroborando com os resultados apresentados na Figura 1 e os valores de acidez total titulável (ATT) aumentaram no decorrer dos dias de produção.

Segundo Brandt et al., (2004) a quantidade inicial de fermento natural adicionada na primeira alimentação (*backslopping*) define o pH inicial e, desta forma influencia as taxas de crescimento das bactérias ácido lácticas (BAL). Além disso, as interações entre BAL e leveduras representam um aspecto importante para a estabilidade da microbiota do fermento natural (Brandt et al., 2004).

Para o crescimento das BAL o pH desempenha um papel importante. Brandt et al. (2004) mostraram que o *Lactobacillus sanfranciscensis* não pode crescer em pH abaixo de 3,8 ou 4,0, ao passo que *Candida humilis* não sofre influência em pH baixo (Valmorri et al., 2008).

Segundo apresentado pela Figura 2 houve um aumento significativo ($p < 0,05$) tanto na contagem de (BAL) como de bolores e leveduras (LEV) durante o período de 14 dias. Observa-se também um acentuado crescimento dos microrganismos nos primeiros quatro dias de fabricação.

Considerando que o pH encontrado ficou próximo ao pH ideal citado por Board et al., (1995) para ser utilizado na preparação dos pães e que o crescimento dos microrganismos se estabilizou a partir do oitavo dia de fabricação, recomenda-se uma produção mais curta, em vista das contagens microbiológicas de BAL e LEV não apresentarem diferenças estatísticas a partir de oito dias.

Considerando o processo de fabricação de fermento natural semelhante ao do tipo *backslopping*, as bactérias heterofermentativas são as mais envolvidas e a quantidade de massa fermentada devolvida ao processo bem como o número e intervalo das alimentações podem influenciar a dinâmica e a estabilidade da microbiota do fermento natural (Minervini et. al., 2012; Vrancken et. al., 2011).

Em sistemas de produção onde as alimentações são realizadas em intervalos longos ou até mesmo em fermentações sem alimentações programadas, as espécies de bactérias ácido lácticas, ácido-tolerantes são beneficiadas. Essas bactérias são altamente adaptadas à um ambiente hostil e pobres em nutrientes, tais como *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, e *Lb. reuteri* (Vogelmann, Hertel, 2011). Por outro lado, as alimentações realizadas em intervalos curtos podem ser desvantajosas para as leveduras, devido ao seu lento crescimento comparado com as bactérias lácticas (Venturi et. al., 2012). Isto pode ser observado neste estudo (Figura 2), onde resultados para a contagem de LEV apresentaram crescimento significativo até o 8º dia e após, não apresentando diferenças significativas até o 14º dia, provavelmente devido a produção de ácido láctico pelas BAL. Este dado é muito

importante no que tange ao período mais curto para a fabricação do fermento natural, reduzindo gastos com matéria prima e otimizando o tempo, fatores muito importantes a serem considerados numa produção industrial.

O fermento natural desenvolvido neste trabalho, a partir da mistura de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral durante o tempo de 14 dias, apresentou, no 14º dia, $9,0 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de bactérias ácido lácticas e uma acidez de 1,233 g.% de ácido láctico. Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Moroni et al. (2011), que avaliaram o comportamento de um fermento natural produzido a partir da farinha de trigo Sarraceno, durante 12 dias e encontraram $9,9 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de bactérias ácido lácticas e acidez de 1,512 expressa em g.% de ácido láctico

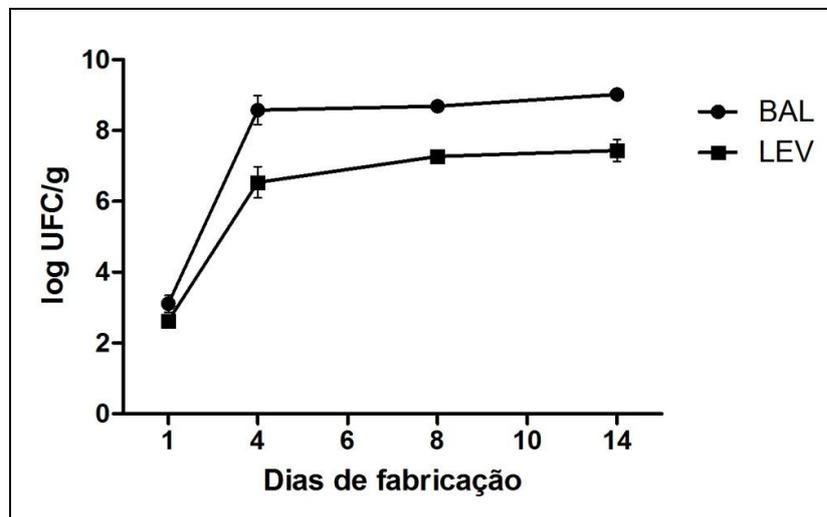


Figura 2: Contagem microbiológica de bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras (LEV) do fermento natural preparado a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral durante os 14 dias de fabricação.

Análises no fermento natural liofilizado

Análises físico-químicas

A umidade e a atividade de água foram mensuradas (Tabela 2) no fermento natural fresco (antes de liofilizar) e nos fermentos naturais liofilizados adicionados de diferentes concentrações de trealose (FNL 0, FNL 10 e FNL 15). Os resultados mostram que a umidade diminui com a liofilização de 49,78% no fermento natural

fresco (FNF) para valores de 6,62%, 6,01% e 6,00% nos fermentos naturais liofilizados FNL 0, FNL 10 e FNL 15, respectivamente.

A atividade de água nos fermentos naturais, após o processo de liofilização (Tabela 2), evidenciou um decréscimo acentuado, onde o fermento natural fresco apresentou Aa igual a 0,989 e os fermentos naturais liofilizados apresentaram a atividade de água entre 0,367 e 0,388, independente da concentração de trealose utilizada. Com isso, observa-se que a adição da trealose não influenciou, tanto no valor da atividade de água, como da umidade dos fermentos naturais liofilizados, apresentando médias significativamente semelhantes ($p > 0,05$) em todos os tratamentos.

Tabela 2. Valores da umidade e atividade de água (Aa) do fermento natural fresco (FNF) e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (FNL 0), (FNL 10) e (FNL 15).

Tipo de fermento	UMIDADE (%)	ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa)
FNF	49,78 ^a	0,9895 ^a
FNL 0	6,62 ^b	0,3698 ^b
FNL 10	6,01 ^b	0,3889 ^b
FNL 15	6,00 ^b	0,3676 ^b

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. (Nº repetições: 3). FNF= fermento natural fresco; FNL 0= fermento natural liofilizado com 0 % de trealose; FNL 10= fermento natural liofilizado com 10 % de trealose; FNL 15= fermento natural liofilizado com 15 % de trealose;

Após a liofilização dos fermentos naturais, o rendimento obtido com o FNL 0 (sem adição de trealose) foi de 49,26 %, de 52,78 % para o FNL 10 (com 10% de Trealose) e 52,82 % para o FNL 15.

Análises microbiológicas

Segundo o modelo matemático $y_{ijk} = \mu + F_i + T_j + (F * T)_{ij} + \text{rep}_k(F)_i + \varepsilon_{ijk}$ houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tipos de fermento (F_i), entre os tempos (T_j) e também na interação tipo de fermento *versus* tempo ($F * T$)_{ij}. Os resultados foram então avaliados através da análise de variância e pelo teste Tukey a um nível de

significância de 5% para a discussão dos resultados. Logo, podemos observar na Tabela 3 os resultados para a contagem de BAL nos fermentos naturais fresco (-3), congelado (-2) com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização.

Tabela 3: Viabilidade celular de bactérias ácido lácticas (BAL) realizadas nos fermentos naturais no estado fresco, congelado com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização.

Estado da amostra	log UFC·g ⁻¹		
	FNL 0	FNL 10	FNL 15
Fresco	8,827 (±0,20) ^a	8,802 (±0,14) ^a	8,995 (±0,09) ^a
Congelado	8,638 (±0,32) ^a	8,779 (±0,16) ^a	8,941 (±0,13) ^a
Liofilizado	6,775 (±0,49) ^{defg}	7,701 (±0,97) ^{bc}	8,960 (±0,14) ^a
Após 15 dias	6,282 (±0,34) ^{fgh}	7,114 (±0,96) ^{ce}	8,441 (±0,57) ^{ab}
Após 30 dias	6,047 (±0,44) ^{gh}	7,027 (±1,15) ^{cdef}	7,704 (±0,23) ^{bc}
Após 45 dias	5,943 (±0,43) ^h	6,439 (±0,53) ^{efgh}	7,326 (±0,37) ^{dc}

^{a.....h} Médias seguidas por letras diferentes na linha e na coluna diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. (Nº de repetições: 3)

Para avaliar o efeito da trealose na proteção da microbiota do fermento frente ao choque provocado pelo frio e pelo tempo de 60h de liofilização, foi observado que não houve diferença significativa nos fermentos naturais no estado fresco e congelado com 0, 10 e 15% de trealose. Após a liofilização, os fermentos apresentaram uma contagem de BAL diretamente proporcional às concentrações de trealose utilizadas, em todos os 45 dias analisados. Os dados também mostram que quanto maior a concentração de trealose (FNL 15) menor é a morte celular devido ao processo de liofilização, apresentando este tratamento uma contagem aproximadamente 2 ciclos log quando comparado com FNL 0 e de aproximadamente 1 ciclo log maior que o FNL 10, evidenciando assim o seu efeito crioprotetor sobre a sobrevivência dos microrganismos (Strasser et al., 2009; De Giulio et al., 2005).

Na Tabela 4 a contagem de bolores e leveduras (LEV) em fermentos naturais fresco (-3), congelado (-2) com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização, sofre a mesma tendência do efeito da trealose observado na contagem de BAL, porém as reduções foram bem mais significativas ($p < 0,05$) para as leveduras no tratamento sem a trealose (FNL 0). A diferença entre os

fermentos naturais liofilizados não tratados com trealose (FNL 0) e com 10% foi de aproximadamente de 1 ciclo log e com 15% de trealose (FNL 15), foi maior ou igual a 2 ciclos log e maior que o observado para as BAL.

Tabela 4: Viabilidade celular de bolores e leveduras (LEV) realizadas nos fermentos naturais no estado fresco, congelado com 0, 10 e 15% de trealose e após 0, 15, 30 e 45 dias do processo de liofilização.

Estado da amostra	FNL 0	FNL 10 log UFC·g ⁻¹	FNL 15
Fresco	7,183 (±0,25) ^a	7,247 (±0,17) ^a	7,184 (±0,16) ^a
Congelado	6,164 (±0,81) ^{bc}	6,827 (±0,22) ^{ab}	6,794 (±0,35) ^{ab}
Liofilizado	4,811 (±1,39) ^e	6,149 (±0,40) ^{bc}	6,751 (±0,48) ^{ab}
Após 15 dias	3,237 (±0,35) ^{gh}	4,936 (±0,41) ^{de}	5,636 (±0,36) ^{dc}
Após 30 dias	2,767 (±0,43) ^{hi}	3,823 (±0,62) ^{fg}	4,816 (±0,13) ^e
Após 45 dias	2,312 (±0,12) ⁱ	3,112 (±0,73) ^{gh}	4,286 (±0,20) ^{ef}

^{a,....i} Médias seguidas por letras diferentes na linha e na coluna diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. (Nº de repetições: 3)

Neste trabalho a viabilidade celular no fermento natural foi monitorada apenas até 45 dias, pois baseado em alguns testes preliminares de fermentação (não descritos neste artigo) notou-se que baixas contagens de bolores e leveduras, aproximadamente 2 log UFC·g⁻¹, não demonstraram resultados satisfatórios nos pães fabricados.

Aos 45 dias de armazenamento, os fermentos naturais liofilizados com 15% de trealose (FNL 15) apresentaram contagem de BAL de 7,33 log UFC·g⁻¹, enquanto que para as LEV foi de 4,29 log UFC·g⁻¹.

Vogelmann e Hertel (2011) afirmam que há vários fatores ecológicos para a estabilidade e competitividade de associações microbianas entre bactérias ácido lácticas e leveduras em fermento natural. O trabalho desses autores contribuiu para uma melhor compreensão da interação de BAL e leveduras em fermentações naturais, facilitando o controle da fermentação, a fim de manter a qualidade dos fermentos produzidos. No entanto, a competitividade entre esses dois tipos de microrganismos não é específica, como mostrado recentemente para algumas cepas

de *Lactobacillus sanfranciscensis* e *Lactobacillus plantarum* (Minervini et al., 2010; Siragusa et al., 2009) em fermento natural de farinha de trigo.

CONCLUSÕES

Neste estudo, pode-se concluir que o uso da farinha de trigo integral para produção de fermento natural é uma alternativa viável, pois esse tipo de matéria prima concentra um maior número de microrganismos quando comparada com a farinha de trigo branca. O fermento natural produzido a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral, no estado fresco e antes de liofilizar apresentou características de pH e acidez total titulável compatíveis com dados previamente demonstrados na literatura.

Durante o período de fabricação do fermento natural houve um aumento considerável nas contagens microbiológicas de bactérias ácido lácticas bem como de bolores e leveduras nos primeiros quatro dias e após uma estabilização na multiplicação dos microrganismos dando evidências que o processo de fabricação pode ser realizado em um tempo menor, entre 7 a 10 dias, por exemplo.

Pode-se afirmar que a adição de 10 e 15% de trealose nos fermentos naturais promoveu um efeito crioprotetor na viabilidade dos microrganismos sendo diretamente proporcional a concentração de trealose adicionada. Os processos de congelamento seguido de liofilização causam a morte celular, reduzindo o número de microrganismos presentes no fermento natural. No entanto foi observado que nos tratamentos contendo a trealose as reduções foram menores quando comparadas com o tratamento sem trealose. O fermento natural liofilizado apresentou-se viável até os 45 dias de armazenamento.

Dessa forma essa metodologia de produção de fermento natural a partir da mistura de farinha de trigo branca e integral, liofilizado, poderá servir de amparo às indústrias de panificação que vem buscando uma alternativa para padronizar os pães elaborados por este tipo de fermentação. Mais estudos são necessários para a identificação da microbiota, para a fabricação de pães e de sua vida útil ao longo do período de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo durante o período de realização deste trabalho e também pelo apoio através do “Edital Capes nº 27/2010 – Pró-Equipamentos Institucional”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão B (1999). O mundo dos pães. (6. ed.). São Paulo: Tocalino. 166p.
- American public health association. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (3. ed.). Washington.
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of the AOAC International. (16. ed.). Washington: AOAC, (supplement 1998), 1018p.
- Board RG (1995) Microbial Fermentations: Beverages, Foods and Feeds. Oxford: Blackwell science, 145p.
- Brandt MJ, Hammes WP, Gänzle MG (2004) Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. Eur Food Res Technol 218:333-338.
- Brasil. (1996). Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos. Bioética 4(2):15-25.
- Brasil. (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. 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. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

- Corsetti A, Settanni L (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation: A review. *Food Res. Int.* 40:539-558.
- Costa CP, Ferreira MC (1991) Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia* 22(3):263-268.
- De Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, De Rosa M, Sada A, De Prisco PP, Nazzaro F (2005) Use of alginate and cryoprotective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J Microbiol Biotechnol* 21:739–746.
- De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol*, 16, p. 43-56.
- De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 24:120–127.
- Gaggiano M, Di Cagno R, De Angelisa M, Arnault P, Tossut P, Fox PF, Gobbetti M (2007) Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiol* 24:15–24.
- Instituto Adolfo Lutz (2008) Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br>>. Acesso em: 08 nov. 2012.
- Jay JM (2005) *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 389-391 711p.
- Minervini F (2007) Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiol* 27(7):897-908.
- Minervini F, Di Cagno R, Latanzzi A, De Angelis M, Antonielli L, Cardinali G, Cappelle S, Gobbetti M (2012) Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19

sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Appl Environ Microbiol* 78:1251-1264.

Minervini F, Pinto D, Di Cagno R, De Angelis M, Gobbetti M (2011) Scouting the application of sourdough to frozen dough Bread technology. *J Cereal Sci* 54:296-304.

Moroni AV, Arendt EK, Dal Bello F (2011) Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol* 28:497-502.

Santo EF, Lima LKF, Torres APC, Oliveira G, Ponsano EHG (2013) Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. *Food Science Technology* 33(1):47-51.

Scheirlinck I, Van Der Meulen R, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G (2009) Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *J Appl Microbiol* 106:1081-1092.

Selva C, Malferrari M, Ballardini R, Ventola A, Francia F, Venturoli G (2013) Trehalose Preserves the Integrity of Lyophilized Phycoerythrin-Antihuman CD8 Antibody Conjugates and Enhances their Thermal Stability in Flow Cytometric Assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102(2):649-659.

Silva LF, Kamiya NF, Oliveira MS, Alterthum F (1992) Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. *Revista de Microbiologia* 23 (3):177-182.

Siragusa S, Di Cagno R, Ercolini D, Minervini F, Gobbetti M, De Angelis M (2009) Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl Environ Microbiol* 75:1099-1109.

Strasser S, Neureiter M, Geppl M, Braun R, Danner H (2009) Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 107:167-177.

Suas M (2012) *Panificação e viennoiserie: abordagem profissional*. São Paulo: Cengage Learning, 442p.

Trevisol ET, Panek AD, Mannarino SC, Eleutherio EC (2011) The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 90(2):697-704.

Valmorri S, Mortensen HD, Jespersen L, Corsetti A, Gardini F, Suzzi G, Arneborg N (2008) Variations of internal pH in typical Italian sourdough yeasts during co-fermentation with lactobacilli. *LWT - Food Science and Technology* 41:1610-1615.

Venturi M, Guerrini S, Vincenzini M (2012) Stable and non-competitive association of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida milleri* and *Lactobacillus sanfranciscensis* during manufacture of two traditional sourdough baked goods. *Food Microbiol* 31:107-115.

Vogelmann SA, Hertel C (2011) Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food microbiol* 28:583-589.

Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, Leroy F, De Vuyst L (2011) Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 77: 2716-2726.

ARTIGO 2

MANUFACTURE OF BREAD TYPE SOURDOUGH WITH NATURAL YEAST LYOPHILIZED

FABRICAÇÃO DE PÃO DO TIPO SOURDOUGH COM FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO

*Artigo em fase final de revisão. Após as considerações da comissão examinadora, o artigo será traduzido para o inglês e submetido à revista Food Microbiology.
Configuração e formatação segundo as normas da revista (Anexo B).

MANUFACTURE OF BREAD SOURDOUGH WITH NATURAL YEAST LYOPHILIZED

FABRICAÇÃO DE PÃO *SOURDOUGH* COM FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO

Raquel Facco Stefanello^{1*}, Leadir Lucy Martins Fries¹, Luis Carlos Gutkoski²

^{1*}Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Av. Roraima nº1000 – Cidade universitária – Bairro Camobi – Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: raquelfacco@hotmail.com

¹Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Av. Roraima nº1000 – Cidade universitária – Bairro Camobi – Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: lucymicro@yahoo.com.br

²Professor titular da Universidade de Passo Fundo (UPF), Curso de Engenharia de Alimentos, Campus I - BR 285 - Bairro São José - CEP 99001-970 Passo Fundo – RS, Brasil. E-mail: gutkoski@upf.br

RESUMO

Este estudo teve por objetivo produzir e avaliar pães *sourdough* elaborados com 100% de fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) por 24 dias após sua fabricação e comparar com pães fabricados com fermento comercial. Os pães foram fabricados com 30% de farinha de trigo integral e 70% de farinha de trigo branca e armazenados por 24 dias em temperatura ambiente. Nos pães foi avaliado pH, ATT, Aa, firmeza e contagens microbiológicas de 4 em 4 dias até o 24º dia de armazenamento. O pão *sourdough* sofreu uma pequena variação de pH (3,63 – 3,84), de acidez total titulável (1,224 – 1,439) e de atividade de água (0,922 – 0,935) desde o 1º até o 24º dia de armazenamento. No entanto a firmeza dos pães obtidos pelo método de fermentação natural utilizando os fermentos naturais liofilizados com diferentes concentrações de trealose foi fortemente influenciada e apresentou as maiores médias em todo o período de observação, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos pães fabricados com fermento comercial. Embora os pães fabricados com fermento natural liofilizado não tenham sido favoravelmente classificados na avaliação sensorial realizada por provadores treinados, os pães provenientes desses tratamentos mostraram uma forte atividade antimicrobiana, pois suas contagens microbiológicas realizadas durante os 24 dias de armazenamento foram menores que as obtidas com os pães fabricados com fermento comercial, podendo ser uma alternativa aos conservantes artificiais. Para melhorar as características sensoriais e aumentar a vida de prateleira de pães *sourdough* é preciso pesquisar novas formulações e melhorar as técnicas de produção.

Palavras-chave: *sourdough*, fermento natural liofilizado, trealose, vida de prateleira.

DESTAQUES

- O volume específico e firmeza dos pães fabricados foram influenciados pelas diferentes concentrações de trealose utilizadas nos fermentos naturais liofilizados;
- A utilização de fermento natural liofilizado causa aumento na acidez e diminuição do pH nos pães *sourdough* devido as bactérias ácido lácticas;

- Durante os 24 dias de armazenamento ocorreu uma estabilização do pH nos pães fabricados com fermento natural liofilizado;
- Fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose inibe o crescimento microbiano por 24 dias em pães *sourdough*;

ABSTRACT

This study aimed to manufacture and study and evaluate the type of sourdough breads elaborated with 100% natural lyophilized yeast in different concentrations of trehalose for 24 days after its manufacture as compared with a treatment using commercial yeast. The breads were made with 30% of whole wheat flour and 70% of white wheat flour and stored for 24 days at room temperature. In the breads was evaluated pH, ATT, Aa, firmness and microbiological counts every 4 days until the 24th day of storage. The sourdough bread suffered a slight variation of pH (3.63 to 3.84), titratable total acidity (1.224 to 1.439) and of water activity (0.922 - 0.935) from the 1st to the 24th day of storage. However the firmness of bread obtained by the method of natural fermentation using lyophilized natural yeasts with different concentrations of trehalose was strongly influenced and showed the highest averages for the whole period of observation, differing significantly ($p < 0.05$) of the control treatment. Although treatments using lyophilized natural yeast have not been ranked favorably in sensory evaluation performed by trained tasters, the breads from these treatments showed strong antimicrobial activity, because their microbiological counts during the 24 days of storage showed lower than those obtained with the treatment using commercial yeast, being able to be an alternative to artificial chemical additives. To improve sensory characteristics and increase the shelf life of sourdough breads type you need to research new formulations and improve the production techniques.

Keywords: sourdough, lyophilized natural yeast, trehalose, shelf life.

HIGHLIGHTS

- The specific volume and firmness of breads produced were influenced by different concentrations of trehalose used in lyophilized natural yeasts;

- The use of lyophilized natural yeast causes an increase in acidity and pH decrease in sourdough breads because of the lactic acid bacteria;
- During the 24 days of storage, there was a stabilization of pH in breads made with natural yeast lyophilized;
- Natural yeast lyophilized with different concentrations of trehalose inhibits microbial growth for 24 days in sourdough breads;

INTRODUÇÃO

A origem da panificação data de milhares de anos antes de Cristo. Muitos dizem que foram os Egípcios os primeiros a assar pães com textura fina, que também descobriram que o acréscimo do fermento à massa o tornava mais leve e macio (Moura, 2002).

Segundo BRASIL (2000), o pão é definido como um produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou que sejam adicionadas destas proteínas, podendo conter outros ingredientes. O mercado da panificação vive em constante transformação e uma das possíveis causas disso é a exigência dos consumidores que estão buscando mais que um simples alimento. A inovação em produtos integrais, com fibras, sem açúcar, isentos de aditivos e com alto padrão de qualidade precisa ser superada a cada dia pelas empresas deste ramo para se manterem competitivas no mercado. Existe uma variedade muito grande de pães a começar pelos ricos em fibras ou em grãos integrais. Para dietas restritas, surgem os pães sem glúten, sem lactose e isentos de açúcar. Há também os pães fermentados naturalmente, ou convenientemente chamados de *sourdough* e sua produção pode ser rastreada desde os tempos antigos por apresentarem um sabor levemente mais ácido do que os demais.

Os pães fermentados naturalmente são elaborados pelo método da fermentação indireta ou *esponja* (Suas, 2012). Nesse tipo de fermentação, primeiro parte dos ingredientes são misturados (1ª mistura) e deixados fermentar (primeira fermentação) sob condições controladas para depois incorporar o restante dos ingredientes (2ª mistura) e proceder com as demais etapas até a fermentação final.

Os pães *sourdough* são caracterizados por apresentar um sabor único, por inibirem o desenvolvimento de contaminantes além de possuir propriedades

tecnológicas favoráveis (Clarke & Arendt, 2005; Hammes & Gänzle, 1997; Salovaara, 1998).

Um fermento natural para fabricação de pão tipo *sourdough* consiste, geralmente, em uma mistura composta por farinha de trigo branca e água, sendo fermentada por leveduras e bactérias ácido lácticas (BAL) (Corsetti & Settanni, 2007; De Vuyst & Neysens, 2005; De Vuyst & Vancanneyt, 2007; De Vuyst et al., 2009). As bactérias ácido lácticas (BAL) estão envolvidas no desenvolvimento das características sensoriais de massa fermentada por fermento natural. Vários produtos gerados durante a fermentação por leveduras também contribuem para a melhoria da complexidade organoléptica das massas resultantes de fermentação natural (Valmorri et. al., 2010).

A demanda crescente dos consumidores para a redução do uso de aditivos que podem diminuir os atributos saudáveis de alimentos levou a um interesse crescente em relação às tecnologias naturais e entre essas abordagens, o uso de fermento natural pode ser uma alternativa, de baixo custo e com tecnologia eficiente para a produção de pães especiais (Moroni et al., 2009). A liofilização de um fermento natural gera maior praticidade, reduz tempo de elaboração e proporciona uma padronização dos produtos.

Portanto, este estudo teve por objetivo produzir pães com fermento comercial e pães *sourdough* com fermento natural liofilizado e avaliar suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os pães foram fabricados no laboratório de panificação na Universidade de Passo Fundo (UPF, Passo Fundo, RS), localizado no Departamento de Engenharia de Alimentos. A avaliação sensorial dos pães foi realizada no laboratório de análise sensorial no Departamento de Engenharia de Alimentos, na Universidade de Passo Fundo. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS).

Fabricação dos pães *sourdough*

Os fermentos naturais liofilizados utilizados para a fabricação dos pães tipo *sourdough* foram produzidos a partir da mistura da farinha de trigo branca e integral, e adicionados de diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) conforme a metodologia descrita por Stefanello et al., (2014) demonstrada em forma de fluxograma no Apêndice A. Laudos com especificações técnicas sobre a matéria-prima encontram-se na seção dos Apêndices. Antes da fabricação dos pães, os fermentos naturais liofilizados (FNL 0, FNL 10 e FNL 15) foram hidratados e incubados por aproximadamente 24 horas para obterem condições ideais para a sua utilização como agente fermentador dos pães.

A fabricação dos pães foi feita através do método de fermentação indireta, sendo assim, a *esponja* utilizada na fabricação dos pães tipo *sourdough* foi feita à base de farinha de trigo branca, água (em torno de 60%) e fermento natural liofilizado (FNL 0, FNL 10 e FNL 15). De forma semelhante também foi preparada uma *esponja* para o tratamento comercial utilizando a mesma proporção dos ingredientes citados acima, no entanto foi utilizado fermento comercial liofilizado (fermento biológico Fleischmann®). A *esponja* somente foi incorporada à massa final depois de atingir a plena maturação, ou seja, quando apresentou a presença de várias bolhas na superfície (28h com os fermentos naturais liofilizados e 1h com o fermento comercial liofilizado). Após foram adicionados os restantes dos ingredientes conforme Tabela 1.

Tabela 1: Formulação utilizada para a produção de pães com fermento natural liofilizado e fermento comercial.

Ingredientes	Peso (g)	%
Farinha de trigo branca	1750	70
Farinha de trigo integral	750	30
Água ¹	-	-
Fermento ²	62,5	2,5
Sal	31,25	1,25
Açúcar	112,5	4,5
Gordura de palma	46,25	1,85

¹Variou conforme a absorção da mistura. ²Refere-se tanto ao fermento natural liofilizado como o fermento comercial.

Os pães *sourdough* (FNL 0; FNL 10; FNL 15) e os pães controle (FC) foram elaborados seguindo a metodologia proposta por Gutkoski e Neto (2002) adaptada

para este experimento. Para a elaboração da *esponja*, partes dos ingredientes foram misturados e mantidos em ambiente com temperatura controlada a 30°C e umidade relativa de 70% por 1h (no tratamento comercial) e 28h (para os tratamentos FNL 0; FNL 10; FNL 15). Após a 1ª fermentação, o restante dos ingredientes foi misturado em amassadeira (Kitchen Aid, modelo K5SS) por 2 minutos, em velocidade lenta e por 7 minutos em velocidade rápida para o desenvolvimento do glúten. Imediatamente após a mistura, as massas foram divididas em porções de 130g (± 1 g), modeladas, colocadas em formas de aço inoxidável 10 x 6,5 x 4,5 cm e deixadas fermentar (fermentação final) em ambiente controlado (30°C/70% UR) até dobrarem de tamanho (2h, 15h, 14h e 13h para FC, FNL 0, FNL 10 e FNL 15, respectivamente). Os pães foram assados (190°C por 30 minutos) e após resfriar em temperatura ambiente, embalados em sacos de polietileno para minimizar a troca de umidade e armazenados à temperatura ambiente durante 24 dias.

Análises microbiológicas

De acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para pães BRASIL (2001), os diferentes tratamentos foram submetidos às análises de Coliformes a 45°C pelo método oficial nº 966.24 da AOAC (2000), Estafilococos coagulase positiva segundo o método nº 975.55 da AOAC (2000), *Bacillus cereus* conforme metodologia descrita em BRASIL (2003), *Clostridium* sulfito redutor a 46°C (Apha,2001) e *Salmonella* sp. de acordo com o método nº 967.26 da AOAC (2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata, 1 hora e meia após o resfriamento dos pães, para o dia 0 de armazenamento.

A fim de enumerar a quantidade de microrganismos presente nos fermentos antes de sua utilização na fabricação dos pães, foi realizada uma contagem de bolores e leveduras no fermento comercial (fermento biológico Fleischmann®) e também nos fermentos naturais liofilizados com diferentes concentrações de trealose segundo BRASIL (2003).

Para avaliar a vida de prateleira foram realizadas as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras nos pães utilizando fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, segundo BRASIL (2003). As análises microbiológicas foram realizadas logo após o resfriamento nos pães, dia 0 e nos dias 4, 8, 12, 16, 20 e 24 dias de

armazenamento. As análises foram realizadas em triplicata, e os valores expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

Análises físico-químicas

Os pães fabricados com fermento comercial (FC) e com os fermentos naturais liofilizados (FNL 0; FNL 10; FNL 15) foram analisados quanto ao volume específico, firmeza, pH, acidez total titulável (ATT) e atividade de água. As análises de volume específico foram realizadas em triplicata, 1 hora e meia após o resfriamento dos pães. As análises de firmeza, pH, ATT e atividade de água foram realizadas em triplicata, 1 hora e meia após o resfriamento dos pães e nos dias 4, 8, 12, 16, 20 e 24.

O volume específico dos pães fabricados com fermento comercial e com fermento natural liofilizado foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.) e os resultados foram expressos em $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Hallen et al., 2004).

A firmeza foi analisada nos pães elaborados, previamente cortados com um fatiador elétrico, em fatias de 1,25 cm de espessura cada (foram utilizadas as fatias do meio), através da metodologia descrita no método 74-09 da AACC (1995). Utilizou-se um texturômetro TA-XT2, com uma *probe* cilíndrica de alumínio designada P/36R (com raio de 36 mm) e com os seguintes parâmetros: velocidade pré-teste = $1,0 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$; velocidade de teste = $1,7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$; velocidade de pós-teste = $10,0 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ e força de compressão de 40%.

Foi analisado o pH em potenciômetro Digimed®. A acidez total titulável (ATT) pelo método oficial nº 962.19 da AOAC (2000) e a atividade de água (Aa) foi medida diretamente, por meio de um analisador Aqualab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25°C). Para todas as análises realizadas foi usado 3 repetições.

Avaliação sensorial

Os testes sensoriais foram realizados em sala com cabines individuais, nas dependências do laboratório de análise sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo (Passo Fundo, RS) com 4 provadores treinados, sendo eles técnicos do Laboratório de Cereais, habilitados a

realizar o teste por meio de cursos de análise sensorial de avaliação das características de produtos de panificação, seguindo a planilha disponível no Apêndice C.

As características externas avaliadas foram: volume específico, cor da crosta, quebra e simetria, enquanto que as internas foram: características da crosta, cor do miolo, estrutura do miolo e textura do miolo. O sabor e o aroma dos pães *sourdough* produzidos a partir de fermentos naturais liofilizados (FNL 0; FNL 10; FNL 15) e os pães produzidos com fermento comercial (FC) também foram analisados após 4 h do assamento.

A análise sensorial realizada pelos provadores treinados foi avaliada pelas notas obtidas segundo classificação de El-Dash et al. (1978): ruim (até 79 pontos), razoável (de 80 a 84), bom (de 85 a 93) e excelente (de 94 a 100 pontos). A avaliação global dos pães variou entre 64,44 a 87,10.

Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Foram avaliados três fermentos (FNL 0, FNL 10 e FNL15) e um tratamento controle (FC) em seis tempos resultando em 24 tratamentos. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste F, e quando observada diferença significativa, foram comparadas as médias pelo teste Tukey, considerando o nível de significância de 5%. O modelo matemático adotado foi o seguinte: $y_{ijk} = \mu + F_i + T_j + (F * T)_{ij} + \text{repk}(F)_i + \varepsilon_{ijk}$. Em que: y = variáveis dependentes; μ = média geral de todas as observações; F_i = efeito do tipo de fermento ($i= 1...4$); T_j = efeito dos tempos ($j= 1...6$); $(F * T)_{ij}$ = efeito da interação tipo de fermento * tempo; $\text{repk}(F)_i$ = erro a ($k= 1...4$); ε_{ijk} = erro aleatório residual (erro b). Foi utilizando o software SAS Versão 9.4 (Statistical Analysis Sistema Institute Inc., EUA). As análises microbiológicas foram realizadas em quatro tipos de fermentos (F_i) em seis períodos de tempo (T_j). Os fermentos naturais liofilizados variaram de acordo com a concentração de trealose adicionada (0% para FNL 0; 10% para FNL 10 e 15% para FNL 15) e os períodos conforme o decorrer dos dias variando a coleta de 4 em 4 dias.

Comitê de ética e pesquisa

Esta pesquisa foi aprovada em seus aspectos éticos e metodológicos no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria - RS, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Ministério da Saúde, em 18/07/2013 através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 16936413.6.0000.5346.

RESULTADOS

Análises microbiológicas

A contagem de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfitorredutor a 46°C e *Salmonella* sp dos pães produzidos com fermento natural liofilizado (FNL) com diferentes concentrações de trealose e fermento comercial (FC) se encontra na Tabela 2.

A partir dos dados observados na Tabela 2 pode-se afirmar que os pães produzidos com fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose bem como os pães fabricados com fermento comercial apresentaram características microbiológicas adequadas, conforme a legislação brasileira para pães (BRASIL, 2001).

Antes da aplicação dos fermentos na produção dos pães foi determinada a contagem de bolores e leveduras com o objetivo de enumerar a quantidade e viabilidade dos microrganismos. Pode-se observar, na Tabela 3, que a contagem de bolores e leveduras foi significativamente maior ($p < 0,05$) no fermento comercial (fermento biológico Fleischmann[®]), apresentando um valor de 7,90 log UFC.g⁻¹, enquanto que nos fermentos naturais liofilizados as contagens foram estatisticamente menores, porém o efeito da trealose na conservação dos microrganismos foi destacada, apresentando maiores contagens proporcional a maior concentração de trealose.

Tabela 2. Contagem de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfitorredutor a 46°C e *Salmonella* sp realizadas em pães produzidos com fermento natural liofilizado (FNL) com diferentes concentrações de trealose e fermento comercial (FC), logo após a fabricação.

Análises	FC	FNL 0	FNL 10	FNL 15	Padrões microbiológicos
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	10 NMP/g (máx)
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva (UFC/g)	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	5x10 ² UFC/g (máx)
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausência em 25g
<i>Clost. Sulf. Redutor</i> (UFC/g)	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	< 1,0x10 ¹	5x10 ² UFC/g (máx)
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	< 1,0x10 ^{2*}	< 1,0x10 ^{2*}	< 1,0x10 ^{2*}	< 1,0x10 ^{2*}	5x10 ² UFC/g (máx)

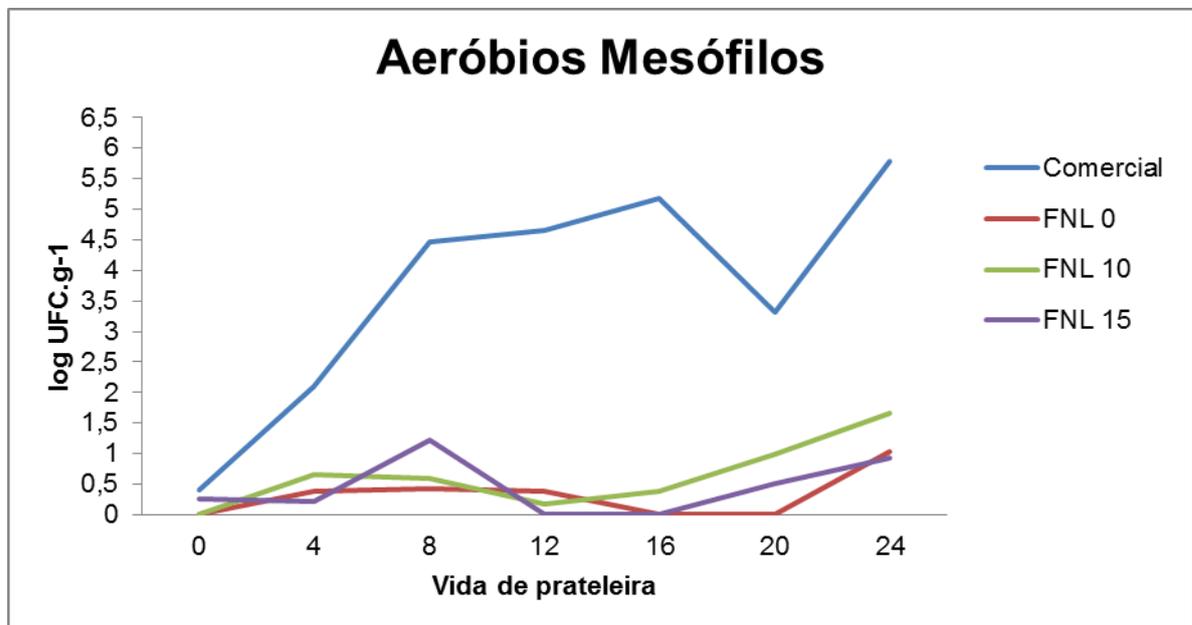
*significa: valor estimado. FC: fermento comercial; FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose. NMP: número mais provável. UFC: unidades formadoras de colônias.

Tabela 3: Contagem de bolores e leveduras no fermento comercial e nos fermentos naturais liofilizados, com diferentes concentrações de trealose, antes da fabricação dos pães.

Amostra	Bolores e leveduras (log UFC·g ⁻¹)
FC	7,90 (±0,02) ^a
FNL 0	4,84 (±0,04) ^d
FNL 10	6,12 (±0,03) ^c
FNL 15	6,40 (±1,18) ^b

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si estatisticamente na coluna (p<0,05) pelo teste de Tukey. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

A Figura 1 apresenta as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos realizadas nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, e com fermento comercial durante 24 dias de armazenamento. A contagem no pão comercial obteve os maiores valores de log UFC·g⁻¹ ($p < 0,05$) em todo o período analisado, apresentando uma contagem no 24º igual a 5,77 log UFC·g⁻¹. Os pães fabricados com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, inibindo a multiplicação de bolores e leveduras durante todo o período analisado (24 dias) e apresentaram diferença significativa dos pães fabricados com fermento comercial.

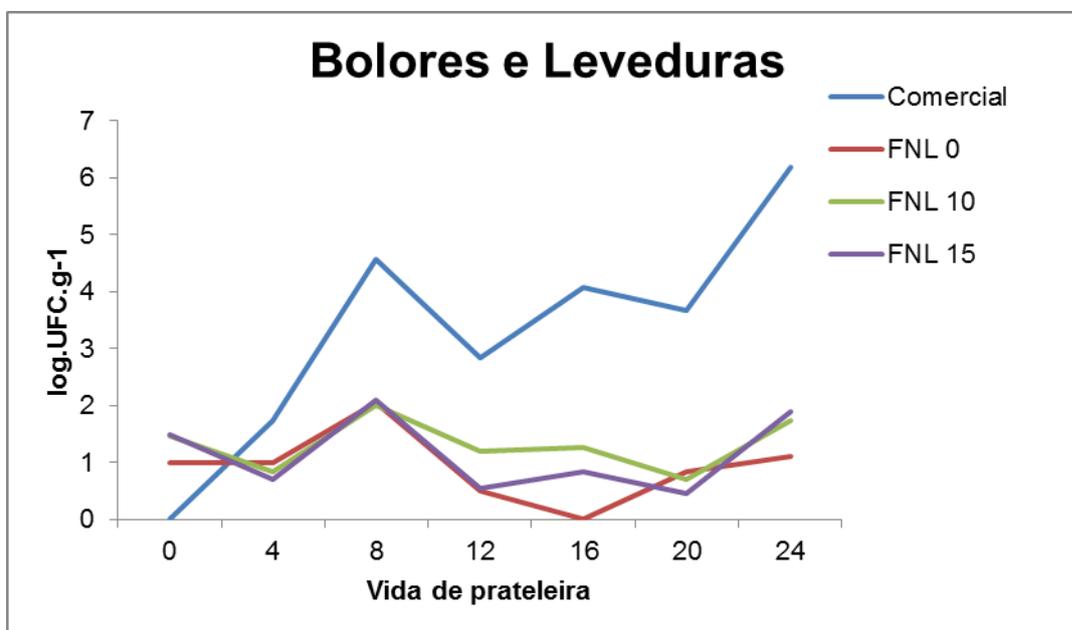


FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Figura 1. Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos realizadas nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, e com fermento comercial durante 24 dias de armazenamento.

As contagens de bolores e leveduras (Figura 2) dos pães produzidos com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, mostram que o tratamento comercial apresentou as maiores médias durante os 24 dias de armazenamento, atingindo contagens de 6,18 log UFC·g⁻¹. Todavia os tratamentos utilizando os fermentos naturais liofilizados com diferentes concentrações

de trealose apresentaram médias muito baixas ($0,000 - 2,103 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$) durante os 24 dias analisados.

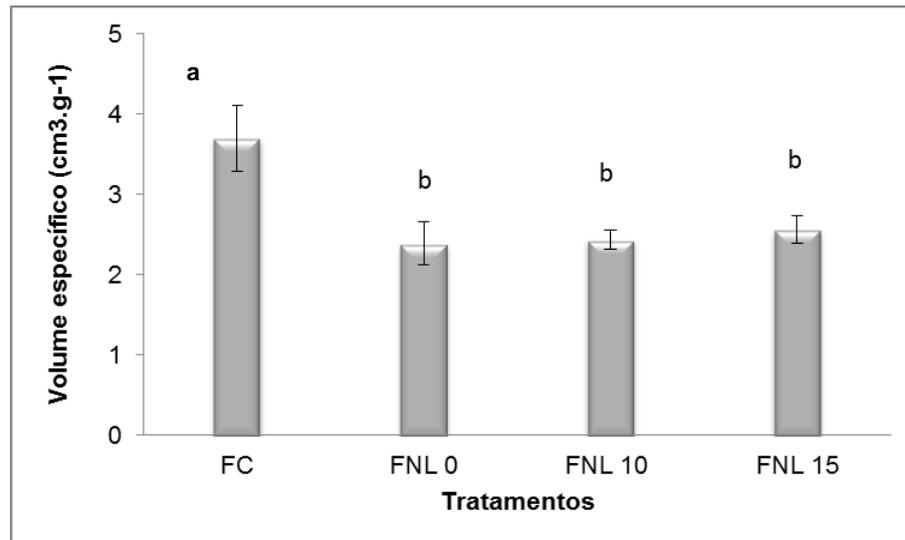


FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose. BL: bolores e leveduras

Figura 2. Contagens de bolores e leveduras realizadas nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, e com fermento comercial durante 24 dias de armazenamento.

Análises físico-químicas

Analisando os resultados de volume específico obtidos neste trabalho, podemos observar na Figura 3, que os pães produzidos com fermento comercial apresentaram o volume específico significativamente ($p < 0,05$) maior que os pães fabricados com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose. Entre os pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, não houve diferença significativa.



^{a,b} Letras diferentes diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose. FC: fermento comercial.

Figura 3. Efeito do fermento comercial e do fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, sobre o volume específico de pães.

A Tabela 4 mostra os resultados das análises da firmeza dos pães produzidos com fermento comercial e com fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose, realizada nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.

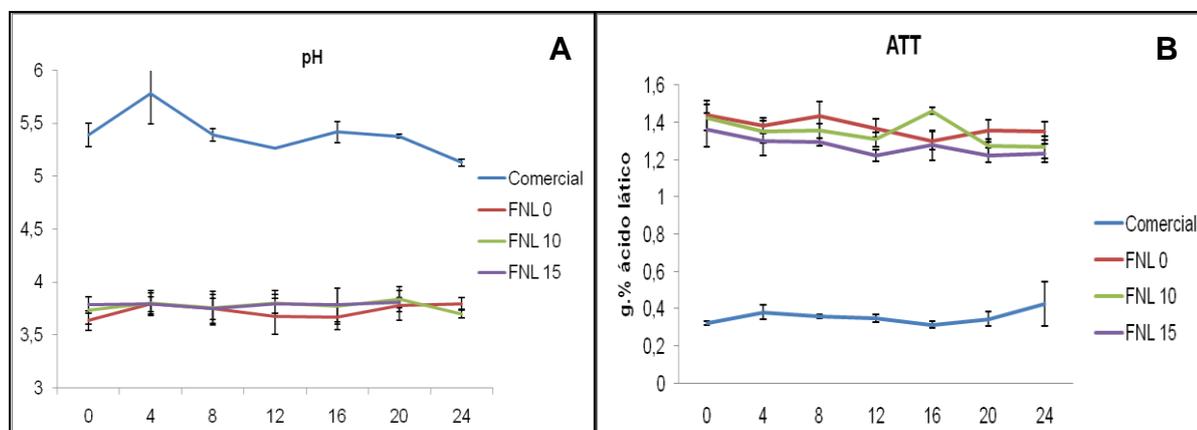
Tabela 4. Firmeza das fatias de pães produzidos com fermento comercial e com fermento natural liofilizado produzido com diferentes concentrações de trealose, avaliadas nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.

	COMERCIAL	FNL 0	FNL 10	FNL 15
0	622,71 ± (234,36) ^b	991,38 ± (229,30) ^a	920,08 ± (231,17) ^{ab}	937,64 ± (303,82) ^{ab}
4	2343,80 ± (243,10) ^b	6466,81 ± (1297,84) ^a	6689,17 ± (1566,42) ^a	5729,33 ± (2001,75) ^a
8	3.140,60 ± (774,97) ^c	7.874,69 ± (330,73) ^{ab}	8.967,02 ± (1597,52) ^a	6.675,41 ± (1304,89) ^b
12	3212,08 ± (768,16) ^b	9171,52 ± (877,43) ^a	9455,09 ± (1106,74) ^a	7881,17 ± (1866,03) ^a
16	2.678,09 ± (221,62) ^b	8.584,55 ± (442,42) ^a	10.124,06 ± (1635,64) ^a	10.401,75 ± (288,36) ^a
20	4816,32 ± (752,69) ^c	10724,16 ± (421,40) ^b	14755,31 ± (2436,48) ^a	11352,31 ± (1118,22) ^b
24	3887,15 ± (155,61) ^c	12664,07 ± (360,72) ^b	14229,96 ± (736,31) ^a	12945,04 ± (808,32) ^b

^{a,b,c} Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Analisando a variável firmeza, os pães fabricados com fermento comercial apresentaram os menores valores em todos os dias analisados, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos pães fabricados com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose. Nos dias 20 e 24, os pães fabricados com o fermento natural com 10% de trealose (FNL 10) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) comparado com os outros pães, apresentando a maior média.

A Figura 4 apresenta os resultados do pH e da acidez total titulável (ATT) dos pães fabricados com fermento comercial e com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, durante 24 dias de armazenamento. Detalhes são apresentados no Apêndice J. Observa-se na Figura 4 (A) que os pães fabricados com fermento comercial diferiram dos demais durante todo o período de armazenamento, apresentando uma variação de pH entre 5,13 e 5,77. Os pães fabricados com fermento natural liofilizado (FNL 0, FNL 10, FNL 15) não diferiram entre si, e variaram de 3,64 a 3,84. Também foi observada certa estabilidade no pH a partir do 4º dia até o 20º dia nos pães fabricados com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose.



FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose. ATT: acidez total titulável.

Figura 4. Valores de pH (A) e acidez total titulável (B) dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.

Os pães também foram monitorados com relação a sua acidez total titulável (ATT) durante 24 dias (Figura 4-B) e os resultados obtidos mostraram que os valores da ATT para os pães fabricados com fermento comercial ficaram entre 0,315 e 0,426

g % de ácido láctico e os pães fabricados com fermento natural liofilizado obtiveram valores entre 1,302 – 1,439; 1,267 – 1,462; e 1,224 – 1,361 g.% de ácido láctico para FNL 0; FNL 10 e FNL 15, respectivamente.

Na Tabela 5 estão representados os resultados da atividade de água (Aa) dos tratamentos com fermento comercial e com fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (FNL 0; FNL10; FNL 15). Observa-se que, em geral, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns pães fabricados com fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose, que apresentaram atividade de água entre 0,92 e 0,94 e os pães elaborados com fermento comercial, que a atividade de água variou entre 0,93 e 0,94. Entretanto, essa diferença estatística não é considerada relevante no produto final.

Tabela 5. Atividade de água (Aa) dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 após fabricação.

	COMERCIAL	FNL 0	FNL 10	FNL 15
0	0,93 ± (0,008) ^a	0,93 ± (0,005) ^a	0,93± (0,004) ^a	0,93 ± (0,002) ^a
4	0,93 ± (0,005) ^a	0,93 ± (0,003) ^a	0,92 ± (0,008) ^b	0,93 ± (0,003) ^{ab}
8	0,94 ± (0,001) ^a	0,93± (0,001) ^b	0,93± (0,004) ^{ab}	0,93± (0,001) ^{ab}
12	0,93± (0,001) ^{ab}	0,93± (0,002) ^{ab}	0,93± (0,002) ^b	0,93 ± (0,001) ^a
16	0,94 ± (0,005) ^a	0,93 ± (0,001) ^b	0,93± (0,001) ^b	0,93± (0,002) ^{ab}
20	0,93 ± (0,001) ^a	0,93± (0,002) ^b	0,93 ± (0,002) ^{ab}	0,92± (0,01) ^{ab}
24	0,94 ± (0,001) ^a	0,93± (0,002) ^{ab}	0,92± (0,006) ^c	0,93± (0,001) ^{bc}

^{a,b,c} Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) na linha pelo teste de Tukey na linha. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Análise sensorial

As características externas, internas, aroma e sabor e avaliação global dos pães elaborados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, encontra-se na Tabela 6. Observa-se que a maior nota foi a dos pães elaborados com fermento comercial, seguido pelos pães

produzidos com maior concentração de trealose (FNL15). Verificou-se um efeito diretamente proporcional à quantidade de trealose adicionada aos fermentos naturais liofilizados na avaliação global dos pães elaborados.

Os pães elaborados com fermento natural liofilizado com 15% de trealose (FNL 15) apenas diferiram, estatisticamente ($p < 0,05$), dos pães fabricados com fermento comercial em questão de volume específico, característica da crosta e na avaliação global, obtendo a nota de 80,42. Os pães produzidos com 0 (FNL 0) e com 10% de trealose (FNL 10) diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos pães fabricados com fermento comercial em praticamente todos os atributos de avaliados, apresentando notas da avaliação global de 64,44 e 72,24 pontos, respectivamente.

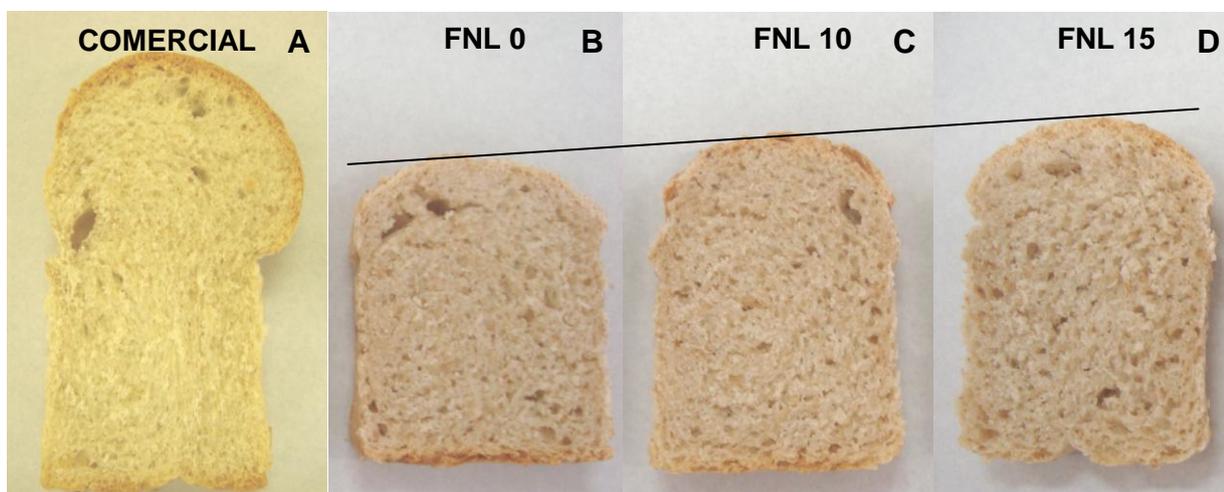


Figura 5. Aparência dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose. FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose. FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

A Figura 5 mostra a aparência dos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose corroborando com os resultados da Tabela 6.

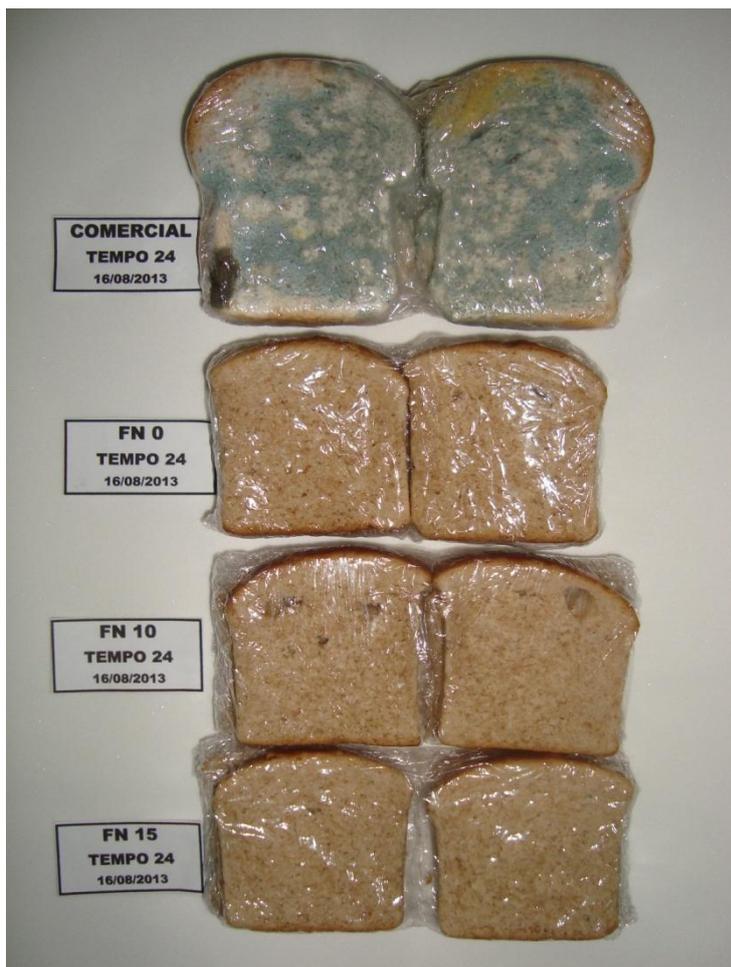
Tabela 6. Características externas, internas, aroma e gosto e avaliação global dos pães elaborados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose.

Características	Pontuação (máximo)	Pães			
		FC	FNL 0	FNL 10	FNL 15
1.Externas					
Volume (cm ³ .g ⁻¹)	20	11,35 ^a ± 0	7,19 ^d ± 0	7,99 ^c ± 0	8,92 ^b ± 0
Cor da crosta	10	9,00 ^a ± 0	7,75 ^c ± 0,29	8,25 ^{bc} ± 0,50	8,75 ^{ab} ± 0,50
Quebra	5	4,13 ^a ± 0,25	1,00 ^c ± 0	3,00 ^b ± 0	4,00 ^a ± 0
Simetria	5	4,63 ^a ± 0,48	3,50 ^b ± 0,58	4,00 ^{ab} ± 0	4,25 ^a ± 0,50
2.Internas					
Caract. Crosta	5	5,00 ^a ± 0	2,00 ^c ± 0	2,25 ^c ± 0,50	3,50 ^b ± 1,00
Cor do miolo ¹	10	10,00	10,00	10,00	10,00
Estrut. do miolo ¹	10	10,00	10,00	10,00	10,00
Textura do miolo	10	8,50 ^a ± 1,00	6,00 ^b ± 0	7,00 ^b ± 0,82	8,25 ^a ± 0,50
3.Aroma e Gosto					
Aroma	10	10,00 ^a ± 0	7,75 ^c ± 0,50	8,50 ^b ± 0,58	10,00 ^a ± 0
Gosto	15	14,50 ^a ± 0,58	9,25 ^c ± 1,50	11,25 ^b ± 1,71	12,75 ^{ab} ± 0,50
Avaliação Global	100	87,10 ^a ± 0,96	64,44 ^d ± 2,60	72,24 ^c ± 2,22	80,42 ^b ± 1,73

^{a.....d}Médias seguidas por letras diferentes na horizontal diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) na linha pelo teste de Tukey. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose; FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose; FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Observa-se na Figura 5 as diferenças significativas ($p < 0,05$) apontadas para o volume específico, simetria e características da crosta (Tabela 6). Os pães elaborados com fermento natural liofilizado mostraram um aumento crescente de volume específico diretamente proporcional a concentração de trealose adicionada (0, 10 e 15%).

A Figura 6 demonstra as alterações causadas por bolores e leveduras nos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, embalados fatiados em filme plástico após 24 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Verifica-se (Figura 6) que os pães fabricados com fermento natural liofilizado não sofreram alterações visíveis em 24 dias avaliados enquanto que nos pães elaborados com fermento comercial essas alterações foram visíveis indicando uma alta multiplicação de bolores e leveduras.



FN 0: fermento natural liofilizado sem trealose. FN 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose. FN 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Figura 6: Alterações causadas por bolores e leveduras nos pães fabricados com fermento comercial e fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose após 24 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

DISCUSSÃO

O fermento natural tem por característica, não só a presença de leveduras, como também apresenta na sua composição outros microrganismos, destacando as bactérias ácido lácticas (BAL) que foram avaliadas nesta pesquisa. Essas bactérias têm por função produzir metabólitos responsáveis pelo aroma e pela diminuição do pH no produto final. Esse efeito foi observado pela inibição do crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras nos pães produzidos com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose (FNL 0; FNL 10; FNL 15).

A qualidade dos produtos de padaria é muitas vezes relacionada com a sua crosta (espessura e cor) e a estrutura do miolo (sabor, textura e o tamanho das células). No entanto, os produtos de panificação têm uma vida útil curta, e a perda de frescura influencia negativamente a qualidade do produto e aceitação do consumidor, expresso por uma série de alterações químicas e físicas, conhecidas como endurecimento (Meziani et al., 2012). De fato a aparência, odor, cor, textura e sabor são atributos usados para determinar as propriedades sensoriais dos produtos de panificação (Stone & Sidel, 2004). O volume específico e a firmeza dos pães também são atributos de qualidade que influenciam na aceitação e comercialização desses produtos.

O volume específico é uma importante ferramenta para detectar fatores que interferem na elasticidade da massa frente à fermentação, uma vez que o volume do produto final é um atributo de grande relevância para a aceitação deste produto panificado (Palláres, et al. 2007). A firmeza é também considerada uma manifestação das propriedades reológicas de um alimento, sendo um importante atributo, pois afeta o processamento e manipulação, influências e hábitos alimentares e compromete a vida de prateleira e aceitação do produto pelos consumidores. Em geral, a firmeza é diretamente correlacionada com a cinética de acidificação da massa, que reduz a sua elasticidade e resistência à extensão (Arendt, Ryan & Dal bello, 2007) e também é influenciada pela retrogradação do amido (Cauvain;Young, 2009). Logo, o volume específico é influenciado também pela cinética de acidificação. Neste trabalho foi possível verificar que a utilização de 100% de fermento natural liofilizado não apresentou resultados competitivos frente ao pão fabricado com fermento comercial no quesito de volume específico e firmeza (Figura 3). Portanto, provavelmente, os pães produzidos com fermento natural liofilizado, em diferentes níveis de trealose, podem ter sido influenciados pelos metabólitos produzidos por bactérias ácido lácticas e pelas suas propriedades como: fermentação láctica, proteólise e síntese de compostos voláteis e ação antifúngica (Plessas et al., 2011), pois apresentaram um pH bastante ácido, comparado aos pães produzidos com fermento comercial. Além disso, a população microbiana avaliada no fermento comercial foi maior que a encontrada nos fermentos naturais liofilizados (Tabela 3), proporcionando um volume específico e uma maciez desejada ao produto.

Neste estudo, os pães foram produzidos com 100% de fermento natural liofilizado e apresentaram pH mais baixos que os obtidos no trabalho de Hansen & Hansen (1996) que utilizaram somente 15% de fermento natural no preparo dos pães. Este fato pode ser comprovado pelo estudo de Clarke et al., (2003) que relataram uma diminuição constante e gradativa do pH em fermentações prolongadas e com grande concentração de fermento natural.

A acidez total titulável também é afetada pelas taxas de adição de uma cultura *starter* de bactéria ácido láctica em pães tipo *sourdough*. Os tempos de fermentação e a presença de outros metabólicos ou uma relação sinérgica entre as leveduras e as bactérias ácido lácticas presentes no fermento natural podem estar influenciando essas alterações na acidez (Clarke et al., 2003). Neste trabalho os pães fabricados com fermento comercial apresentaram uma acidez total titulável diferente e significativa ($p < 0,05$) comparada com os pães elaborados com fermento natural liofilizado, com diferentes concentrações de trealose, mostrando valores mais baixos e estáveis durante os 24 dias de armazenamento (Figura 4). Esses resultados corroboram com os de Plessas et al. (2011), pois os microrganismos presentes no fermento natural liofilizado apresentam a capacidade de acidificar o meio no qual estão inseridos.

Em pH abaixo de 4,0, há um aumento da repulsão eletrostática causando a solubilidade das proteínas da farinha de trigo, impedindo a formação de novas ligações (Clarke et al., 2004). A redução dessas ligações dissulfureto intramoleculares solubiliza as proteínas do glúten e permite um maior acesso das enzimas proteolíticas permitindo a proteólise mais eficiente (Thiele et al., 2002). Algumas das conseqüências da proteólise incluem uma melhoria no sabor do pão. A acumulação de aminoácidos durante a fermentação *sourdough* aumenta a formação de produtos voláteis de aroma, durante o cozimento. Outra conseqüência da proteólise é uma mudança na reologia da massa e na textura do pão (Clarke et al., 2004).

A maioria dos trabalhos realizados com pães tipo *sourdough* citam a redução do pH como responsável pelas mudanças tecnológicas da massa e nutricionais e de conservação do pão (Clarke et al., 2002; Komlenic et al., 2010). A acidez gerada durante a fermentação dos pães fabricados com fermento natural liofilizado desencadeou três efeitos principais na massa, que são o fortalecimento das proteínas, a diminuição do pH que causa o aumento da durabilidade do pão ao

retardar o processo de deterioração e inibindo o crescimento do mofo e a formação de ácidos orgânicos que são muito importantes para o sabor do produto final (Suas, 2012).

Com base nas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras (Figura 1 e 2) observa-se que o fermento comercial não apresentou nenhum obstáculo para a multiplicação desses microrganismos enquanto que nos pães fabricados com fermento natural liofilizado houve uma inibição bastante acentuada. O resultado favorável das análises microbiológicas durante os 24 dias de armazenamento é decorrente da presença das bactérias ácido lácticas (BAL). Isso justifica a inibição dos microrganismos pelo alto teor de ácido láctico. Magnusson e Schnürer (2001) defendem que a presença das BAL serve como agente esterilizante para muitas espécies. Sendo assim as bactérias ácido lácticas dificultam a ação deteriorante dos microrganismos protegendo tanto o meio fermentativo como o produto final. Outros estudos (Lavermicocca et al., 2000) têm confirmado o impacto positivo de compostos antifúngicos provenientes de fermento natural na vida de prateleira de produtos de panificação.

Analisando os resultados obtidos na análise sensorial deste estudo (Tabela 6), observou-se que somente nas características de volume e crosta houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os pães produzidos com fermento comercial (FC) e fermento natural liofilizado com 15% de trealose (FNL15). Na avaliação global, segundo El-Dash (1978), os pães produzidos com FC foram classificados como bons e os produzidos com FNL15 foram classificados como razoável, devido a baixa aceitação pelos provadores treinados das características de volume específico, crosta e gosto. Vale ressaltar que os pães tipo *sourdough* apresentam como característica um gosto ácido e nem todos os consumidores apreciam.

Sob o ponto de vista sensorial, os pães tipo *sourdough* fabricados com fermento natural liofilizado com 0 e 10% de trealose, foram classificados como ruins. Embora a produção de pães tipo *sourdough* utilizando 100% de fermento natural não teve boa aceitação sensorial, observou-se que a vida de prateleira até 24 dias foi preservada nesses pães comparada aos pães produzidos com fermento comercial (Figura 6). Normalmente, o nível de adição de fermento natural no preparo de pães de trigo não ultrapassa os 50% (Lorenz & Brummer, 2003; Torrieri et al., 2014), uma vez que intensa acidificação pode causar sabores diferenciados além de diminuir o volume do pão (Kaditzky et al., 2008).

Entretanto, esses resultados servirão de instrumento para novas e mais aprimoradas pesquisas a cerca da utilização de uma menor concentração de fermento natural na formulação de pães, podendo dessa maneira agradar a um maior número de consumidores.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- a utilização de 100% de fermento natural liofilizado na fabricação de pães tipo *sourdough* causa uma forte inibição do crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras;

- os pães fabricados com fermento natural liofilizado, independente da concentração de trealose utilizada, não apresentaram diferenças significativas entre si em relação a pH, ATT, firmeza, Aa e contagens microbiológicas de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras;

- sensorialmente, os pães fabricados com o fermento natural adicionado de 15% de trealose foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos pães fabricados com 0 e 10% de trealose e diferiram do controle apenas no atributo volume, característica da crosta e gosto;

- os pães produzidos com FNL apresentaram maior vida de prateleira que os pães produzidos com FC, aos 24 dias;

- a aplicação tecnológica de fermento natural liofilizado poderá impulsionar as pesquisas no sentido de agregar metodologias de preparo de pães já existentes com processos mais artesanais, possibilitando um aumento na vida de prateleira dos produtos de panificação sem ser necessário o uso de conservantes artificiais.

- estudos mais aprofundados sobre a quantidade de fermento natural a ser adicionado na produção de pães tipo *sourdough* são necessários, a fim de atender os requisitos de identidade e qualidade e a vida de prateleira dos mesmos e a identificação e quantificação dos microrganismos presentes no fermento natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. American association of cereal chemists. (1995). *Approved Methods of American Association of Cereal Chemists*. (9. ed). St. Paul: Approved Methods Committee. Author.

APHA. American Public Health Association. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (3 ed). Washington: APHA. 676p. Author.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (17th ed.). Horwitz, W: Gaithersburg, MD. Author.

Arendt, E. K., Ryan, L. A. M., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24, 165–174.

BRASIL. (2001). ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos*. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>> . Acesso em: 22 nov. 2013.

BRASIL. (2000). ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução nº 90, de 18 de outubro de 2000 – Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/90_00.htm>. Acesso em: 22 nov. 2013.

BRASIL. (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. 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. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

Clarke, C. I., Schober, T. J., Angst, E., & Arendt, E. K. (2003). Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat Bread quality. *European Food Research and Technology*, 217, 23-33.

Clarke, C. I., Schober, T. J., & Arendt, E. K. (2002). Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. *Cereal Chemistry*, 79 (5), 640-647.

Clarke, C. I., Schober, T.J., Dockery, P., O’Sullivan, K., & Arendt, E.K. (2004). Wheat sourdough fermentation. Effect of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry*, 81, 409–417.

Clarke, C. I., & Arendt, E.K. (2005). A review of the application of sourdough technology to wheat breads. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49, 137–161.

Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation: A review. *Food Research International*, 40, p. 539–558.

De Vuyst, L., & Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24, 120–127.

De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., & Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26, 666-675.

De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 43-56.

El-Dash, A. A. (1978). Standardized mixing and fermentation procedures for experiments baking test. *Cereal Chemistry*, 55 (336), 436-446.

Gutkoski, L. C., & Neto, Jacobsen, R. (2002). Procedimento para teste laboratorial de panificação – pão de forma. *Ciência Rural*, 32 (5), 873-879.

Hallen, E., Ibanoglu, S., & Ainsworth, P. (2004). Effect of fermented/germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour. *Journal of Food Engineering*, 63 (2), 177-184.

Hammes, W. P., & Gänzle, M. G. (1997). Sourdough breads and related products, In B. J. B. Wood. *Microbiology of fermented foods*. Chapman & Hall, Ltd., London, England. 199–216.

Hansen, A., & Hansen, B. (1996). Flavour of sourdough wheat Bread crumb. *Z Lebensm UntersForsch*, 202, 244-249.

Huidobro, F. R., Miguel, E., Blázquez, E., & Onega, B. (2005). A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69 (3), 527-536.

Komlenic, D. K., Hardi, Z. U., Marko J., Planinić, M., Bucić-Kojić, A., & Strelec, I. (2010). Wheat dough rheology and bread quality effected by *Lactobacillus brevis* preferment, dry sourdough and lactic acid addition. *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (7), 1417-1425.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4084–4090.

Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 1-5.

Moroni, A. V., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2009). Sourdough in gluten-free breadmaking: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology*, 26, 676-684.

Moura, E. E. (2002). O sabor do pão. *Aditivos & Ingredientes*, 19, 66-68.

Pallarés. M. G. et al. In: Leon, A. E.; Rosell, C. M. (2007). *De tales harinas, tales panes – Granos, arinas y productos de panificación em Iberoamérica*. Córdoba: Hugo Báez, (cap. 1), 17-71.

Plessas, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Koutinas, A. Voidarou, C., Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2011). Application of novel starter culture for sourdough bread production. *Anaerobe*, 17, 486-489.

Salovaara, H. (1998). Lactic acid bacteria in cereal products. In Salminen, S., A. Von Wright, *Lactic acid bacteria—technology effects*, (2nd ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, 115–138.

Stefanello, R. F., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., & Machado, A. A. R. (in press). Production and lyophilization of natural yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Suas, M. (2012). *Panificação e viennoiserie: abordagem profissional*. São Paulo: Cengage Learning, 442p.

Thiele, C., Ganzle, M. G., & Vogel, R. F. (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chemistry*, 79, 45–51.

Valmorri, S., Tofalo, R., Settanni, L., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2010). Yeast microbiota associated with spontaneous fermentation of traditional wheat sourdough breads of Abruzzo region (Italy). *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97, 119–129.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi produzido um fermento natural liofilizado (FNL), com diferentes concentrações de trealose, a partir da mistura de farinha de trigo branca e integral. Foram avaliadas as características físico-químicas e microbiológicas do FNL e sua aplicação em pães tipo *sourdough*.

A utilização de farinha de trigo integral na produção de fermento natural, não comumente utilizada nos processos artesanais, foi escolhida pelo fato de quanto menos processada for uma farinha, maior será o número de microrganismos presentes (SHEIRLINK, et al., 2009). Foi observado no presente estudo, que a farinha de trigo integral apresentou um crescimento de mais de 1 e 2 ciclos log de bactérias ácido lácticas (BAL) e de bolores e leveduras (BL) que a farinha de trigo branca, respectivamente.

O pH do fermento natural fabricado a partir de farinha de trigo branca e integral, no primeiro dia de fabricação foi de aproximadamente 6 e decresceu já no quarto dia para aproximadamente 4, mantendo-se assim até o final do período de armazenamento (14 dias). A acidez total titulável (ATT) do fermento natural fabricado a partir de farinha de trigo branca e integral aumentou durante o período de armazenamento, apresentando valores menores que 0,4 no 1º dia e maiores que 1,2 já no 6º dia de armazenamento, sendo inversamente proporcional ao pH, pois quanto mais baixo o pH maiores foram os valores encontrados para a ATT (Apêndice E).

As bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras (BL) no fermento natural fabricado a partir de farinha de trigo branca e integral apresentaram um aumento no crescimento de 2 para 8 ciclos log já no 4º dia e os BL de 2 para 6 log UFC·g⁻¹ e mantiveram-se constantes até o 14º de armazenamento, a temperatura de 30°C. Essa estabilização na multiplicação dos microrganismos nos sugere uma produção do fermento natural em tempo mais curto uma vez que as diferenças entre o 8º dia com o 14º dia não foram significativas.

A liofilização como método de preservação, mantém estável a viabilidade celular durante o período de estocagem (COSTA; FERREIRA, 1991; SILVA et al., 1992; JAY, 2005). No entanto, o processo de congelamento provoca danos às células dos microrganismos (MOMOSE et al., 2010). No entanto, estudos têm

mostrado (SELVA et al., 2013; NERI et al. 2014) que a adição de agentes crioprotetores pode vir a proteger as células microbianas quando submetidas ao congelamento. No presente estudo, a adição de trealose, um crioprotetor utilizado em diferentes concentrações, diminuiu a perda de células microbianas no fermento natural liofilizado.

O processo de liofilização é importante para a manutenção de fermentos naturais, pois está relacionado à diminuição da umidade e da atividade de água, necessária para impedir o crescimento dos microrganismos e prolongar a vida de prateleira dos mesmos. Além disso, a aplicação industrial do fermento natural, na forma liofilizada, se torna mais atraente em vista da redução dos custos com a manutenção e produção dos fermentos naturais frescos.

O efeito da trealose como crioprotetor no processo de liofilização do fermento natural foi evidenciado mais nas BAL que nos BL. Nas BAL, a redução de microrganismos foi de aproximadamente 2 ciclos log, não sendo influenciada pelas diferentes concentrações de trealose, enquanto que nos BL a viabilidade dos microrganismos foi inversamente proporcional a quantidade de trealose adicionada, ou seja, houve uma diminuição de 5, 4 e 3 ciclos log para os tratamentos com 0, 10 e 15 % de trealose, respectivamente. Não há evidências na literatura que possam comparar os fatos apresentados acima. Apenas sabe-se que a trealose, juntamente com o glicogênio, são substâncias de reserva para a levedura, porém, recentemente, vários autores (STRASSER et al., 2009 ;DE GIULIO et al., 2005) sugerem que a trealose possui função de proteção para a célula da levedura durante processos de estresse, tais como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação.

A contagem inicial de BL no fermento comercial (FC) e nos fermentos naturais liofilizados, adicionados de doses crescentes de trealose, foi maior no FC (7,90 log UFC·g⁻¹), seguido do FNL com 15% de trealose (6,40 log UFC·g⁻¹), 10% (6,12 log UFC·g⁻¹) e 0% (4,84 log UFC·g⁻¹). Esse fato refletiu nas características sensoriais dos pães tipo *sourdough*, onde os pães produzidos com FC apresentaram melhores resultados, seguidos dos pães produzidos com 15, 10 e 0% de trealose adicionada ao FNL. Isto demonstra a necessidade da maior quantidade de microrganismos presentes no fermento necessária para a uma boa fermentação dos pães.

Observou-se também que os pães produzidos com fermento adicionado de 15% de trealose somente diferiram estatisticamente dos produzidos com fermento

comercial nos atributos de volume específico, firmeza, características da crosta e gosto. Logo, o volume e a firmeza dos pães está relacionada com a quantidade de BAL presentes no fermento e o gosto, devido ao pH encontrado nos pães produzidos com fermento comercial (entre 5,0 a 5,5) e nos produzidos com 15% de trealose que variou de 3,5 a 4,0. A acidificação causada pelas BAL influenciou as transformações enzimáticas e a proteólise deixando o miolo com uma textura mais rígida e pães com volume específico menor devido a pouca resistência a expansão. Sensorialmente, os pães produzidos com fermento comercial foram classificados como bom, enquanto que os produzidos com 100% de fermento natural liofilizado obtiveram a classificação de razoáveis para os produzidos com 15% de trealose e ruins para os pães produzidos com 0% e 10% de trealose. Apesar de os pães produzidos com 100% de fermento natural liofilizado apresentarem uma baixa aceitabilidade sensorial, a vida de prateleira destes pães foi maior que nos pães produzidos com fermento comercial (FC), até os 24 dias analisados. Os pães elaborados com FC apresentaram altas concentrações de BL e uma visível deterioração já no 8º dia de fabricação.

O decréscimo do volume observado nos pães elaborados com fermento natural liofilizado, em diferentes concentrações de trealose, pode ser explicado devido a adição de farinha de trigo integral que causa uma descontinuidade na rede protéica do glúten, além de aprisionar mais facilmente água, tornando a massa mais coesa e de difícil retenção de gases promovidos pelas leveduras na etapa de fermentação (WANG et al., 2002). Os pães tipo *sourdough* são fermentados por leveduras e também por bactérias ácido lácticas, que produzem metabólitos, acidificando os produtos fabricados. Uma acidez acentuada pode afetar negativamente a qualidade do pão *sourdough*, uma vez que pode causar sabores diferenciados (pão com acidez elevada) e reduzir volume do pão, bem como sua suavidade (KADIZKY et al., 2008).

A transformação enzimática juntamente com a formação de exopolissacarídeo pelas bactérias ácido lácticas contribui para o metabolismo da sacarose (GÄNZLE & SCHWAB, 2009) e essas mudanças no processo de fermentação natural tende a melhorar o volume e a textura além de aumentar o teor de fibra dietética. No entanto, o efeito benéfico dos exopolissacarídeo formados pelas bactérias ácido lácticas pode ser mitigado pela acidez excessiva, causada pelas bactérias ácido lácticas presentes nos tratamentos elaborados a partir de fermento natural. A maioria dos estudos

publicados até o momento utilizou uma mistura de fermento comercial e natural na fabricação dos pães (TORRIERI et al., 2014). Em contrapartida, o presente estudo utilizou 100% de fermento natural liofilizado, justificando o decréscimo do volume específico e mudanças na firmeza dos pães *sourdough* devido à elevada acidez causada pelas BAL. Assim, a qualidade dos pães *sourdough* é influenciada pela cinética de acidificação e pelo metabolismo entre as diferentes espécies de BAL como também pela composição microbiológica de cada fermento natural utilizado em pães. A exploração das atividades metabólicas desejáveis das BAL acabará permitindo a seleção da cultura de partida mais adequada para ser usada em panificação com melhores resultados no produto final (EHRMANN & VOGEL, 2005).

A importância da fermentação natural na vida moderna é ressaltada pelo amplo espectro de alimentos fermentados e que são comercializados atualmente, não só pelo benefício da preservação e segurança, mas também por seus atributos sensoriais altamente apreciados e por modular as propriedades nutricionais em uma série de maneiras, tais como aumento dos níveis ou biodisponibilidade de compostos bioativos além de retardar a digestibilidade do amido (FLANDER et al., 2011). Além destas características, a utilização de fermento natural na produção de pães aumenta a vida útil e inibe o crescimento dos microrganismos deteriorantes reduzindo o uso de conservantes químicos.

Quando se avalia atributos sensoriais em pães tipo *sourdough*, o gosto ácido e o sabor acentuado prevalecem e são fortemente observados pelos provadores. Os consumidores estão habituados com pães menos ácidos e, por isso, a elevada acidez de pães *sourdough* não é muito apreciada pela maioria. Em um estudo com pães fabricados a partir de um fermento natural liofilizado a base de gérmen de trigo (RIZZELLO et al., 2010) foi observado um gosto levemente mais salgado, provavelmente relacionado com o efeito da acidificação e proteólise por bactérias ácido lácticas presentes no fermento natural.

Estudos estão sendo desenvolvidos a fim de buscar o isolamento e a identificação dos microrganismos presentes no fermento natural fabricado com a mistura de farinha de trigo branca e integral para aperfeiçoar o processo fermentativo e contribuir com a qualidade final dos produtos de panificação.

6 CONCLUSÃO GERAL

Em relação à escolha da farinha de trigo integral utilizada na fabricação dos fermentos naturais liofilizados, esta apresentou 2 ciclos log de bolores e leveduras (BL) a mais do que na farinha de trigo branca. Em contrapartida, as contagens de bactérias ácido lácticas na farinha de trigo branca e na farinha de trigo integral não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre si.

O pH do fermento natural diminuiu rapidamente (de 6 para 4) nos primeiros 4 dias de armazenamento e manteve-se constante até o 14º de armazenamento. A acidez total titulável (ATT) aumentou consideravelmente nos primeiros 6 dias, apresentando 1,2 g.% ác. láctico, mantendo-se estável a partir desta data.

No primeiro dia de fabricação do fermento natural, estes apresentaram uma contagem de BAL e BL igual a 2 log UFC·g⁻¹ e após 4 dias de armazenamento as contagens aumentaram para 8 log UFC·g⁻¹ e 6 log UFC·g⁻¹ para BAL e BL, respectivamente. O fermento natural apresentou uma estabilização em suas contagens microbiológicas após o 4º dia e com isso sugere-se uma fabricação em tempo mais curto.

O processo de liofilização de fermento natural foi eficiente, pois as amostras desse fermento natural liofilizado, após o processo de liofilização, apresentaram aproximadamente uma redução de 50% de sua umidade inicial e dos valores de atividade de água mantendo-se estáveis por um período de 45 dias.

A adição de 10 e 15% de trealose nos fermentos naturais propiciou maior rendimento quando comparado com o fermento natural sem a adição de trealose. No entanto, deve-se calcular o custo/benefício da utilização da trealose em processos de liofilização, pois não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos utilizando 10 ou 15% de trealose.

O efeito da trealose como crioprotetor no processo de liofilização do fermento natural foi evidenciado, pois as BAL apresentaram uma redução de microrganismos de aproximadamente 2 ciclos log, não sendo influenciada pelas diferentes concentrações de trealose utilizada, enquanto que nos BL, a viabilidade dos microrganismos foi inversamente proporcional a quantidade de trealose adicionada,

ou seja, houve uma diminuição de 5, 4 e 3 ciclos log para os tratamentos com 0, 10 e 15 % de trealose, respectivamente.

Os pães fabricados com fermento natural liofilizado, indiferente da concentração de trealose, foram semelhantes em relação ao pH, ATT, Aa, firmeza e contagens microbiológicas durante os 24 dias de armazenamento. Entretanto, os pães elaborados com 15% de trealose (FNL 15) quando comparados com os pães fabricados com fermento comercial, diferiram somente em relação ao volume específico, características da crosta e na avaliação global.

O volume específico foi maior nos pães fabricados com FC. Entre os pães fabricados com FNL, indiferentes da concentração de trealose adicionada foram semelhantes entre si. A firmeza dos pães elaborados com FNL foi significativamente maior do que a verificada nos pães fabricados com FC e foi aumentando gradativamente durante os 24 dias de armazenamento. Os pães fabricados com FC apresentaram um pH entre 5,0 e 5,5 e os pães elaborados com FNL apresentaram valores entre 3,5 a 4,0 enquanto que a ATT foi maior e significativa nos pães fabricados com FNL quando comparada com os pães fabricados com FC.

Na avaliação sensorial, os pães produzidos com um teor maior de trealose (15%) foram classificados como razoáveis, com 0 e 10% de trealose foram classificados como ruins e os pães produzidos com fermento comercial foram classificados como bons.

Os pães elaborados com fermento natural liofilizado não apresentaram nenhuma alteração visível até 24 dias de armazenamento, enquanto que o pão elaborado com fermento comercial apresentava sinais visíveis de deterioração já no 8º dia de armazenamento.

A pedido da direção da empresa fornecedora da farinha de trigo integral utilizada nesse experimento este trabalho foi apresentado aos membros do controle de qualidade. Após, o diretor encaminhou um documento, afirmando que o fermento natural liofilizado desenvolvido durante o período da realização deste trabalho pode ser considerado uma alternativa viável e com grande aplicação industrial no ramo da panificação.

Portanto, os resultados deste trabalho podem servir de instrumento para novas e mais aprimoradas pesquisas sobre os métodos de fabricação existentes. Também servirá para impulsionar as indústrias a pensarem em um produto mais natural e livre de conservantes químicos, uma vez que foi evidenciada a capacidade

de inibir fortemente o crescimento dos microrganismos por 24 dias, sem a utilização de conservantes artificiais.

Sugere-se, para futuras pesquisas, o isolamento e a identificação dos microrganismos presentes no fermento natural liofilizado e também a utilização de uma mistura entre fermento comercial e fermento natural liofilizado para a aplicação em produtos de panificação buscando o aprimoramento das características sensoriais e de qualidade no produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANQUIER, O. **Pães de França**. 2. ed. São Paulo: DBA artes Gráficas e Companhia Melhoramentos de São Paulo, 1997. 141p.

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

BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1208–1216. 2009.

BANU, I.; VASILEAN, I.; APRODU, I. Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. **Food Biotechnology**, v. 25, p. 275-291, 2011.

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

BIANCHINI, M. C. **Desenvolvimento de fermento natural seco para a produção de panetone**. 2004, 123f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2004. Disponível em: <<http://www.fea.unicamp/alimentarium>>. Acesso em: 02 set. 2012.

BRANCA, C.; MAGAZU, S.; MAISANO, G.; MIGLIARDO, P.; TETTAMANTI, E. On the bioprotective effectiveness of trehalose: Ultrasonic technique, Raman scattering and NMR investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 480–481, p. 133–140. 1999.

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

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90, de 18 de outubro de 2000 – **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/90_00.htm>. Acesso em: 22 nov. 2013.

BRASIL. Resolução ANVISA nº 263, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 26 out. 2012.

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

CAUVAIN, Stanley P.; YOUNG, Linda S. **Tecnologia da panificação**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. 418p.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 8, 2000. p. 3044–3051.

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

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2087–2093, 1996.

CROWLEY, P.; SCHOBER, T.; CLARKE, C.; ARENDT, E. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. **European Food Res. Technology**. v. 214, 2002. p. 489–496.

DAMODARAN, et al. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DE GIULIO, B.; ORLANDO, P.; BARBA, G.; COPPOLA, R.; DE ROSA, M.; SADA, A.; DE PRISCO, P. P. and NAZZARO, F. Use of alginate and cryoprotective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, 2005. p. 739–746.

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

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

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

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

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

EL DASH, A. A. **Tecnologia de Moagem e Panificação**. Campinas, SP: Cerealtec International, 1982. 218p.

EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. **Trends and Food Science and Technology**, v. 16, p. 31-42, 2005.

FEBLES, C. I.; ARIAS, A.; HARDISSON, A.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, C.; SIERRA, A. Phytic acid level in wheat flours. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 19-23, 2002.

GAGGIANO, M.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; ARNAULT, P.; TOSSUT, P.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. **Food Microbiology**, v. 24, p. 15-24, 2007.

GALLE, S.; ARENDT, E. K. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** (in press). 2013.

GANDRA, Kelly M.; DEL BIANCHI, Michelle; GODOY, Vanessa Padovani; QUEIROZ, Fernanda P. C.; STEEL, Caroline J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008. p. 182-192.

GÄNZLE, M. G.; SCHWAB, C. Ecology of exopolysaccharide formation by lactic acid bacteria: sucrose utilization, stress tolerance, and biofilm formation. In: Ullrich, M. (Ed.), **Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends**. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 263-278, 2009.

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

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C.G. Sourdough lactic/acid bacteria. In: Arendt, E.K., Dal Bello, F. (Eds.), **Gluten-free Cereals Products and Beverages**. Elsevier, pp. 267-288, 2008.

GOBBETTI, M.; SIMONETTI, M. S.; CORSETTI, A.; SANTINELLI, F.; ROSSI, J.; DAMIANI, P. Volatile compound and organic acid production by mixed wheat sour dough starters: Influence of fermentation parameters and dynamics during baking. **Food Microbiology**, v. 12, p. 497-507, 1995.

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.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. **The genus Lactobacillus**. In: B. J. B. Wood, & W. H. Holzapfel. The genera of lactic acid bacteria. London: Blackie Academic & Professional, p. 19-54, 1995.

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 & Technology**, v. 16, 2005. p. 4-11.

IZUTSU, K-I.; YOMOTA, C.; KAWANISHI, T. Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100 (7). p. 2935–2944. 2011.
doi: 10.1002/jps.22518.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 389-391. (711p.)

KADITZKY, S.; SEITTER, M.; HERTEL, C.; VOGEL, R. F. Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 433-442. 2008.

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

KATINA, K.; ARENDT, E.; LIUKKONEN, K. H.; AUTIO, K.; FLANDER, L.; POUTANEN, K. Potential of sourdough for healthier cereal products. **Trends Food Science Technology**, v. 16, p. 104–112, 2005.

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

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

KORAKLI, M.; PAVLOVIC, M. M.; GÄNZLE, G.; VOGEL, R. F. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2073-2079, 2003.

LACUMIN, Lucilla; CECCHINI, Francesca; MANZANO, Marisa; OSUALDINI, Milena; BOSCOLO, Daria; ORLIC, Sandi; COMI, Giuseppe. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food microbiology**, v. 26, 2009. p. 128-135.

LAMPIGNANO, et al. Microstructure, textural and sensorial properties of durum wheat bread as affected by yeast content. **Rev. Food Research International**. v. 50, p. 369-376, 2013.

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

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, ago. 1995.

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

MAGAZÚ, S.; MIGLIARDO, F.; MONDELLIB, C.; VADALA, M. Correlation between bioprotective effectiveness and dynamic properties of trehalose–water, maltose–water and sucrose–water mixtures. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2796–2801, 2005.

MAHMUD, S. A.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; YOSHIKAWA, K.; ASHITANI, K.; SHIMIZU, H. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, n. 1, p. 17–30, 2009.

MEUSER, F.; BARBER, B.; FISCHER, G. Determination of the microbial activity of dried sourdough by revitalization of their lactic acid bacteria and yeasts. **Food Control**, v. 6, n. 3, p. 147-154, 1995.

MOMOSE, Y.; MATSUMOTO, R.; Maruyama, A.; Yamaoka, M. (2010). Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze–thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cryobiology**, v. 60 (n. 3), p. 245–261.

MORONI, A. V.; ARENDT, E.K.; DAL BELLO, F. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. **Food Microbiology**, v. 28, p. 497-502, 2011.

MOULINEY, et al. Waxy durum and fat differ in their actions as improvers of bread quality. **Journal of Cereal Science**. v. 54, p. 317-323, 2011.

NERI, L.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, Dino.; PITTIA, P. Mechanical properties and microstructure of frozen carrots during storage as affected by blanching in water and sugar solutions. **Food Chemistry**, v. 144, p. 65-73. 2014.

NOORT, M. W. J.; BULT, J. H. F.; STIEGER, M. Saltiness enhancement by taste contrast in bread prepared with encapsulated salt. **Journal of Cereal Chemists**, v. 55, p. 218-225, 2012.

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. D.O.I.:10.7198/S2237-0722201300010008

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética**: seleção e preparo de alimentos. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1995.

PALLARÉS, M. G. et al. Trigo. In: LEON, A. E.; ROSELL, C. M. **De tales harinas, tales panes** – Granos, arinas y productos de panificación em Iberoamérica. Córdoba: Hugo Báez, 2007. cap. 1. p. 17-71.

PEPE, O.; BLAIOTTA, G.; ANASTASIO, M.; MOSCHETTI, G.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 443-453, 2004.

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, p. 1256-1262, 2012.

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, p. 486-489, 2011.

POUTANEN, K. Preface: Sourdough – multifunctional process technology for future food challenges. **Food Microbiology**, v. 37, p. 1, 2014.

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

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnología de la panificación**. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, Espanha. 1991.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 311-319. 2001.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2007, 184p.

RIZZELLO, C. G.; NIONELLI, L.; CODA, R.; De ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of sourdough fermentation on stabilization, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. **Food Chemistry**, v. 119, issue 3, p. 1079-1089, 2010. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.08.016

SAEED, M.; ANJUM, F. M.; ZAHOOR, T.; NAWAZ, H. & REHMAN, S. U. Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 11, n. 3, 2009. p. 329-332.

SANTO, E. F.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science Technology**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013.

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

SELVA, CORRADO, ET AL. Trehalose Preserves the Integrity of Lyophilized Phycoerythrin-Antihuman CD8 Antibody Conjugates and Enhances their Thermal Stability in Flow Cytometric Assays. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.102, n. 2, p. 649-659, 2013.

SILVA, L. F.; KAMIYA, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, n. 3, p. 177-182, 1992.

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 Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1099-1109, 2009.

SCAZZINA, F.; DEL RIO, D.; PELLEGRINI, N.; BRIGHENTI, F. Sourdough bread: starch digestibility and postprandial glycemic response. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 419–421. 2009.

STRASSER, S.; NEUREITER, M.; GEPPL, M.; BRAUN, R.; DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, 2009. p. 167–177.

SUAS, Michel. **Panificação e viennoiserie**: abordagem profissional. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 442p.

THIELE, C.; GRASSL, S.; GÄNZLE, M. G. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1307-1314, 2004.

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, p. 508-516, 2014.

TREVISOL, E. T.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 697-704. 2011. doi: 10.1007/s00253-010-3053-x.

ULZIJARGAL, E.; YANG, J.; LIN, L.; CHEN, C.; MAU, J. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. **Food Chemistry**, n. 138, p. 70-76, 2013.

VALMORRI, S.; TOFALO, R.; SETTANNI, L.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Yeast microbiota associated with spontaneous fermentation of traditional wheat sourdough breads of Abruzzo region (Italy). **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 97, p. 119–129. 2010.

VAN DER MEULEN, R.; SCHEIRLINCK, I.; VAN SCHOOR, A.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4741-4750. 2007.

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

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

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

WANG, J.; ROSELL, C. M.; BARBER, C. B. Effect of addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. **Food Chemistry**. v. 79, p. 221-226, 2002.

WECKX, S.; ALLEMEERSCH, J.; VAN DER MEULEN, R.; VRANCKEN, G.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; VAN HUMMELEN, P.; DE VUYST, L. Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 618-626. 2011.

WOOD, B. J. B. **Microbiology of Fermented Foods**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 440p.

ZHANG, C.; BRANDT, M. J.; SCHWAB, C.; GANZLE, M. G. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. **Food microbiology**, v. 27, p. 390-395, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma da hidratação do Fermento Natural Liofilizado



Os pães foram fabricados na Planta piloto de Panificação da Universidade de Passo Fundo com a autorização e apoio do Prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski e de toda a sua equipe.

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa sobre **Produção de fermento natural liofilizado usando trealose como agente crioprotetor e aplicação em pão de forma integral**, de responsabilidade da aluna de pós-graduação (bolsista) Raquel Facco Stefanello, orientada pela Prof.^a Dr.^a Leadir Lucy Martins Fries. Esta pesquisa justifica-se devido a estudos comprovarem que a fermentação natural possui características similares e até melhores em relação a sabor e aroma quando comparada com pães elaborados com fermento comercial. Neste contexto esta pesquisa objetivou estudar as comparações entre o fermento natural e o fermento comercial, avaliando aceitabilidade do consumidor ao produto desenvolvido bem como parâmetros sensoriais do pão de forma.

Os possíveis riscos aos participantes poderão ser de resposta alérgica e desconforto gástrico, em função de algum ingrediente das formulações. Para minimizar tais riscos, serão excluídos da pesquisa sujeitos alérgicos ou sensíveis a qualquer componente das amostras, como por exemplo, pessoas portadoras de doença celíaca. Serão preservados os direitos dos provadores de se recusarem a participar da pesquisa, sem nenhum prejuízo aos mesmos, e a adesão de provadores ocorrerá livremente, através da assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não havendo qualquer tipo de despesa.

Os participantes não receberão benefícios diretos pela participação na pesquisa, mas irão beneficiar a comunidade científica, as indústrias de alimentos e a sociedade em geral, ao ajudarem a construir o conhecimento dos parâmetros sensoriais e de aceitação dos produtos testados. Os dados obtidos com esta pesquisa serão utilizados na elaboração de uma dissertação de mestrado e também em publicações em periódicos reconhecidos, sendo garantida a confidencialidade dos dados que possam identificar os participantes.

Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relacionada à pesquisa e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo. Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento.

Caso você tenha dúvidas sobre o comportamento dos pesquisadores ou sobre as mudanças ocorridas na pesquisa que não constam no TCLE, e caso se considera prejudicado na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável Raquel Facco Stefanello, (55) 9941-0026; Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, (55) 3220-8254 ou também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, pelo telefone (55) 3220-9362 ou pelo e-mail comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br, situado no 2º andar do Prédio da Reitoria, cidade universitária, bairro Camobi na cidade de Santa Maria, RS. Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o pesquisador.

Santa Maria, ____ de _____ de 2013.

Nome participante: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: Raquel Facco Stefanello

Assinatura: _____

Apêndice C – Ficha de avaliação sensorial apresentada para o painel treinado



FICHA DE AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

DATA: __/__/__		Nome: _____				
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PÃES		AMOSTRA				
I. Características Externas		Pontuação Máxima	1	2	3	4
1. Volume (volume específico x 3,33)		20				
2. Cor da crosta (Fatores indesejáveis: não uniforme, opaco, muito escura)		10				
3. Quebra (Fatores indesejáveis: muito pequena, áspera, desigual)		5				
4. Simetria (Fatores indesejáveis: laterais, pontas e parte superior desiguais)		5				
Subtotal		40				
II. Características Internas						
1. Característica da crosta (Fatores indesejáveis: borrachenta, quebradiça, dura, muito grossa, muito fina)		5				
2. Cor do miolo (Fatores indesejáveis: cinza, opaca, desigual, escura)		10	10	10	10	10
3. Estrutura da Célula do Miolo (Fatores indesejáveis: falta de uniformidade, buracos muito abertos ou fechados)		10	10	10	10	10
4. Textura do miolo (Fatores indesejáveis: falta de uniformidade, áspera, compacta, seca)		10				
Subtotal		35				
III. Aroma e Gosto						
1. Aroma (Fatores indesejáveis: falta de aroma, aroma desagradável, estranho, muito fraco ou forte)		10				
2. Gosto (Fatores indesejáveis: ácido, estranho, goma, massa, gosto remanescente)		15				
Subtotal		25				
CONTAGEM TOTAL		100				

Metodologia proposta por El-Dash, 1978

OBSERVAÇÕES:

Apêndice D – Depoimento de empresa a respeito da aplicabilidade industrial do fermento natural liofilizado.



Nossa Missão:

" Produzir produtos integrais e naturais, sem impacto ambiental, com qualidade assegurada, que superem as expectativas dos clientes, investindo sempre em novas tecnologias, desenvolvendo competências dos colaboradores e praticando uma conduta ética. "

DEPOIMENTO

Ao acompanhar o Projeto "Produção de Fermento Natural e Aplicação em Pão Integral", da mestrandia Raquel Facco Stefanello, da Universidade Federal de Santa Maria, realizado no período 2012-2013, e apresentado à empresa Farinhas Integrais Cisbra Ltda., de Panambi-RS, em 16/12/2013, verificamos que:

- O fermento natural liofilizado produzido no decorrer do projeto, poderá ter aplicações na indústria de panificação, em especial na voltada para os pães integrais. O público alvo deste tipo de pães preocupa-se mais com a questão do uso de produtos naturais em sua alimentação, com a qualidade dos alimentos, podendo então valorizar essa aplicação do fermento natural, mesmo que com este processo torne um pouco mais demorada a fase de crescimento dos produtos, porém o ideal seria não onerar o preço final do produto.
- O fermento natural liofilizado, além de conferir sabor mais agradável aos pães, aumenta consideravelmente seu shelf life, agindo também como um conservante natural. Isso o torna, sob o ponto de vista industrial, de grande aplicabilidade na indústria de panificação, constituindo-se em uma idéia a ser implantada nesse meio.

Panambi, 16 de dezembro de 2013.

Farinhas Integrais Cisbra Ltda.

 Clovis Thomas - Diretor Presidente

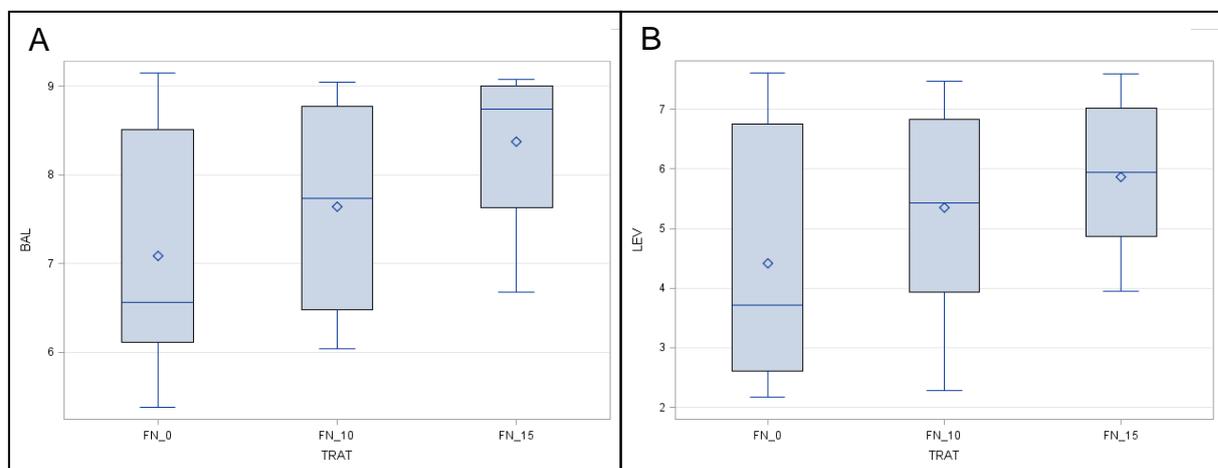


Apêndice E – Valores de pH, acidez total titulável e contagens de bactérias ácido láticas e de bolores e leveduras durante a fabricação do fermento natural a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral.

Dias de fabricação	pH	ATT g. % de ácido lático	BAL log UFC·g ⁻¹	BL log UFC·g ⁻¹
	1	5,91 ^a (± 0,13)	0,274 ^d ± 0,03	3,11 ^c ± 0,24
4	3,74 ^b ± 0,11	0,866 ^c ± 0,10	8,58 ^b ± 0,41	6,54 ^b ± 0,44
6	3,58 ^c ± 0,14	1,250 ^a ± 0,13	.	.
8	3,63 ^{bc} ± 0,09	1,178 ^{ab} ± 0,09	8,69 ^{ab} ± 0,13	7,27 ^a ± 0,19
10	3,58 ^c ± 0,08	1,139 ^b ± 0,04	.	.
14	3,64 ^{bc} ± 0,14	1,233 ^a ± 0,06	9,02 ^a ± 0,10	7,44 ^a ± 0,31

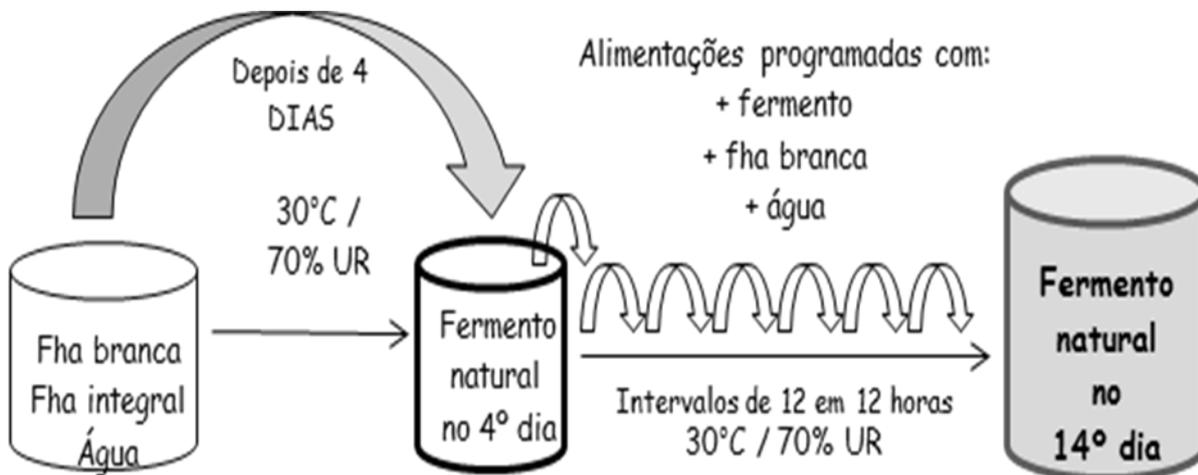
^{a,....,d} Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey na coluna. ATT: acidez total titulável. BAL: bactérias ácido láticas. BL: bolores e leveduras.

Apêndice F – Contagens de bactérias ácido láticas (A) e bolores e leveduras (B) em fermentos naturais liofilizados (F_i) tratados com três concentrações de trealose.

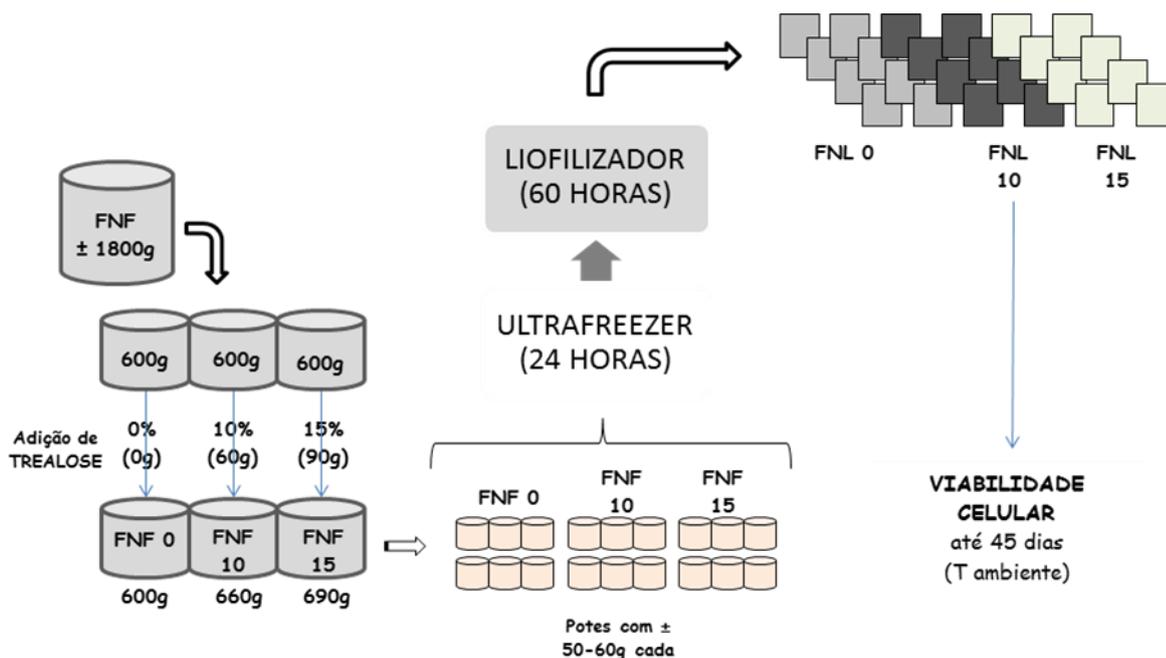


Barras indicando as médias gerais (expressas em log UFC.g⁻¹) e seus respectivos desvios padrão. BAL: bactérias ácido láticas. LEV: bolores e leveduras. FN_0: fermento natural liofilizado sem trealose. FN_10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose. FN_15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

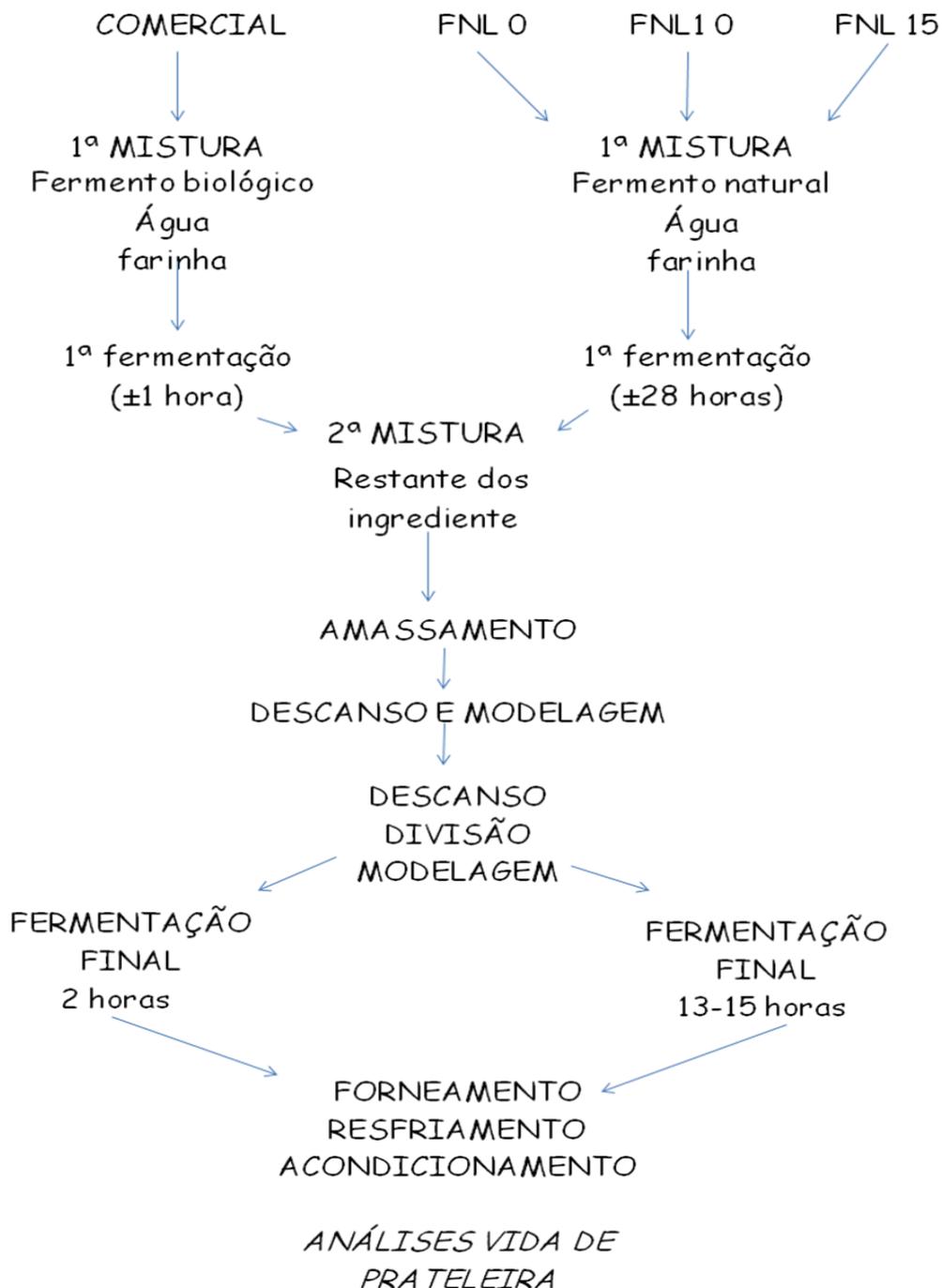
Apêndice G – Esquema de fabricação do fermento natural a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral pelo tempo de 14 dias. FHA: farinha.



Apêndice H – Etapas para a liofilização do fermento natural com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) obtido a partir de farinha de trigo branca e farinha de trigo integral após 14 dias de produção.



Apêndice I – Etapas de preparação dos pães tipo *sourdough* utilizando fermento natural liofilizado com diferentes concentrações de trealose (0, 10 e 15%) e pães com fermento comercial.



Apêndice J – Resultados das análises de pH, acidez total titulável, contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras dos pães fabricados com fermento comercial e com fermento natural liofilizado em diferentes concentrações de trealose durante os 24 dias de armazenamento.

	pH						
	0	4	8	12	16	20	24
FC	5,40 ± (0,11) ^a	5,77 ± (0,29) ^a	5,40 ± (0,06) ^a	5,27 ± (0,007) ^a	5,42 ± (0,10) ^a	5,38 ± (0,02) ^a	5,13 ± (0,03) ^a
FNL 0	3,64 ± (0,09) ^b	3,80 ± (0,10) ^b	3,75 ± (0,14) ^b	3,68 ± (0,17) ^b	3,68 ± (0,12) ^b	3,78 ± (0,14) ^b	3,79 ± (0,06) ^b
FNL 10	3,73 ± (0,13) ^b	3,80 ± (0,12) ^b	3,76 ± (0,16) ^b	3,81 ± (0,12) ^b	3,77 ± (0,17) ^b	3,84 ± (0,12) ^b	3,70 ± (0,04) ^c
FNL 15	3,79 ± (0,08) ^b	3,79 ± (0,07) ^b	3,75 ± (0,10) ^b	3,80 ± (0,09) ^b	3,78 ± (0,16) ^b	3,81 ± (0,05) ^b	3,74 ± (0,02) ^{bc}
Acidez total titulavel (g.% ácido Lático)							
	0	4	8	12	16	20	24
FC	0,32 ± (0,01) ^b	0,38 ± (0,04) ^b	0,36 ± (0,01) ^c	0,35 ± (0,02) ^d	0,32 ± (0,02) ^c	0,35 ± (0,04) ^c	0,43 ± (0,12) ^b
FNL 0	1,44 ± (0,08) ^a	1,38 ± (0,04) ^a	1,43 ± (0,08) ^a	1,37 ± (0,05) ^a	1,30 ± (0,05) ^{ab}	1,36 ± (0,06) ^a	1,35 ± (0,05) ^a
FNL 10	1,43 ± (0,07) ^a	1,35 ± (0,06) ^a	1,35 ± (0,04) ^b	1,31 ± (0,04) ^b	1,46 ± (0,19) ^a	1,27 ± (0,04) ^b	1,27 ± (0,06) ^a
FNL 15	1,36 ± (0,09) ^a	1,30 ± (0,08) ^a	1,29 ± (0,02) ^b	1,22 ± (0,03) ^c	1,28 ± (0,08) ^b	1,22 ± (0,04) ^b	1,23 ± (0,05) ^a
Microrganismos aeróbios mesofilos (log UFC• g⁻¹)							
	0	4	8	12	16	20	24
FC	0,41 ± (0,66) ^a	2,11 ± (1,98) ^a	4,46 ± (0,25) ^a	4,66 ± (0,36) ^a	5,72 ± (0,88) ^a	3,32 ± (3,63) ^a	5,78 ± (1,44) ^a
FNL 0	0,00 ± (0,00) ^a	0,38 ± (0,60) ^a	0,43 ± (0,70) ^b	0,38 ± (0,94) ^b	0,00 ± (0,00) ^b	0,00 ± (0,00) ^b	1,03 ± (1,16) ^b
FNL 10	0,00 ± (0,00) ^a	0,67 ± (1,03) ^a	0,60 ± (0,69) ^b	0,17 ± (0,41) ^b	0,34 ± (0,94) ^b	0,99 ± (1,23) ^{ab}	1,66 ± (1,82) ^b
FNL 15	0,27 ± (0,65) ^a	0,22 ± (0,53) ^a	1,22 ± (0,98) ^b	0,00 ± (0,00) ^b	0,00 ± (0,00) ^b	0,50 ± (0,84) ^{ab}	0,92 ± (1,03) ^b
Bolores e leveduras (log UFC• g⁻¹)							
	0	4	8	12	16	20	24
FC	0,00 ± (0,00) ^a	1,73 ± (1,90) ^a	4,58 ± (0,20) ^a	2,85 ± (2,50) ^a	4,08 ± (3,54) ^a	3,67 ± (4,02) ^a	6,19 ± (1,64) ^a
FNL 0	1,00 ± (1,67) ^a	1,01 ± (1,69) ^a	2,05 ± (0,12) ^b	0,50 ± (1,22) ^a	0,00 ± (0,00) ^b	0,85 ± (1,36) ^a	1,13 ± (1,25) ^b
FNL 10	1,47 ± (1,74) ^a	0,83 ± (1,33) ^a	2,01 ± (1,75) ^b	1,22 ± (1,42) ^a	1,27 ± (1,45) ^{ab}	0,72 ± (1,11) ^a	1,76 ± (1,93) ^b
FNL 15	1,50 ± (1,76) ^a	0,72 ± (1,11) ^a	2,10 ± (1,24) ^b	0,55 ± (1,35) ^a	0,83 ± (1,33) ^{ab}	0,45 ± (1,10) ^a	1,89 ± (2,15) ^b

a,....,d Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey dentro da mesma coluna. FC: fermento comercial. FNL 0: fermento natural liofilizado sem trealose. FNL 10: fermento natural liofilizado com 10% de trealose. FNL 15: fermento natural liofilizado com 15% de trealose.

Apêndice K – Laudo de análise.



Extrato de Malte
Aromas
Ingredientes para Indústria Alimentícia
Enzimas

PRODUTO: 64-410-BSWC "Extrato de Malte Seco - UNIMALT-WC"

LOTE - L.A.Q. N.º.15826501 - FABRICAÇÃO : 31/10/2012 - VALIDADE: 31/10/2013

LAUDO DE ANÁLISE

ORGANOLÉPTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS		
Características	Unidade	Resultados
Aspecto	---	De acordo
Cor	---	De acordo
Odor / Sabor	---	De acordo
Umidade a 105 °C	%	0,60
pH (sol. 10% a 20°C)	---	5,45
Acidez	(ml NaOH - 1N/100g)	19,97
Proteínas *	%	4,77
Lípidos *	%	0,15
Açúcares redutores como maltose *	%	75,29
MICROBIOLÓGICAS *		
Características	Unidade	Resultados
Coliformes a 45 °C	nmp/g	< 1,0 x 10 ¹
Salmonella sp	uic/25 g	Ausente
Mofos / leveduras	ufc/g	< 1,0 x 10 ¹
Estaf. Coag. Positiva	ufc/g	< 1,0 x 10 ¹

*Estes ensaios são baseados nos resultados obtidos através da análise realizada em laboratório externo devidamente credenciado sob os laudos n.º 253647/2011-0 / 253645/2011-0 e 045/2011. Produto isento de registro conforme RE 23/2000 e RDC 27/2010. Contém Glúten.
Metodologia: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Vol. 1, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, Bacteriological Analytical Manual, da U.S. Food and Drug Administration (FDA/AOAC). Conforme RDC n.º 12 de 02-01-2001 e RDC n.º 175 de 08-07-2003.

EMBALAGEM: Saco contendo 25 quilos líquido.

CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E VALIDADE

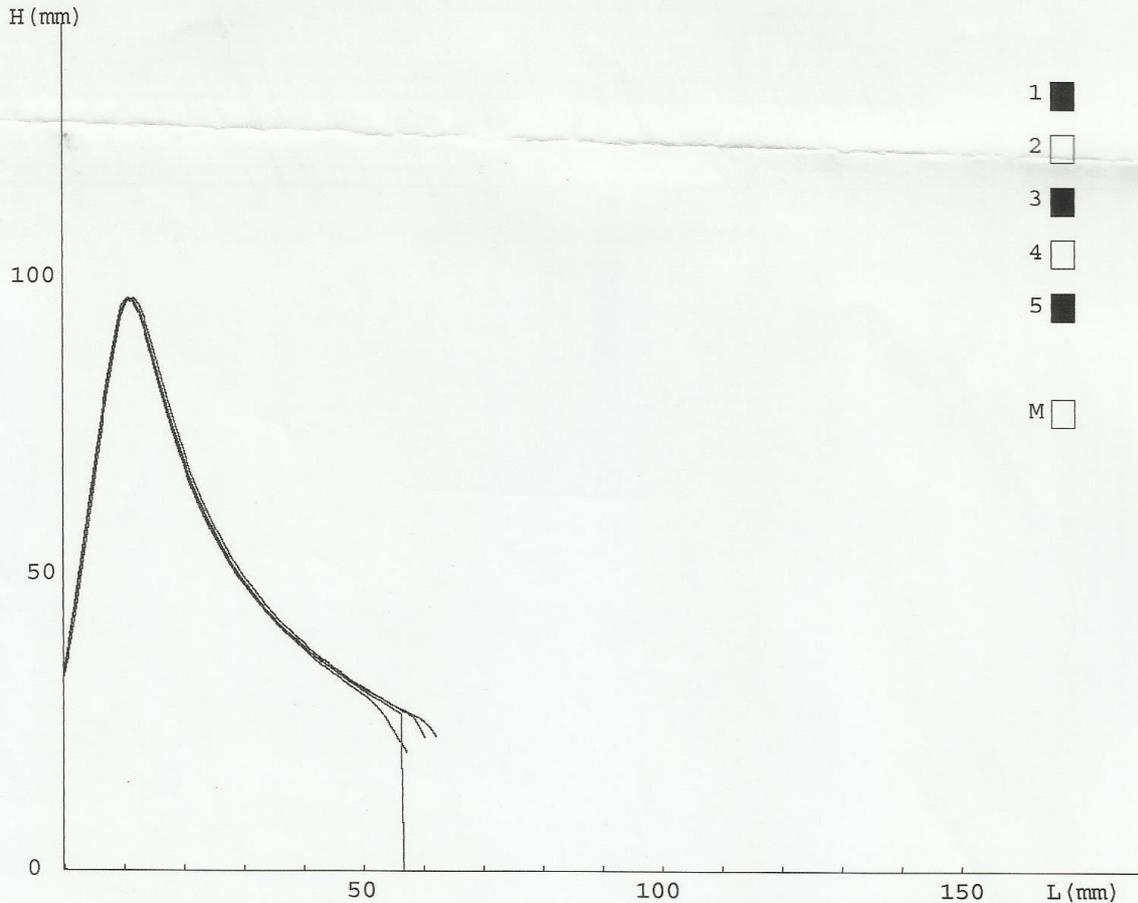
O Extrato de Malte manter-se-á inalterado, até a validade acima, desde que estocado em condições ideais: local com temperatura ambiente, isolado, seco e ao abrigo da luz solar. Depois da embalagem aberta, deve-se utilizar o produto o mais rápido possível. O produto não é inflamável.

Mylner Indústria e Comércio Ltda.

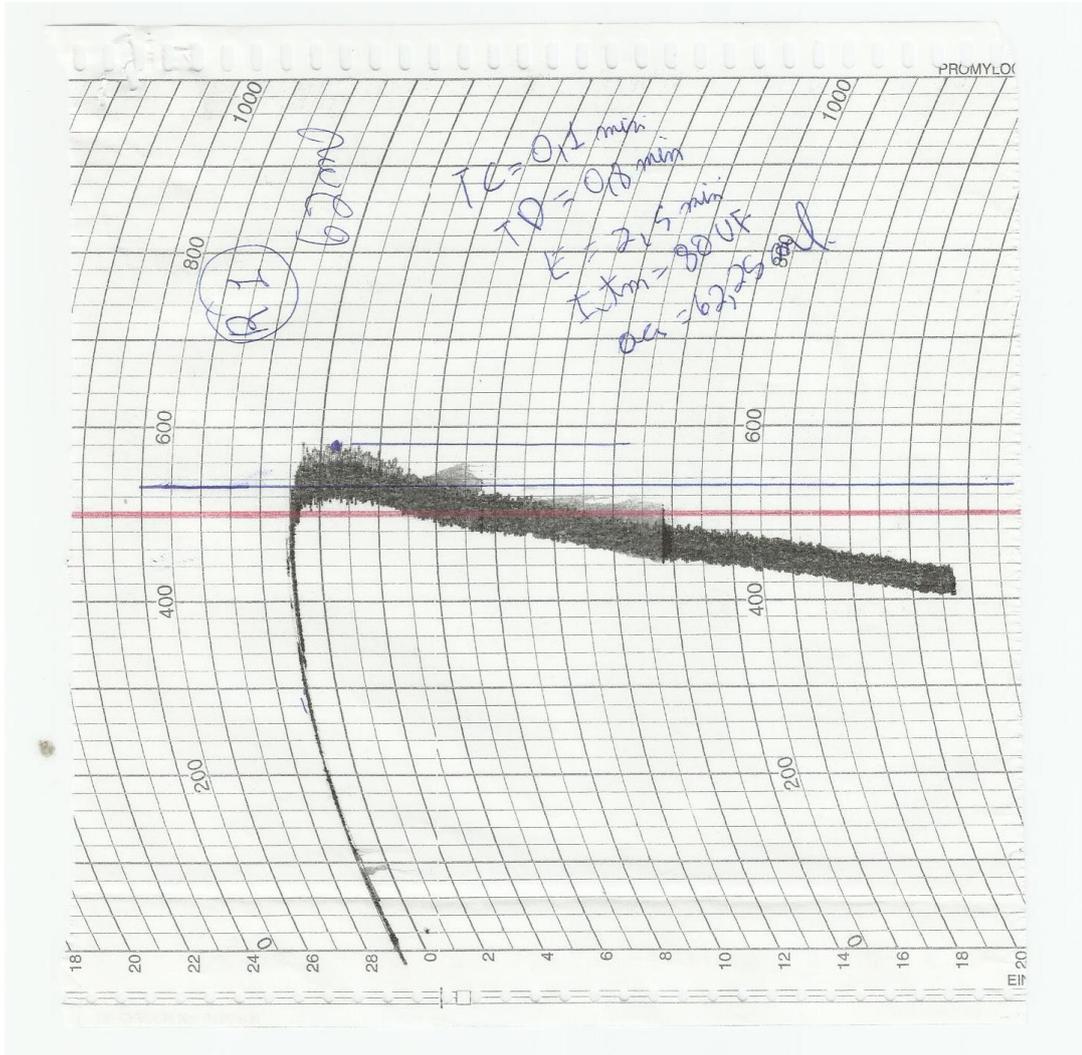
Escritório/Vendas: Alameda Subtenente Francisco Hierro, 202 - Pq. Novo Mundo - CEP: 02187-040 - S. Paulo - SP
Fone: (0xx11) 2177-0600 - Fax: (0xx11) 2177-0617/0623 - e-mail: mylner@mylner.com.br
Fábrica: Av. das Monções, 85 - Pq. Industrial Itaquí - CEP: 18540-000 - Porto Feliz - SP

Apêndice L – Laudo de análise (farinha integral).

 FARINHAS INTEGRAIS CISBRA LTDA Fone / Fax: (55) 3375-5008 • Panambi / RS		① HC	CHOPIN
Trigo Grão Fab.: 05/03/2013 - Lote:030105 Amostra 5 kg www.cisbra.com.br		Farinha CISBRA Farinha Integral	
DATA: 24/05/2013 HORA: 09:19		REFERENCIA AMOSTRA : R1 NOME DO FICHEIRO : 05240001A113	
PARAMETROS		RESULTADOS	
TEMP. LABO: 19.4 °C	HIGRO. LABO.: 64.9 %	P = 106 mmH2O	
FARINHA :	MOINHO :	L = 57 mm	
HUMIDADE : 0.00 %		G = 16.8	
PROTEINAS:	IND. QUEDA:	W = 199 10E-4J	
AMIDO DAN:	ABSORÇÃO :	P/L = 1.86	
ZELENY :		Ie = 39.9 %	
CINZAS :	EXTRAÇÃO :	W(40) = 164 10E-4J	
GLUTEN :			
COMENTARIOS GU: 26,50% FN: 267 GS: 8,36%		V:d2.8C +5.9	



Apêndice M – Laudo de análise (farinha integral).

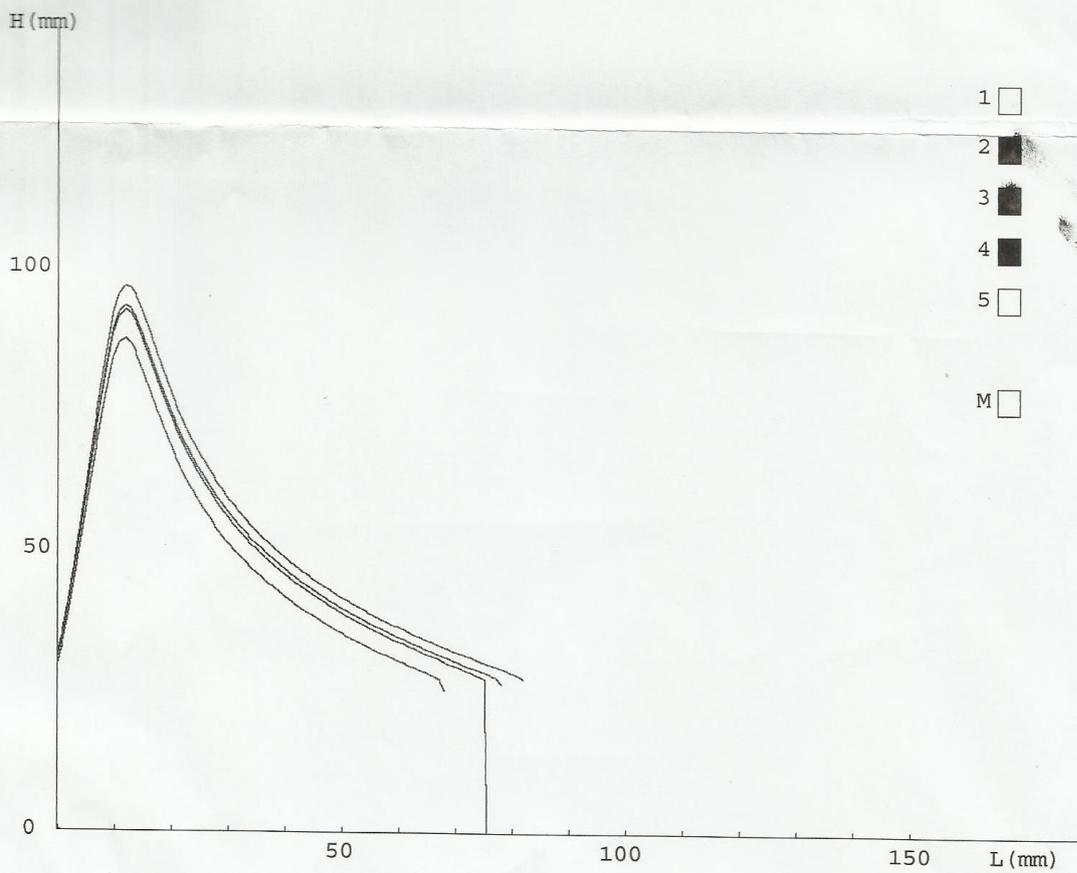


Apêndice N – Laudo de análise (farinha branca).

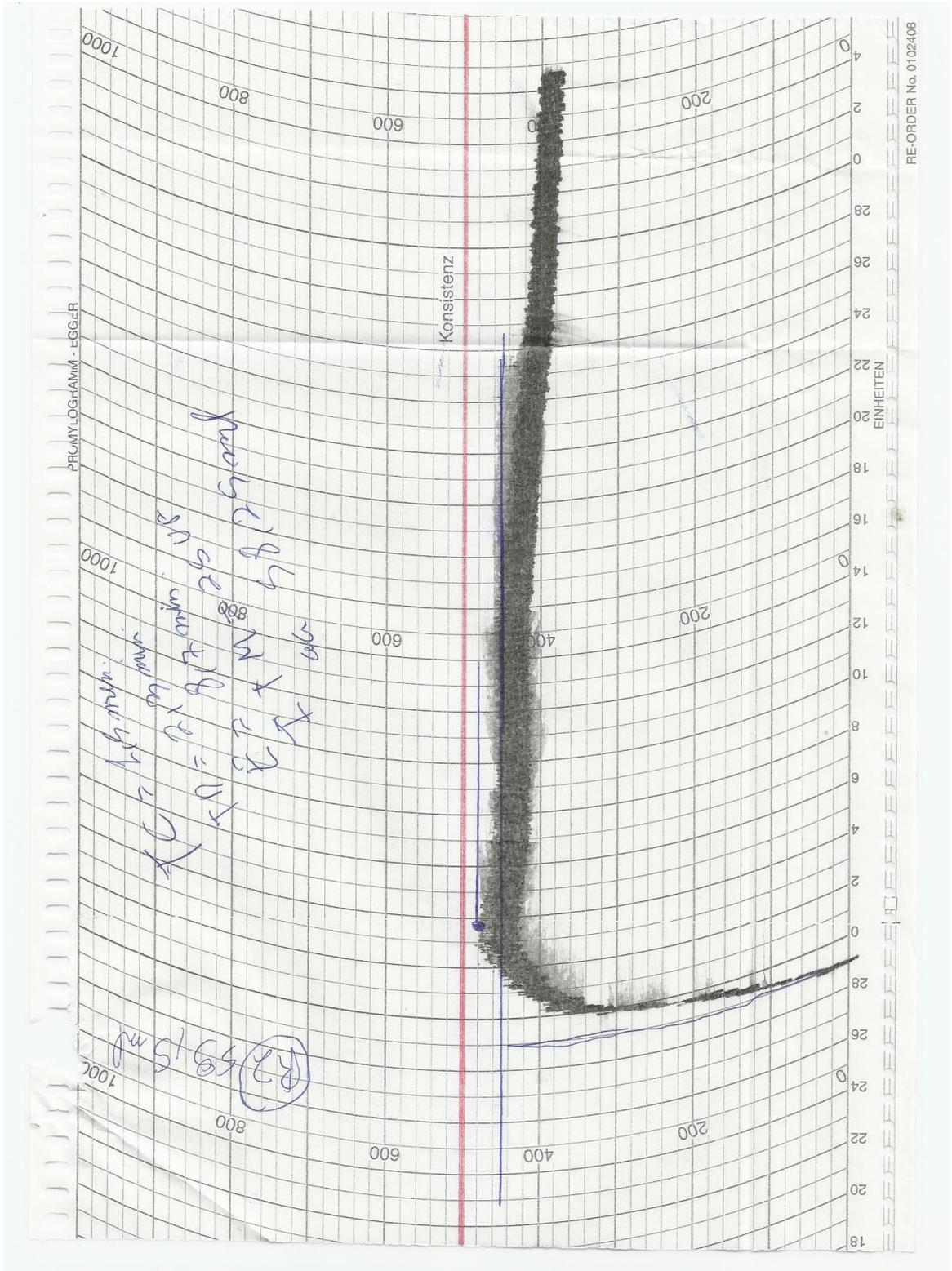
②

ALVEOLINK NG ALVEO HC CHOPIN

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO CENTRO DE PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO LABORATORIO DE CEREAIS TEL 54 3316 8457	Moinho Jpuanga (farinha branca)																												
DATA: 24/05/2013 HORA: 09:33	REFERENCIA AMOSTRA : NOME DO FICHEIRO : 05240002A113																												
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">PARAMETROS</th> <th style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">RESULTADOS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">TEMP. LABO:</td> <td style="padding: 2px;">P = 102 mmH₂O</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">FARINHA :</td> <td style="padding: 2px;">L = 76 mm</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">HUMIDADE : 0.00 %</td> <td style="padding: 2px;">G = 19.4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">PROTEINAS:</td> <td style="padding: 2px;">W = 251 10E-4J</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">AMIDO DAN:</td> <td style="padding: 2px;">P/L = 1.34</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">ZELENY :</td> <td style="padding: 2px;">Ie = 49.6 %</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">CINZAS :</td> <td style="padding: 2px;">W(40) = 168 10E-4J</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">GLUTEN :</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">HIGRO. LABO.:</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">MOINHO :</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">IND. QUEDA:</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">ABSORÇÃO :</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">EXTRAÇÃO :</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	PARAMETROS	RESULTADOS	TEMP. LABO:	P = 102 mmH ₂ O	FARINHA :	L = 76 mm	HUMIDADE : 0.00 %	G = 19.4	PROTEINAS:	W = 251 10E-4J	AMIDO DAN:	P/L = 1.34	ZELENY :	Ie = 49.6 %	CINZAS :	W(40) = 168 10E-4J	GLUTEN :		HIGRO. LABO.:		MOINHO :		IND. QUEDA:		ABSORÇÃO :		EXTRAÇÃO :		
PARAMETROS	RESULTADOS																												
TEMP. LABO:	P = 102 mmH ₂ O																												
FARINHA :	L = 76 mm																												
HUMIDADE : 0.00 %	G = 19.4																												
PROTEINAS:	W = 251 10E-4J																												
AMIDO DAN:	P/L = 1.34																												
ZELENY :	Ie = 49.6 %																												
CINZAS :	W(40) = 168 10E-4J																												
GLUTEN :																													
HIGRO. LABO.:																													
MOINHO :																													
IND. QUEDA:																													
ABSORÇÃO :																													
EXTRAÇÃO :																													
COMENTARIOS GU: 2779% FU: 280 GS: 9,21%																													
V:d2.8C +5.9																													



Apêndice O – Laudo de análise (farinha branca).



ANEXOS

Anexo A – Normas para formatação e submissão à revista científica Brazilian Journal of Microbiology



ISSN 1517-8382 versão impressa
ISSN 1678-4405 versão online

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo da revista](#)
- [Submissão de um artigo](#)
- [Publicação do artigo](#)
- [Preparo do artigo](#)

Escopo da revista

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Notas Prévias:** são textos concisos, relativos a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. A lista de fornecedores destes serviços de edição pode ser encontrada **abaixo**. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. Por favor, anexar o certificado de Inglês, fornecido pelo serviço de edição, no processo de submissão do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

SEÇÕES

Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.

- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Microbiologia Industrial: Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

Microbiologia de Alimentos: Tecnologia de Alimentos

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Microbiologia de Alimentos: Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

Microbiologia Médica: Patogênese Bacteriana

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Microbiologia Médica: Bacteriologia Clínica

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Microbiologia Médica: Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

Microbiologia Médica: Micologia Clínica

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Microbiologia Ambiental: Ecologia Microbiana

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Microbiologia Ambiental: Biotecnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnostico de patógenos de animais
- Patógenos veterinarios ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos

- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Notas prévias devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método

publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

- a. **Artigos** **de** **Periódicos**
Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. Braz J Microbiol37:101-107.
- b. **Artigos** **ou** **Capítulos** **de** **Livro**
Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.
- c. **Livros**
Montville TJ, Matthews KR (2005) Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.
- d. **Patentes**
Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.
- e. **Teses** **e** **Dissertações**
Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).
- f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**
Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro

de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

- g. **Publicações** **na** **Web**
 Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>
- h. **Webpage**
 U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Anexo B – Normas para formatação e submissão à revista científica Food Microbiology



TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0740-0020

DESCRIPTION

Food Microbiology publishes original research articles, short communications, review papers, letters, news items and book reviews dealing with all aspects of the **microbiology of foods**. The **editors** aim to publish manuscripts of the highest quality which are both relevant and applicable to the broad field covered by the journal. Studies must be novel, have a clear connection to **food microbiology**, and be of general interest to the international community of food microbiologists. The editors make every effort to ensure rapid and fair reviews, resulting in timely publication of accepted manuscripts.

Papers relating to the following topics will be considered:

- Physiology, genetics, biochemistry, and behavior of **microorganisms** that are either used to make foods or that represent safety or quality problems
- **Effects of preservatives, processes, and packaging systems** on the microbiology of foods
- Methods for detection, identification and enumeration of foodborne microorganisms or **microbial toxins**
- Microbiology of **food fermentations**
- **Predictive microbiology**
- **Microbial ecology** of foods
- Microbiological aspects of **food safety**
- Microbiological aspects of food **spoilage** and **quality**

Database coverage includes Biological Abstracts (BIOSIS); Chemical Abstracts; Current Contents/ Agriculture, Biology, and Environmental Science; Dairy Science Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Maize Abstracts; and Research Alerts.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

IMPACT FACTOR

2012: 3.407 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor

M.L. Tortorello, Food and Drug Administration (FDA), Summit-Argo, IL, USA

Contributing Editors

F. Carlin, INRA Centre d'Avignon, Avignon, France

P. Delaquis, Pacific Agri-Food Research Centre, Summerland, BC, Canada

G. Duffy, Teagasc, Dublin, Ireland

M.G. Kontominas, University of Ioannina, Ioannina, Greece

A. Lonvaud, Faculte Oenologie, Talence, France

Editorial Board Members

M. Abadias, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Catalonia, Spain

K. Allen, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

L. Almela, Universitat de Lleida, Murcia, Spain

G. Amagliani, Università degli Studi di Urbino, Urbino, Italy

A.S. Angelidis, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

J-C. Augustin, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France

E. Bartowsky, The Australian Wine Institute, Adelaide, SA, Australia

L.R. Beuchat, University of Georgia, Griffin, GA, USA

B. Brehm-Stecher, Iowa State University, Ames, IA, USA

A.I. Briones Perez, Universidad de Castilla La Mancha, Ciudad Real, Spain

J. Brooks, Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand

A.J.P. Brown, University of Aberdeen, Foresterhill, UK

S. Brul, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Netherlands

L. Bunkova, Tomas Bata University in Zlin, Zlin, Czech Republic

M-W. Byun, Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI), Jeollabuk-do, South Korea

J. Carballo, Universidad de Vigo, Ourense, Spain

C.P. Champagne, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Saint-Hyacinthe, QC, Canada

M-J. Chen, National Taiwan University, Taiwan, Republic of China

C-C. Chou, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

M. Ciani, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

E. Coton, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

D. D'Souza, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA

M. Danyluk, University of Florida, Lake Alfred, FL, USA

R. Di Cagno, Università di Bari, Bari, Italy

E.H. Drosinos, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

D. Ercolini, University of Naples Federico II, Naples, Italy

M.M Ferreira, Universidade de Lisboa (Lisbon), Lisbon, Portugal

M.I. Gil, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Murcia, Spain

G. Giraffa, National Agricultural Research Council, Lodi Lo, Italy

M. Gobetti, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy

M.E. Guerzoni, Università di Bologna, Bologna, Italy

A. Gálvez, University of Jaen, Jaen, Spain

M. Gänzle, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

P. Henschke, Australian Wine Research Institute, Adelaide, SA, Australia

C. Hertel, Frutarom Savroy Solutions GmbH, Korntal-Muenchingen, Germany

R.A. Holley, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

J.A. Hudson, Inst. of Environmental Science and Research Ltd. (ESR), Christchurch, New Zealand

C. Jo, Chungnam National University, Republic of Korea

K. Koutsoumanis, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

R. Linton, Purdue University, West Layayette, IN, USA

V. Loureiro, Universidade de Lisboa (Lisbon), Lisboa, Portugal

B. Mahmoud, Mississippi State University, Pascagoula, MS, USA

A. Martinez, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Burjassot, Valencia, Spain

O. Martín-Belloso, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

I. Masneuf-Pomarede, ISW-UMR 1219, Villenave d'Ornon cedex, France

D.A. McDowell, University of Ulster, Jordanstown, Ireland

J. Meng, University of Maryland, College Park, MD, USA

F. Nattress, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lacombe, AB, Canada
G-J. Nychas, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
E. Parente, Università della Basilicata, Potenza, Italy
E.C. Pereira De Martinis, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil
J. Rovira, Universidad de Burgos, Burgos, Spain
J. Samelis, National Agricultural Research Foundation, Ioannina, Greece
L. Saucier, Université Laval, Quebec, QC, Canada
D.W. Schaffner, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA
U. Schillinger, Max-Rubner-Institut; Federal Institute for Nutrition, Karlsruhe, Germany
R.F. Schwan, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil
G. Spano, University of Foggia, Foggia, Italy
G. Suzzi, Università di Teramo, Mosciano S. Angelo (TE), Italy
P.C. Teixeira, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal
S. Torriani, Università degli Studi di Verona, Verona, Italy
A-J. Trujillo Mesa, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain
M. Uyttendaele, Universiteit Gent, Gent, Belgium
M. Valero Roche, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain
F. Villani, University of Naples Federico II, Naples, Italy
V.C.H. Wu, University of Maine, Orono, ME, USA
C. Yost, University of Regina, Regina, SK, Canada
W. Zhang, Illinois Institute of Technology, Summit, IL, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of article

Original **research papers** for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short **research notes** describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short **reviews** on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the Editor before preparing a manuscript. **Book reviews** and **letters to the editor** are welcome.

Questions regarding content of a proposed submission may be sent to the Chief Editor:

M.L. Tortorello
US Food and Drug Administration
National Center for Food Safety and Technology
6502 S. Archer Road
Summit-Argo, IL 60501, USA
Fax: +1(708) 728 4177
E-mail: ml.t@cfsan.fda.gov

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Additional information

Nomenclature and Descriptions of Organisms

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Appropriate indications of replication and variability should be included.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files; you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. For more information please see <http://www.elsevier.com/phylogenetictrees>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>