



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO NATURAL SECO PARA PRODUÇÃO DE
PANETONE

Michele Carolina Bianchini
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

Prof. Dr. Ahmed El-Dash
ORIENTADOR

Campinas – São Paulo
2004



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO NATURAL SECO PARA PRODUÇÃO DE
PANETONE

Michele Carolina Bianchini
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

Prof. Dr. Ahmed El-Dash
ORIENTADOR

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos – Área de Tecnologia de Alimentos

Campinas – São Paulo
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A – UNICAMP

Bianchini, Michele Carolina

Desenvolvimento de fermento natural seco para produção de panetone / Michele Carolina Bianchini. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Ahmed El-Dash

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Panificação. 2. Fermentação. 3. Secagem. 4. Massas Alimentícias. I. El-Dash, Ahmed Athia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ahmed El-Dash
Universidade Estadual de Campinas
Orientador

Profa. Dra. Fernanda Collares
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Dr. Alfredo Vitali
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Universidade Estadual de Campinas
Membro

DEDICATÓRIA

Ao meu querido marido Daniel e meus
Pais pelo apoio essencial que tive.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Ahmed El-Dash, pela orientação, visão prática e experiência científica que direcionou o desenvolvimento desta pesquisa;
- À Emulzint que proporcionou as condições para o desenvolvimento do trabalho da pesquisa através do seu apoio, incentivo, investimento e acompanhamento.
- Aos amigos da Emulzint:
 - Kenzi - pela amizade, apoio, orientação técnica e ajuda nas horas difíceis.
 - Vanessinha - pela determinação, companheirismo e ajuda nos testes práticos.
 - Augusto e Isabela - que acompanharam e aguentaram minhas choradeiras sempre com muita paciência.
 - Edemilson –pela produção de todos os panetones da pesquisa e pelo envolvimento e preocupação no trabalho.;
 - Provadores (Kenzi, Augusto, Vanessinha, Vanessa, Vanina e Isabela) – pela boa vontade e disposição durante a análise dos panetones;
- Ao Ital, pelo acolhimento, ajuda e uso de equipamentos durante a pesquisa. Em especial ao Dr. Alfredo Vitali e Homero Gumerato que me apoiaram sempre que precisei;
- À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, do Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA, pela amizade e o auxílio na parte estatística;
- Ao Prof. Dr. Carlos R. Grosso, pela atenção e colaboração na etapa de secagem;
- Ao meu marido Daniel, que com muito amor e paciência segurou as pontas durante meus estresses;
- Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim.
- Aos amigos que me proporcionaram bons momentos de desestresse: Julita e Magnus;
- A todos que fizeram parte da minha vida durante esta etapa e compartilharam de alguma maneira deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 O FERMENTO NATURAL.....	2
2.1.1. Histórico.....	2
2.1.2. A composição do fermento natural	3
2.1.3. A Bioquímica da fermentação.....	6
2.1.4 Influência da Farinha.....	11
2.1.5. Influência da temperatura.....	13
2.1.6 Influência da composição.....	14
2.1.7. Interações entre as Bactérias Lácticas e as Leveduras	15
2.1.8. Influência das culturas utilizadas na produção de aroma e gosto	18
2.1.9. Atividade da microflora durante a fermentação da massa ácida.....	24
2.1.10. A estabilidade microbiológica	26
2.2 SECAGEM DE MICROORGANISMOS.....	29
2.2.1. Métodos de secagem de microorganismos.....	29
2.2.2. Efeitos da secagem nos microorganismos do fermento	31
2.2.3. Uso de agentes protetores em secagem de microorganismos	34
2.2.4. Reidratação dos microorganismos após secagem	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS	43
3.1.1. Farinha de Trigo.....	43
3.1.1.1. Análises da Farinha	43
3.1.2. Outros Ingredientes	43
3.2. EQUIPAMENTOS.....	45
3.3. REAGENTES	45
3.4 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO.....	46
3.5. DESENVOLVIMENTO DO FERMENTO NATURAL	47
3.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SECAGEM.....	47
3.6.1. Secagem em “Spray Drier”	47
3.6.2. Secagem em Secador de bandejas com ar forçado.....	47
3.7. EXPERIMENTOS DE SECAGEM DO FERMENTO NATURAL.....	47
3.7.1 Testes Iniciais.....	47
3.7.1.1 Spray Drier	47

3.7.1.2 Secador de bandejas com ar forçado.....	48
3.7.2. Otimização da secagem.....	48
3.7.3. Variáveis dependentes.....	50
3.7.3.1. Determinação do Tempo de Secagem.....	50
3.7.3.2. Determinação da Contagem de Células Viáveis das Bactérias Lácticas.....	50
3.7.3.3. Determinação da Contagem de Células Viáveis das Leveduras.....	51
3.8. APLICAÇÕES DO FERMENTO SECO	51
3.8.1. Reidratação do fermento seco.....	51
3.8.2. Definição do processo de produção de Panetone.....	51
3.8.3. Comparação da performance dos Panetones.....	52
3.8.3.1 Score Técnico.....	53
3.8.3.2 Análise da Maciez.....	53
3.8.3.3 Determinação do pH do miolo.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. DESENVOLVIMENTO DO FERMENTO NATURAL	55
4.2. EXPERIMENTOS DE SECAGEM DO FERMENTO NATURAL.....	55
4.2.1. Testes Iniciais.....	55
4.2.1.1. “Spray Drier”.....	55
4.2.1.2. Secador de ar forçado.....	56
4.2.2. Planejamento Experimental	59
4.2.2.1 Preparação das Amostras	59
4.2.2.2. Análise do Tempo de Secagem	60
4.2.2.3. Análise da Contagem de Células Viáveis de Bactérias Lácticas	67
4.2.2.4. Análise da Contagem de Células Viáveis de Leveduras	74
4.2.2.5. Testes Complementares.....	76
4.3. APLICAÇÕES DO FERMENTO SECO	78
4.3.1 Reidratação do Fermento Seco.....	78
4.3.2. Processo de fabricação de Panetone.....	81
4.3.2.1. Análise do Panetone.....	83
4.3.3. Score Técnico.....	85
4.3.4. Análise da Maciez.....	88
4.3.5. Determinação do pH do Miolo.....	91
5. CONCLUSÃO.....	92
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Gráfico de distribuição da composição do fermento natural (Corsetti <i>et al.</i> , 2001).	4
FIGURA 2 – Diagrama representativo da fermentação homofermentativa	7
FIGURA 3 – Diagrama representativo da fermentação heterofermentativa.....	8
FIGURA 4 – Etapas do Desenvolvimento da Tese.....	46
FIGURA 5 – Fluxograma do processo de fabricação do Panetone	52
FIGURA 6 – Gráfico da sobrevivência das Bactérias Lácticas durante o processo de secagem.	58
FIGURA 7 – Gráfico da sobrevivência das Leveduras durante o processo de secagem	59
FIGURA 8 – Tempo de Secagem observado (h) X Tempo Preditivo	63
FIGURA 9 – Efeito da Temperatura de Secagem e o Sorbitol no Tempo de Secagem do fermento	64
FIGURA 10 – Efeito da Temperatura de Secagem e a Sacarose no Tempo de Secagem do fermento ..	65
FIGURA 11 – Efeito do Sorbitol e da Sacarose no Tempo de Secagem do fermento	66
FIGURA 12 – Contagem de Bactérias Lácticas observadas (log) X Preditivas.....	70
FIGURA 13 – Efeito da Temperatura de Secagem e o Sorbitol na Contagem de Bactérias Lácticas....	71
FIGURA 15 – Efeito da Sacarose e do Sorbitol na Contagem de Bactérias Lácticas	73
FIGURA 16 – Contagem de Leveduras observadas (log) X Preditivas	76
FIGURA 17 – Crescimento das Bactérias Lácticas durante a reidratação do fermento seco	80
FIGURA 18 – Crescimento das Leveduras durante a reidratação do fermento seco	81
FIGURA 19 – Processo do produção do Panetone.....	82
FIGURA 20 – Processo com Fermento Natural Fresco X Processo Fermento Natural Seco	83
FIGURA 21 – Fotos dos panetones obtidos.....	88
FIGURA 22 – Análise da Maciez dos Panetones	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características do pão X Teor de cinzas	13
TABELA 2 – Concentrações mínimas e máximas encontradas em massas ácidas	20
TABELA 3 – Compostos antimicrobianos metabolizados por Bactérias Lácticas	28
TABELA 4 - Níveis das variáveis independentes do Planejamento Experimental	49
TABELA 5 – Variáveis do Planejamento Experimental 2 ³	49
TABELA 6- Delineamento Experimental.....	49
TABELA 7 – Score Técnico para análise de amostras de Panetone	53
TABELA 8. Parâmetros utilizados na medição	54
TABELA 9 – Resultado de umidade e análise microbiológica das amostras de fermento em pó.....	56
TABELA 10 – Sobrevivência dos microorganismos durante a secagem em secador de ar forçado	57
TABELA 11 – Resultados das Umidades e do Tempo de Secagem obtidas nos experimentos do planejamento.	60
TABELA 12 - Coeficientes de Regressão para Tempo de Secagem (TS).....	61
TABELA 13 - Coeficientes de Regressão ajustados para Tempo de Secagem (TS).....	61
TABELA 15 – Tempo de Secagem Real X Tempo de Secagem Preditivo	62
TABELA 16 – Resultados das Contagem de Bactérias Lácticas nos experimentos do planejamento. ...	67
TABELA 17 – Coeficientes de Regressão para Contagem de Bactérias Lácticas (CB)	68
TABELA 18 – Coeficientes de Regressão ajustados para Contagem de Bactérias Lácticas (CB)	68
TABELA 19 – Tabela ANOVA da Contagem de Bactérias Lácticas (CB)	69
TABELA 20 – Contagem de Bactérias Lácticas Real X Preditiva.....	69
TABELA 21 – Resultados das Contagem de Bactérias Lácticas nos experimentos do planejamento. ...	74
TABELA 22 – Coeficientes de Regressão para Contagem de Leveduras (CL)	75
TABELA 23 – Coeficientes de Regressão ajustados para Contagem de Leveduras (CL)	75
TABELA 24 – Formulação da preparação das amostras	77
TABELA 25 – Comparação da performance dos Testes Complementares X Teste 1	78
TABELA 26 – Composição do Fermento Líquido	79
TABELA 27 – Composição do Nutriente de Fermento.....	79
TABELA 28 – Proliferação dos microorganismos durante a reidratação	80
TABELA 29 - Volume e pH dos panetones obtidos.....	84
TABELA 30 - Características Externas dos Panetones	85
TABELA 31 - Características Internas dos Panetones I	86
TABELA 32 - Características Internas dos Panetones II.....	86
TABELA 33 - Aroma e Gosto dos Panetones	87
TABELA 34 – Contagem Total do Score dos panetones	87
TABELA 35 – Força Medida em texturômetro (g)	89
TABELA 36 - Medição do pH.....	91

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - DEFINIÇÕES UTILIZADAS NA DISSERTAÇÃO.....	104
ANEXO 2 – FORMULAÇÃO DO FERMENTO COM BATATA E IOGURTE	105
ANEXO 3 –FORMULAÇÃO DO FERMENTO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	106
ANEXO 4 – FORMULAÇÃO DO FERMENTO DE MAÇÃ E AÇÚCAR MASCADO	107
ANEXO 5 – ANEXO ANÁLISES DA FARINHA DE TRIGO	108
ANEXO 6 – PONTUAÇÃO DO SCORE TÉCNICO	108
ANEXO 7 – MEDIÇÕES DO TEXTURÔMETRO	109
ANEXO 8 – MEDIDAS DOS VOLUMES DOS PANETONES (cm ³ /g)	110

RESUMO

Um fermento natural desenvolvido para produção de panetone passou por uma secagem, visando obter um fermento natural em pó. Este trabalho investigou primeiramente os métodos de secagem viáveis para as leveduras e as bactérias lácticas presentes no fermento natural. Os métodos testados foram secagem em spray drier e secagem em estufa com ar forçado. O objetivo foi encontrar uma alternativa para a liofilização que é frequentemente usada em secagem de microorganismos. Após a seleção do método de secagem foram realizados 17 tratamentos referentes a um planejamento experimental 2^3 com três repetições no ponto central e seis pontos axiais. As variáveis independentes foram: temperatura de secagem (24, 32 e 40°C), porcentagem de sorbitol (2, 6 e 10%) e porcentagem de sacarose (1, 3 e 5%). As variáveis respostas foram: tempo de secagem, contagem de bactérias lácticas e contagem de leveduras. As melhores condições encontradas foram 24°C, 2% de sorbitol e 1% de sacarose. Durante as aplicações do fermento seco verificou-se que o antes e o pós da secagem têm uma influência muito grande na performance do fermento. A preparação do fermento para secagem – que inclui a extrusão do fermento em extrusora de macarrão e os métodos de reidratação do fermento seco foram testados e analisados. O melhor crescimento dos microorganismos foi obtido com uma reidratação com 1,5% de leite em pó e 0,23% de nutriente de fermento. Com a reidratação definida, realizou-se os testes para o acerto da receita e do processo de fabricação de panetone com fermento seco. O panetone com fermento seco foi comparado tecnicamente com o panetone feito com fermento natural. Os parâmetros avaliados foram: volume específico, cor da crosta, características da crosta, cor do miolo, estrutura do miolo, umidade do miolo, aroma, gosto, pH e maciez em texturômetro. Na pontuação geral não houve diferença significativa entre o padrão e o teste. Na análise do pH, o panetone com fermento natural seco apresentou diferença significativa em relação ao panetone padrão, porém os valores atingidos os normais para o padrão de panetone. A análise da maciez em texturômetro mostrou uma ligeira superioridade do panetone padrão nos primeiros 30 dias. Na análise com 40 a 80 dias de fabricação os panetones tiveram uma maciez similar. O estudo mostrou que é possível eliminar a etapa de manutenção do fermento natural com a sua secagem e que fermento natural seco obtido é capaz de produzir panetones com bons resultados.

ABSTRACT

It has been developed a sourdough to produce panetone and it was dried. This work investigated firstly the practicable drying methods for yeasts and acid lactic bacterias presents in the sourdough. Spray drier and hot air. The object was to find an alternative to the freeze drying method, wich is often used to microorganisms. After the selection of the best method, an experimental design 2^3 with 17 treatments was planned – with three central points and six axial points. Independent variables were: drying temperature (24, 32 and 40°C), sorbitol dosage (2, 6 and 10%) and saccharose dosage (1, 3 and 5%). Dependents variables were: drying time, acid lactic bacteria counting and yeast counting. The best conditions were 24°C, 2% of sorbitol and 1% of saccharose. During the dried sourdough applications was verified that before and after drying conditions had a big influence in the sourdough performance. The sourdough drying preparation – includes the sourdough extrusion and the sourdough rehidratation methods – were analysed. The best microorganism development was obtained with 1,5% of powder milk and 0,23% of sourdough nutrient. Defined the rehidratation, tests to ajust the recipe and process were done. The panettone done with the dried sourdough was technically compared with the normal panetone with fresh sourdough. The considered parameters were: specific volum, color crust, crust characteristics, color crumb, crumb struture, crumb moisture, flavour, taste, pH and softness. There was no significante diference at 5% in the total pontuation between standard and test. The tested panettonnes had significative diference compared with the standard in pH, although the obtained values were normal found in literature. In softness analysis the standard panettone had a little superiority in the first thirty days. In the analysis with 40 to 70 days after production all panettonnes had a similar softness. The study showed that it is possible to elimiate the sourdough maintenance step and to obtain panettonnes with good results.

1. INTRODUÇÃO

O fermento natural tem sido utilizado há mais de 5.000 anos. As técnicas de fabricação com fermento natural têm sido aprimoradas e melhoradas através dos anos, mas somente estudos a partir do século XVIII e, particularmente, no século XX formaram uma base de conhecimento sobre o assunto (Suwelack, 1999).

Atualmente as funções técnicas do fermento natural – liberação de gás carbônico e acidificação – foram substituídas pelo uso de fermentos biológicos e acidificantes químicos, entretanto, os pães obtidos não conseguem alcançar todas as características obtidas num pão feito com um processo longo de fermentação. Sabor e aroma são os elementos centrais no consumo de qualquer tipo de alimento. Um processo longo de fermentação é capaz de proporcionar pães de ótima qualidade sensorial (Suwelack, 1999).

Entretanto, o uso do fermento natural não é totalmente conveniente, ele consome um grande tempo no processo e requer uma manutenção diária que acarreta em gastos extras de mão-de-obra e matérias-primas durante o ano todo aumentando o custo de produção do produto final. Dentre outras desvantagens estão: a dificuldade em manter a qualidade e o equilíbrio entre os microorganismos presentes, a falta de padronização dos produtos finais e a complexidade do processo.

Os requerimentos necessários para manter um fermento natural acabam inviabilizando o seu uso. O desenvolvimento de um fermento natural seco padronizado pode evitar e eliminar a manutenção diária do fermento natural fresco. Conseguindo-se estabilizar o fermento através da sua secagem, isso o manterá ativo e sem alterações por mais tempo do que um fermento natural mantido refrigerado.

Portanto, o objetivo deste trabalho é:

- desenvolver um fermento natural seco que seja padronizado e capaz de eliminar a etapa de manutenção do fermento natural do processo de produção de panetones.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O FERMENTO NATURAL

2.1.1. Histórico

A fermentação natural de cereais é um dos processos bioquímicos mais antigos usado na produção de alimentos. A origem exata do fermento natural é desconhecida, mas acredita-se que essa importante técnica tem sido utilizada há mais de 3.000 anos. Pinturas mostram que essa técnica já era usada no Egito no século XII a.C. Achados de regiões do Mediterrâneo Oriental sugerem que por volta de 1800 a.C. os fermentos naturais já eram utilizados em pães (Suwelack, 1999).

Qualquer massa de farinha após um tempo prolongado começará a fermentar e mudar suas características. Entre os séculos I e VI d.C., o uso de fermento natural estendeu-se pela Alemanha, onde era usado principalmente por monges e corporações. As principais matérias-primas utilizadas eram: centeio e cevada. Nos séculos XV e XVI, a levedura da cerveja foi desenvolvida e misturada com massa ácida (Seibel e Brümmer, 1991).

Com o isolamento da levedura *Saccharomyces cerevisae* no início do século XIX, o produto comercial chamado de fermento biológico passou a substituir parte do uso da fermentação natural. A necessidade de rapidez nos processos de produção de pães propiciou a troca da fermentação natural pelo fermento biológico, que teve seu mercado expandido rapidamente (Suwelack, 1999).

O uso do fermento natural, por outro lado, proporciona ótima qualidade em sabor e conservação nos produtos finais obtidos. Por este motivo, essa técnica tem sido otimizada 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, formação de ácidos láctico e acético e aromas específicos (Suwelack, 1999).

2.1.2. A composição do fermento natural

Pesquisas sobre a microflora do fermento natural começaram na Alemanha com publicações a partir de 1900 sobre fermentos de centeio. O fermento natural de trigo é mais usado na França e Itália. Na Alemanha, estudos sistemáticos em fermento de trigo começaram em 1970 (Seibel e Brümmer, 1991).

Existem mais registros de pesquisa sobre a microflora do fermento natural de farinha de centeio do que a microflora do fermento natural de farinha de trigo.

Os fermentos naturais, em geral, contêm leveduras e bactérias lácticas numa proporção que pode variar de $1:10^3$ a $1:10$. Segundo Corsetti *et al.* (2001), entre 25 amostras de fermento coletadas de quatro províncias da região de Apulia, apenas duas tiveram uma proporção de 1:1. O número de bactérias lácticas variou de 10^7 a 10^9 ufc/g e nas leveduras 10^5 ufc/g (em fermentos naturais sem adição de fermento biológico) a 10^8 ufc/g (em fermentos naturais com adição de fermento biológico).

Segundo Spicher *et al.* (1980), diferenças na farinha de trigo, outros ingredientes e tecnologia de produção podem influenciar na composição microbiana do fermento natural e conseqüentemente, nas características dos produtos panificados. A proporção dos lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos pode afetar na qualidade final do pão. Os homofermentativos produzem uma acidificação suficiente para dar uma massa com elasticidade adequada. Mas por outro lado, contribuem menos que os heterofermentativos no desenvolvimento do sabor do pão (citado por Barber *et al.*, 1983).

Em vários trabalhos de identificação dos microorganismos presentes em fermentos naturais de farinha de trigo, pesquisadores encontraram composições muito próximas (figura 1): 30% das bactérias lácticas isoladas foram *Lactobacillus sanfranciscensis*, 20% foi *Lb. alimentarius*, 14% foi *Lb. brevis*, 12% foi *Leuconostoc citreum*, 7% foi *Lb. plantarum*, 6% foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4% foi *Lb. fermentum* e *Lb. acidophilus*, 2% foi *Weissella confusa* e 1% foi *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Corsetti *et al.*, 2001).

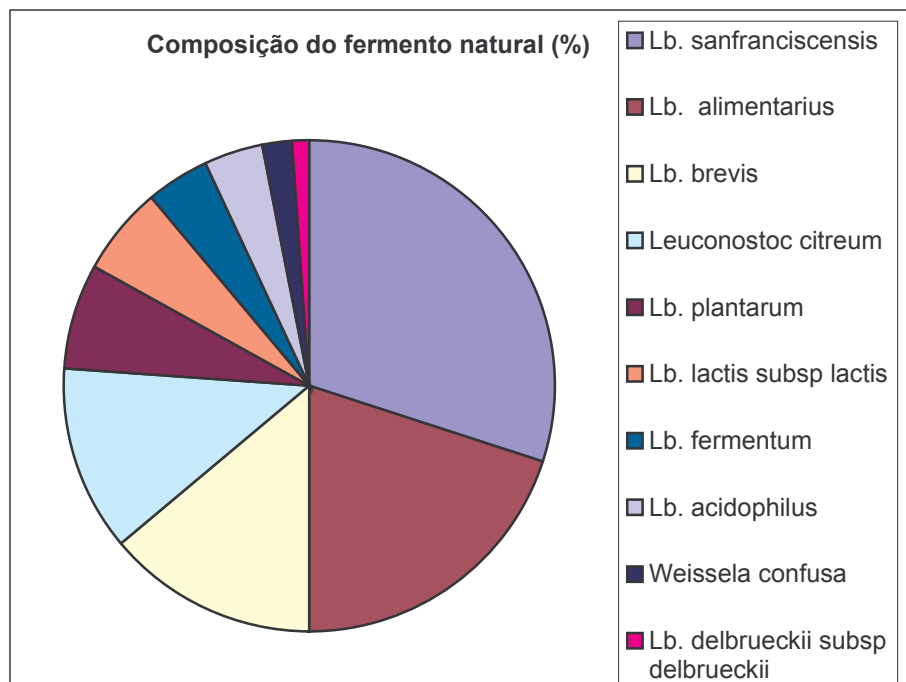


FIGURA 1. Gráfico de distribuição da composição do fermento natural (Corsetti *et al.*, 2001).

Lb. plantarum é um microorganismo homofermentativo e produz quase que exclusivamente ácido láctico. *L. brevis* e *L. fermentum* são heterofermentativos e produzem ácido láctico, ácido acético, alguns álcoois e gás carbônico (Lorenz, 1983).

Dos fermentos naturais encontrados na farinha de trigo e centeio, *Lb. sanfranciscensis* foi a bactéria láctica mais freqüentemente isolada (Corsetti *et al.*, 2001). Ele tem o nome da cidade onde foi isolado pela primeira vez numa massa ácida e é um lactobacilo heterofermentativo obrigatório. Ele foi isolado primeiramente por Kline e Sugihara (1971) e posteriormente revisado por Weiss e Schillinger (1984) para a inclusão na lista aprovada de nomes de bactérias (Gobbetti e Corsetti, 1997).

Os estudos de Sriranganathan *et al.* 1973 (citado por Gobbetti e Corsetti, 1997) mostraram que o crescimento do *Lb. sanfranciscensis* é bastante complicado: necessita extratos de levedura fresca, ácidos graxos insaturados (principalmente ácido oléico) e preferencialmente maltose ao invés de glucose. (Gobbetti *et al.*, 1994a). Onno e Roussel (1994) Vogel *et al.* (1994), Hammes e Vogel, 1995 (citado por Gobbetti e Corsetti, 1997) e Gobbetti *et al.* (1994c) identificaram cepas que fermentam sacarose, ribose, galactose, rafinose ou frutose. Este microorganismo é amplamente isolado em massas ácidas de centeio

e trigo de várias áreas de produção de pães e de fermentos naturais usados para fazer panetone. Devido à sua predominância, ele é considerado a chave das bactérias lácticas na biotecnologia de produtos fermentados de massa ácida (Gobetti e Corsetti, 1997).

A maioria das bactérias isoladas apenas fermentam glucose e maltose. Corsetti *et al.* (2001) detectaram o *Lb. plantarum* como a principal espécie heterofermentativa facultativa associada com *Lb. sanfranciscensis*; *Lb. plantarum* foi identificado apenas em fermentos naturais produzidos com farinha de trigo do tipo *Triticum aestivum*. Outra característica encontrada foi a abundante presença de *Lb. alimentarius*. Esta espécie heterofermentativa facultativa foi identificada em 9 dos 25 fermentos, 7 dos quais foi usada farinha de trigo *Triticum durum*. Destes 25 fermentos, 14 não continham associações de cepas hetero e homofermentativas. Estes fermentos apenas continham uma espécie ou uma associação complexa de várias espécies que pertencem a uma única classe metabólica (Corsetti *et al.*, 2001).

Neste mesmo trabalho, Corsetti *et al.* (2001) isolaram 19 leveduras; 17 das 19 correspondiam a *Saccharomyces cerevisiae*. As cepas de *S. cerevisiae* mostraram um perfil de identificação comum e se diferiram apenas na assimilação de fontes de carbono. As outras duas espécies identificadas foram *S. exiguus* e *Candida krusei*.

Numa massa de panetone italiano, Galli e Ottogalli (citado por Barber *et al.*, 1983) encontraram a levedura *S. exiguus* - que também é encontrada no pão São Francisco – e diversas espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. cellobiosus* e *L. plantarum*).

A levedura *S. cerevisiae* é largamente usada em produtos panificados fermentados, já a *S. exiguus* é comumente encontrada no fermento natural Sanfrancisco e em produtos panificados doces, como o panetone (Damiani *et al.*, 1996).

No trabalho de Barber *et al.* (1983), foram identificadas cinco tipos de leveduras em três diferentes massa ácidas de três fábricas de pão: *S. cerevisiae*, *S. fructurum*, *Pichia polymorpha*, *Hansenula subpelliculosa* e *Trichosporon margaritifera*. Porém, antes deste trabalho, com exceção da *S. cerevisiae*, não existiam dados na literatura da existência das outras quatro leveduras.

2.1.3. A Bioquímica da fermentação

A massa ácida (ou fermento natural) envolve um número considerável de diferentes metabólitos e reações de fermentações, as quais podem ser explicadas somente se forem estudadas individualmente (Seibel e Brümmer, 1991).

Segundo Spicher (1983) e Salovaara e Valjakka (1987), a dinâmica dos metabólitos básicos da massa ácida é influenciada por diferentes fatores, os quais são poucos conhecidos. As espécies, as cepas e as porcentagens de inóculo (tanto como a composição do meio de crescimento, presença e/ou falta de alguns constituintes e metabólitos), atividades de enzimas específicas, e variação de condições de processamento, promovem, inibem ou modulam o metabolismo dos microorganismos da massa (citado por Gobbetti *et al.*, 1995a).

Estudos mostram que no início da fermentação, a massa está com um pH aproximado de 6,5 a 6,0 e é dominado pelo desenvolvimento das leveduras que liberam gás carbônico, etanol e alguns aromas típicos de fermento biológico. Após 12 horas, o pH passa para 5,5; pois o gás carbônico liberado na massa gera uma solução saturada de ácido carbônico. Passando-se mais 12 horas o pH se reduz para um valor de 4,2. Esta fase (24 horas após o início) é caracterizada pelo domínio da atividade das bactérias lácticas, microorganismos que produzem ácido láctico, ácido acético e típicos aromas de massas ácidas. No final da fermentação, a massa pode atingir um pH de 3,5 a 4,5; acidez que a levedura *Saccharomyces cerevisae* não tem uma boa tolerância. Os ácidos produzidos pelos lactobacilos diminuem o crescimento das leveduras, comercial ou selvagem, porém a selvagem é mais resistente à acidez (Suwelack, 1999).

✓ Fermentação do Ácido Láctico e Ácido Acético

No curso da fermentação do carboidrato, a bactéria láctica do fermento transforma glicose em ácido láctico. Quando o principal ácido formado é o láctico, é chamada de fermentação homofermentativa; quando uma quantidade considerável de ácido acético também é formada, o processo é chamado de fermentação heterofermentativa. Ambas formas de fermentação são bastante complexas e envolvem vários estágios intermediários, D-glucose é o produto primário da fermentação homofermentativa (figura 2), a qual produz

ácido pirúvico através de um número de estágios intermediários. O ácido pirúvico é mais tarde reduzido enzimaticamente a D- e L-ácido láctico. Sobre condições anaeróbicas e adição de leveduras, o ácido pirúvico pode ser transformado a acetaldeído e por redução a etanol. No curso deste processo, gás carbônico é liberado (Seibel e Brümmer, 1991).

A fermentação heterofermentativa (figura 3) tem também a D-glicose como produto primário. Os produtos intermediários são ácido pirúvico, que é reduzido a ácido láctico, e acetil fosfato, o qual é transformado em ácido acético e gás carbônico, ou etanol. Esse processo recebe o nome de Hexose-monofosfato (HMP) (Seibel e Brümmer, 1991).

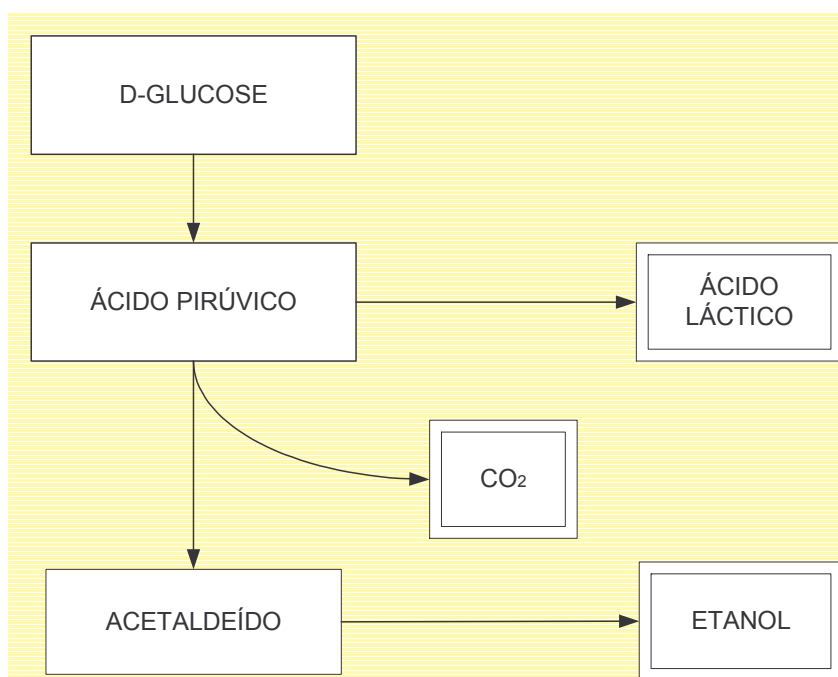


FIGURA 2 – Diagrama representativo da fermentação homofermentativa

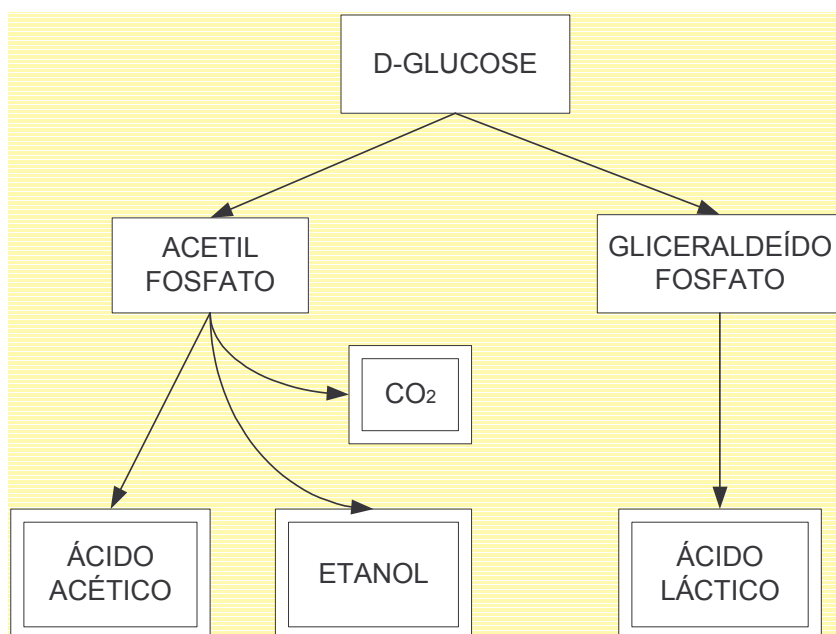


FIGURA 3 – Diagrama representativo da fermentação heterofermentativa

Pelo ajuste da temperatura e quantidade da massa ácida, é possível controlar o curso da fermentação láctica e a formação de ácido láctico e acético. A experiência tem mostrado que fermento natural quente e/ou um aumento na quantidade da massa promove um aumento na formação de ácido láctico. Fermento natural frio e firme reduzem a quantidade de ácido láctico e produz quase a mesma quantidade de ácido acético das médias estudadas. A medida da proporção de quantidade entre ácido láctico e ácido acético é chamado de quociente de fermentação (Seibel e Brümmer, 1991).

✓ *Acidificação da massa*

A acidificação da massa é influenciada principalmente pela temperatura, dosagem da massa ácida, tipo de farinha e cultura “starter”. Uma massa ácida tem um complicado sistema biológico, tanto em termos da composição dos microorganismos como na influência dos fatores mencionados sobre os microorganismos presentes (Seibel e Brümmer, 1991).

Durante o desenvolvimento da massa ácida, a formação inicial de ácido acético é rápida, alcançando seu máximo logo no início da acidificação e mantendo esse nível até o

final do período de acidificação. Por outro lado, a formação do ácido láctico acontece mais lentamente (Brümmer e Lorenz, 1991).

✓ *Metabolismo dos aminoácidos*

Os estudo de Baca e Golebiewski (1997); Spicher e Schroder (1979) mostraram que na fermentação dos metabólitos, os aminoácidos são importantes no metabolismo dos microorganismos da massa, nas necessidades nutricionais e nas atividades proteolíticas. Eles também servem como uma importante fonte de precursores do aroma de pão. Durante a fermentação da massa, algumas espécies de *Saccharomyces*, lactobacilos (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. fructivorans* e *L. farciminis*) e estreptococos (*Streptococcus thermophilus*) evidenciam uma importante demanda de aminoácidos (citado por Collar *et al.*, 1992).

As necessidades da microflora do fermento natural, os fatores do ambiente e as leveduras são os principais parâmetros que influenciam na cinética dos aminoácidos (Gobbetti *et al.*, 1997). A quantidade total dos aminoácidos depende das cepas de bactérias lácticas e o período de fermentação. O estudo de Collar *et al.* (1990) mostrou que as bactérias lácticas metabolizam grandes quantidades de aminoácidos livres durante a fermentação da massa do pão.

A farinha, a levedura, e, principalmente, as bactérias lácticas contêm proteases e peptidases. A sua ação hidrolítica específica nas proteínas da massa durante a fermentação libera aminoácidos e peptídeos. A assimilação de aminoácidos promove o crescimento dos microorganismos, aumentando a atividade fermentativa e tolerância das leveduras ao álcool e o aumento também das bactérias lácticas (Collar *et al.*, 1992).

As mudanças na quantidade de aminoácidos livres durante a fermentação claramente diferenciam as massas com ou sem leveduras como “starters” microbiológicos (Collar *et al.*, 1992). Spicher e Nierle, 1984 (citado por Collar *et al.*, 1990) mostraram que quando as leveduras participam na fermentação, a quantidade de aminoácidos diminui devido ao consumo de alanina, glicina e lisina. Esta tendência e o grau de mudanças depende dos microorganismos presentes.

Depois do crescimento, normalmente há um declínio da quantidade de aminoácidos em massas que contêm leveduras; em massas com “starters” de bactérias, não foram detectadas mudanças significativas no nível de aminoácidos (Collar *et al.*, 1992).

No início da fermentação, a levedura *S. cerevisae* rapidamente atingiu a fase log, e assimilou nitrogênio devido ao crescimento e à multiplicação das células, em boa concordância com o grande consumo e rápida assimilação de alguns aminoácidos em massas com leveduras durante o seu crescimento. A adição de cepas de bactérias lácticas e a *S. cerevisae* como “starters” fermentadores, não modificou o grau de metabolização dos aminoácidos essenciais, mas um efeito sinérgico de assimilação de arginina e prolina é induzido (Collar *et al.*, 1992).

O acúmulo de aminoácidos durante a fermentação com fermentos naturais de farinha de centeio já foi estudado e atribuído à ação proteolítica de proteases específicas de lactobacilos com compostos de alta massa molecular. Em adição, o efeito da ação hidrolítica nas proteínas da massa por enzimas da farinha e microflora da farinha deve ser considerado. Esta explicação é comprovada pelo significativo aumento no total de alguns aminoácidos individuais observados em massas sem “starters” (Collar *et al.*, 1992).

O tempo de fermentação da massa ácida e o tempo final de fermentação têm uma influência significativa no pH do pão em diferentes massas ácidas. A produção de gás pode ser proveniente das leveduras e das bactérias lácticas heterofermentativas, porém a maioria dos dados de literatura mostram que as generalizações dos efeitos da massa ácida na qualidade final do pão devem ser feitas com muito cuidado, pois as culturas “starters” usadas em processos distintos podem acarretar em diferentes resultados, e por isso deve ser cuidadosamente selecionado para se alcançar a qualidade desejada (Clarke *et al.*, 2003).

Gobbetti *et al.* (1994b) constataram que ácido glutâmico, isoleucina e valina são essenciais para o crescimento de *L. sanfranciscensis* CB1 e *L. plantarum* DC400. Arginina, metionina e leucina são estimulantes e alanina, glicina, ácido aspártico, lisina, histidina, cisteína, tirosina e prolina não tiveram efeito. Cada aminoácido individual, com exceção da lisina, cisteína e histidina, foram fontes de nitrogênio para o crescimento de *S. cerevisae* e *S. exiguus* M14.

2.1.4 Influência da Farinha

O tipo de farinha utilizada na preparação do fermento natural é um fator importante na determinação das características do pão. Com um alto grau de extração, a quantidade de nutrientes (vitaminas e minerais) aumenta, assim como a capacidade tamponante da farinha (primariamente por causa do ácido fítico da camada da aleurona). Estes fatores podem estimular o crescimento e a atividade bioquímica da microflora no fermento, seguida pela alta produção de ácidos e outros compostos aromáticos (Hansen e Hansen, 1994).

As principais características das massas ácidas são influenciadas pelo grau de extração da farinha de trigo. Um baixo grau de extração não permite obter altas concentrações de acidificação (Martinez-Anaya *et al.*, 1994). Por essa razão, a maioria dos fermentos naturais utilizados na fabricação de pães de trigo são feitos com farinha de alto grau de extração. Pesquisadores resumiram suas investigações em: influência no pH da extração da farinha, temperatura da massa e quantidade de água, e na produção de ácidos com uma cultura combinada como “starter”. Os valores finais de acidez em fermentos naturais feitos de farinha integrais (cinzas 1-5%) foram quase o dobro dos valores nos fermentos feitos com farinha com baixa grau de extração (cinzas 0 – 0,55%) (Hansen e Hansen, 1994).

Hansen e Hansen (1994) também estudaram a influência do teor de cinzas em farinha de trigo na produção de acidez titulável total (ATT) em fermentos naturais. Os estudos foram feitos com farinhas alemãs tipos 550, 812, 1050 e farinha integral, e uma relação linear foi encontrada para teor de cinzas (0,55 a 1,65%) e a produção de acidez total em fermentos naturais.

Outras pesquisas foram feitas sobre o efeito do tipo da farinha na produção de ácidos em fermentos naturais de trigo com culturas “starters” de pães de centeio. O tipo de farinha teve uma considerável influência na produção de ácidos. A concentração de ácido acético em pães feitos com farinha integral (teor de 1,64%) foi quase o dobro da concentração em pães feitos com farinha com baixo grau de extração (teor de 0,86%). A concentração de ácido láctico foi 30 a 50% maior em pão feito com farinha integral do que em pão feito com farinha branca (Hansen e Hansen, 1994).

O ácido láctico e o acético são importantes compostos do fermento natural de trigo. O ácido acético é conhecido como um realçador de sabor em pão de trigo. Pesquisas sobre a produção de compostos de sabor a partir do ácido láctico e acético têm sido feitas apenas para farinha de centeio integral, fermentos naturais de centeio e pão de centeio com fermento natural (Hansen e Hansen, 1994).

Segundo Hansen e Hansen (1994), a quantidade total de ácidos láctico e acético produzidos foi independente da cultura “starter” utilizada. A produção de ácido láctico depende principalmente do tipo da farinha enquanto que a produção de ácido acético depende mais da cultura usada (Hansen e Hansen, 1994).

A quantidade de leveduras foi maior em fermento natural feito com farinha de alta grau de extração, entretanto verificou-se uma similar redução na quantidade de leveduras, quando a capacidade tamponante foi aumentada, resultando em uma alta quantidade de ácidos. A quantidade de leveduras também foi maior em fermentos naturais com *L. plantarum* (Hansen e Hansen, 1994).

Os compostos voláteis encontrados foram primariamente álcoois, principalmente etanol; ésteres (predominantemente o etil acetato), e um pouco de carbonilas. A quantidade de compostos voláteis foi influenciada principalmente pela cultura “starter” usada, mas uma interação entre “starter” e tipo de farinha foi verificada pela presença de alguns compostos aromáticos. O tipo da farinha teve um efeito significativo na produção de etil acetato e etanol (Hansen e Hansen, 1994).

Brummer e Lorenz (1991) estudaram algumas características da qualidade dos pães feitos com massa ácida de farinha de trigo variando o teor de cinzas, como apresentado na Tabela 1:

TABELA 1 - Características do pão X Teor de cinzas

TEOR DE CINZAS (%)	0,45	0,55	0,81	0,99	1,05
<i>Absorção (%)</i>	57	57	57	57	57
<i>Características da massa:</i>					
1) <i>Parte superior</i>	1) Normal	1) Levemente úmido	1) Levemente úmido	1) Levemente úmido	1) Levemente úmido
2) <i>Elasticidade</i>	2) Normal	2) Levemente elástico	2) Levemente elástico	2) Levemente elástico	2) Levemente elástico
<i>Volume (ml/ 100g de farinha)</i>	610	600	600	580	590
<i>Estrutura do miolo</i>	Macio	Levemente macio	Levemente macio	Um pouco rústico	Um pouco rústico
<i>Elasticidade do miolo</i>	Boa	Boa	Boa	Um pouco consistente	Um pouco consistente
<i>Gosto</i>	Suave	Suave, aromático	Aromático	Aromático, ácido	Aromático, ácido
<i>Acidez / pH</i>	2,3 / 5,6	3,1 / 5,0	3,7 / 4,8	4,2 / 4,7	3,9 / 4,8
<i>Cor do miolo</i>	Normal	Normal	Normal	Levemente escuro	Levemente escuro

Dosagem utilizada de massa ácida: 10%.

Em massas ácidas feitas com farinha de baixa extração, Brümmer e Lorenz (1991) observaram um aumento de ácido láctico relacionado com a absorção de água. Em massas firmes (absorção de 60%) aproximadamente 76% do total de ácido detectado foi ácido láctico e em massas com 100 a 150% de absorção, a porcentagem de ácido láctico aumentou para 83 a 84%.

2.1.5. Influência da temperatura

Os estudos de Simonson *et al.* (2003) mostraram que as leveduras e as bactérias lácticas tiveram um maior crescimento quando a temperatura foi aumentada de 15°C para

27°C. A temperatura ótima de crescimento das leveduras esta entre 26 a 28°C e das bactérias lácticas de 30 a 35°C.

Em comparação à farinha, a temperatura tem um papel menor no controle dos níveis de acidificação, mas o seu aumento, geralmente, causa aumento dos efeitos proporcionados pela farinha utilizada (Martinez-Anaya *et al.*, 1994)

2.1.6 Influência da composição

A variação de NaCl pode influenciar o desenvolvimento do fermento natural ou da massa ácida, pois reflete no crescimento das bactérias lácticas e leveduras. O aumento de 0 a 3,2% de NaCl resultou na diminuição do crescimento das leveduras. Enquanto que, em dosagens intermediárias (1,6%) a 15°C teve um efeito positivo no crescimento da levedura. A acidez titulável foi mínima com a máxima concentração de sal, mostrando que o sal pode ser usado para controlar a produção excessiva de ácido (Simonson *et al.*, 2003).

Baixos níveis de NaCl tem um efeito estimulante no crescimento das bactérias lácticas. Kline e Sugihara (1971) mostraram que *L. sanfranciscensis* em sistemas com água e farinha de trigo tiveram um efeito positivo com 0,5% de NaCl (citado por Simonson *et al.*, 2003).

Simonson *et al.* (2003) mostrou que o aumento da concentração de sacarose acima de 3,5% aumentou o crescimento da levedura. A adição de um carboidrato estimula e sustenta o crescimento da levedura durante a fermentação. As bactérias lácticas tiveram um aumento de crescimento com a adição de sacarose entre 0 a 2,6%. Adição acima de 2,6% resultou num declínio do crescimento. O aumento de crescimento das bactérias lácticas com adição de sacarose pode estar relacionado com a ação da invertase da levedura que rapidamente hidrolisa a sacarose em glucose e frutose. A adição de sacarose teve um grande efeito positivo particularmente na produção de ácido acético na massa ácida. Quando a sacarose é hidrolisada pela invertase da levedura, a frutose fica disponível para as bactérias lácticas e é usada na co-fermentação de maltose.

2.1.7. Interações entre as Bactérias Lácticas e as Leveduras

As bactérias lácticas e as leveduras são freqüentemente encontradas juntas na fermentação não só para produzir muitos tipos de pães como também para produzir bebidas como vinho, cidra, koumiss e kefir; e alimentos como queijo, missô e molho de soja (Gobbetti *et al.*, 1994c).

Os lactobacilos são essenciais para a acidificação e proteólise que proporciona uma boa textura, sabor e shelf-life de pães de trigo com fermento natural (Gobbetti *et al.*, 1996). A proteólise durante a fermentação da massa ácida, estimula as interações entre as bactérias lácticas e as leveduras (Gobbetti *et al.*, 1994a). Os aminoácidos livres contribuem diretamente ou como precursores de desenvolvimento de aroma durante a fermentação da massa ácida e forneamento (Damiani *et al.*, 1996).

Os carboidratos que são utilizados pelas bactérias lácticas - conseqüentemente, seu rendimento de energia, e produção de ácidos láctico e acético - são fortemente influenciados pelas leveduras associadas variando de acordo com os tipos de açúcares presentes (Gobbetti, 1998).

A finalidade da utilização do fermento é o crescimento da massa pelas leveduras, uma acidificação simultânea também acontece devido às atividades das bactérias lácticas presentes. A acidificação do fermento natural resulta num pão com um miolo elástico e uma boa qualidade sensorial. Para otimizar o controle da fermentação, têm-se buscado compreender as interações que ocorrem entre as bactérias lácticas e as leveduras no complexo biológico do fermento. Esta é a razão pela qual é importante investigar o comportamento das bactérias homo e heterofermentativas com leveduras misturadas na cultura, suas atividades proteolíticas e a influência das leveduras na proteólise durante o processo de fermentação (Gobbetti *et al.*, 1994c).

Na simulação do complexo ecossistema do fermento natural, a competição por substratos pode ser estudada em um modelo de co-culturas e isto pode melhorar o entendimento das relações entre bactérias lácticas e leveduras. As leveduras apenas competem parcialmente com as bactérias lácticas pelas fontes de nitrogênio presentes e sintetizam e excretam aminoácidos essenciais e estimulantes que aumentam o crescimento

das bactérias lácticas. Isto contribui para a interpretação de algumas das complexas interações que ocorrem durante a fermentação, as quais são difíceis de entender por causa da extensa atividade proteolítica que ocorre no fermento natural (Gobbetti *et al.*, 1994c).

A competição microbiológica por maltose e glicose representa um ponto crítico em farinhas de trigo com baixas concentrações de carboidratos solúveis. A adição de fonte de carbono na massa é sugerida para aumentar a produção de ácidos láctico e acético (Gobbetti *et al.*, 1994c).

Atividade fermentativa (pH, acidez total, produção de ácido acético e láctico, quociente de fermentação) e atividade proteolítica e performance no forneamento (pH, acidez total e características sensoriais do pão) têm mostrando serem dependentes das condições de processo (temperatura e rendimento da massa), tipo e proporções de leveduras - quando leveduras são adicionadas aos fermentos naturais de centeio inoculados com lactobacilos homo e heterofermentativos (Martinez-Anaya *et al.*, 1990).

O comportamento das leveduras e das bactérias lácticas de forma individual e, em combinações selecionadas em fermentos naturais de trigo foram estudados por Martinez-Anaya *et al.* (1990). Das cinco leveduras estudadas individualmente, a *S. cerevisiae* foi a que teve melhor produção de gás e melhor sabor. Em ensaios usando combinações de duas e três leveduras, a produção de gás foi proporcional à soma de cada habilidade fermentativa. As amostras com grandes quantidades de *S. cerevisiae* produziram mais gás, parecidos com a produção obtida com *S. cerevisiae* sozinha. Em combinações com quantidades menores de *S. cerevisiae*, a produção de gás variou em relação às outras espécies de leveduras. Misturas de três leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, *S. fructuum* e *C. boldinii* em três diferentes proporções, produziram mais gás durante a fermentação do que a contribuição correspondente de cada levedura individual. A performance do pão feito com três leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, resultou nos melhores volumes (Martinez-Anaya *et al.*, 1990).

Meignen *et al.* (2001) fizeram testes com massa ácidas e determinaram a contagem de células e o grau de crescimento depois de 20 h a 30°C de fermentação. O crescimento das leveduras na massa foi menor do que das bactérias lácticas, especialmente quando as culturas “starters” foram misturadas. Estes resultados são provavelmente devido à drástica

queda do pH e acidificação promovida pelas bactérias. A combinação de bactéria com levedura não promoveu efeito na formação de ácido láctico, mas mais ácido acético foi formado.

Neste mesmo estudo, em massa ácida feita com apenas uma cultura “starter”, *L. brevis* produziu menos compostos aromáticos comparado com *S. cerevisiae*. Fermentações com mistura de “starters” produziram significativamente mais compostos aromáticos, mas as diferenças não foram significativas no pão. Em massas ácidas, encontraram-se principalmente os compostos: 3-metil, 1-butanol, etil lactato, e 2-fenil etil álcool. Em pães, os dois últimos compostos citados também se repetiram. A maior produção de compostos aromáticos em culturas de “starters” misturados pode ser relacionado à atividade proteolítica das bactérias lácticas. Existe uma correlação entre concentrações de aminoácidos e compostos aromáticos, mas não foi possível associar aminoácidos específicos aos compostos aromáticos correspondentes.

Considerando que *L. brevis* inibiu o crescimento de *S. cerevisiae* e efeitos estimulantes têm sido observados em processos com “starters” misturados, a combinação de dois processos foram testados por Meignen *et al.* (2001): um processo de 15 h com apenas um “starter” seguido de 10 h com o processo misturado. Testes preliminares mostraram que o crescimento exponencial das leveduras foi atingido depois de uma fermentação de 15 h e que foram necessárias aproximadamente 10 h para uma produção razoável de compostos aromáticos. Esta nova seqüência proporcionou uma maior produção de compostos aromáticos na massa ácida e no pão. Aumentando o tempo de fermentação em 25% (de 20 para 25h) em favor do processo combinado, vários aromas foram encontrados em maiores concentrações: 3 e 2-metil-butanol na massa, etil lactato e 2-fenil etil álcool no pão. Análises sensoriais mostraram que o pão feito com a seqüência de fermentação teve significativamente uma maior quantidade de aromas típicos de massa ácida. Em comparação, pão feito com processo de fermentação com culturas misturadas tiveram aromas do tipo doce, ácido e amargo que estão provavelmente relacionados com a alta acidez desenvolvida pela bactéria nestas condições. Os usos de “starters” separados e combinados mudaram a fermentação da massa e o aroma do pão. Com culturas misturadas, o crescimento da levedura foi inibido, porém mais ácido acético e compostos aromáticos foram formados. Usando a combinação com 25% a mais de fermentação, é possível

aumentar os aromas típicos da massa, comparado com o processo de “starters” separados ou combinados (Meignen *et al.*, 2001).

A associação entre *Lb. sanfranciscensis* e *Saccharomyces exiguus* é típica na produção de pão francês de São Francisco e panetone (Gobbetti *et al.*, 1994 a). As relações que ocorrem entre o *Lb. sanfranciscensis* e leveduras tem sido estudadas. Foi relatado que o estímulo de crescimento está relacionado com a disponibilidade de aminoácidos específicos e peptídeos excretados pelas leveduras. Esta liberação de peptídeos torna possível o seu crescimento mesmo em meios deficientes em aminoácidos essenciais. A fermentação por *S. cerevisiae* está associada com a diminuição total dos aminoácidos na massa ácida, porém, foi descoberto que peptídeos específicos podem promover uma vantagem competitiva e contribuir na estabilidade do *Lb. sanfranciscensis* (Gobbetti *et al.*, 1994c).

2.1.8. Influência das culturas utilizadas na produção de aroma e gosto

Mesmo sabendo que os precursores de aroma e sabor estão presentes na farinha de trigo e que a maior parte dos aromas são formados durante a fermentação da massa (Hansen e Hansen, 1996) e o forneamento, o uso da massa ácida é essencial para se atingir uma maior aceitação sensorial em relação ao sabor em comparação a um pão acidificado quimicamente. Os compostos voláteis têm sido investigados, principalmente, em fermentos naturais (Gobbetti *et al.*, 1995a). Muitos desses estudos têm se concentrado nos componentes aromatizantes do pão, e hoje por volta de 300 compostos voláteis já foram identificados (Hansen e Hansen, 1996).

O aroma da casca de um pão de centeio é influenciado por precursores de sabor da farinha integral de centeio, desenvolvidos durante a fermentação da massa ácida, no crescimento da massa e no processo de panificação. Pouco se sabe sobre a influência do processo de fermentação da massa ácida no aroma do pão de centeio, mas este é um dos fatores que dão ao pão um aroma diferente e mais intenso do que o pão de trigo. Na tentativa de controlar a fermentação, tem-se aumentado o interesse em usar culturas “starters”. Muitos pesquisadores têm identificado a microflora de diferentes massas ácidas, tanto de massa ácida com “starters” comerciais como de fermentos naturais. O trabalho de Hansen *et al.* (1989) teve como objetivo fazer investigações sobre a influência da

temperatura e da quantidade de massa ácida na produção de ácido láctico e ácido acético, e na performance do produto panificado. O grau de extração da farinha de centeio mostrou ter influência na produção de ácidos nas massas ácidas.

Na fermentação com massa ácida são produzidos ácido láctico, ácido acético e compostos voláteis como álcoois, ésteres e carbonilas, dependendo dos microorganismos da massa. Aminoácidos livres também podem ser produzidos pela atividade proteolítica na massa ácida, que mais tarde estarão envolvidos em reações de Maillard durante o forneamento (Hansen e Hansen, 1996).

No trabalho de Hansen e Hansen (1996), os compostos aromáticos detectados em pães sem (controle) e com massa ácida, mostrou a mesma composição, mas a quantidade de compostos aromáticos foi maior nos pães com massa ácida. Os compostos identificados em pães foram primariamente álcoois e ácidos. Os álcoois encontrados foram: etanol, 2/3-metil-1-butanol, 2 -metil-1-propanol e n-propanol. A produção de ácidos foi dominada pelos ácidos 2-metilpropionico, 3-metil-butanoico e acético. Geralmente, a massa tem uma quantidade menor de ésteres. Os ésteres identificados foram: etil acetato, etil n-hexanoato e etil lactato.

Na Tabela 2, Damiani *et al.* (1996) identificaram as concentrações mínimas e máximas de ácido láctico, ácido acético em massas ácidas iniciadas com espécies de bactérias lácticas homo e heterofermentativas e leveduras:

TABELA 2 – Concentrações mínimas e máximas encontradas em massas ácidas

Espécies	Ácido Láctico	Ácido Acético	Etanol
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	2,88-3,79	0,27-0,35	1,45-1,78
<i>L. brevis</i>	2,12-3,56	0,17-0,27	0,73-1,39
<i>L. fructivorans</i>	1,12-1,79	0,13-0,20	0,33-0,46
<i>L. fermentum</i>	2,93-3,44	0,21-0,25	1,02-1,37
<i>L. cellobiosus</i>	2,81-3,27	0,15-0,35	1,19-1,95
<i>L. plantarum</i>	4,58-5,14	0-0,08	--
<i>L. farciminis</i>	3,58-4,27	0-0,05	--
<i>L. alimentarius</i>	3,48-3,95	--	--
<i>L. acidophilus</i>	3,11-4,19	--	--
<i>L. delbrueckii</i>	4,24-4,98	--	--
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	--	--	8,88-9,41
<i>Cândida krusei</i>	--	--	--
<i>C. norvegensis</i>	--	--	--
<i>S. exiguus</i>	--	--	2,75-3,88
<i>Hansenula anomala</i>	--	--	2,12-2,95

O etanol variou muito com as espécies e foi maior na presença da *S. cerevisiae*.

Hansen *et al.* (1989) também identificaram que, no geral, a acidez titulável cresce mais rapidamente a 35°C e mais lentamente a 25°C. O crescimento da acidez a 35°C foi nas culturas heterofermentativas, especialmente o *L. sanfranciscensis*, mas as diferenças entre as espécies são pequenas. Não foi encontrada uma relação entre a contagem de células de lactobacilos e a acidificação da massa ácida. O aumento do número de células variou entre as culturas e todos foram menores a 40°C. Isto pode ser devido ao cultivo aeróbico das bactérias danificadas subletalmente. A propagação das leveduras foi maior nas culturas homofermentativas, evidentemente devido ao efeito inibitório do ácido acético. A quantidade total de ácido láctico e acético foi de 0,9-1,3% em peso.

O ácido acético, em níveis de 100-200 ppm, tem ação de realçador de aroma no miolo do pão. Algumas investigações verificaram a influência do processo de panificação na

formação do aroma do pão. Richard-Molard *et al.* (1979) estudaram as diferentes técnicas de fazer pão e eles acharam que as quantidades de ácidos voláteis (acético, isobutírico e isovalérico) variam consideravelmente com as técnicas de mistura e método de fermentação usado. Os ácidos “iso” tem uma influência negativa no aroma do pão e os níveis desses ácidos são geralmente proporcionais à quantidade de levedura adicionada na massa, que são maiores em processos mais rápidos do que em produtos feitos com fermento natural ou massa ácida. Por outro lado, a concentração do ácido acético foi maior com a massa de fermentação prolongada comparada com a de processo direto (Hansen e Hansen, 1996). O ácido acético em culturas heterofermentativas contabiliza 16-29% do peso do ácido láctico total, mas essa porcentagem varia de acordo com a firmeza da massa e da temperatura de fermentação e com o citrato disponível (Gobbetti e Corsetti, 1996).

Outros ácidos presentes em menor quantidade (ácidos propiônico, isobutírico, butírico, α -metil, n-butírico, isovalérico e valérico) gerados pela atividade das enzimas microbianas, também contribuem na acidez titulável e no sabor (Galal *et al.*, 1978).

Massas ácidas fermentadas com lactobacilos heterofermentativos têm maior acidez titulável, maior quantidade de ácido acético, menor contagem de leveduras e menos produtos da fermentação de leveduras em comparação as massas fermentadas com lactobacilos homofermentativos. Enquanto o etanol e etilacetato são produzidos em grande quantidade com *Lb. sanfranciscensis*, etil-n-propanoato, butil-acetato e n-pentil-acetato são produzidos apenas em massas ácidas com leveduras (Hansen e Hansen, 1994).

O total de compostos voláteis - com exceção do dominante etanol – é menor e mais constante (independente da temperatura de fermentação) nas culturas heterofermentativas. Não foi encontrada uma conexão com a contagem de leveduras. As culturas de lactobacilos produziram poucos compostos voláteis, enquanto que as leveduras produziram grandes quantidades. Investigações com massas ácidas sem “starters” (fermentos naturais) sobre diferentes condições de processamento obtiveram compostos muitos parecidos com os apresentados na Tabela 2, com etanol e etil acetato como dominantes e com diferentes níveis de iso-álcoois e ésteres (Hansen *et al.*, 1989).

A produção de etanol é maior nos pães com massa ácida do que no controle, e a produção variou de acordo com as culturas “starters” utilizadas. Geralmente, a quantidade

de etanol é maior em pães com massa ácida de lactobacilos e leveduras (Hansen e Hansen, 1996).

No estudo em cromatógrafo de Gobbetti *et al.* (1995a), a associação de *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* e *S. cerevisiae* produziu uma massa ácida com maior porcentagem relativa de compostos da fermentação de leveduras (1-propanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol) e com maior área total de compostos voláteis, enquanto que a associação de lactobacilos e *S. exiguus* teve um perfil mais completo que impossibilitou um metabolismo de bactérias pronunciado.

Os principais compostos produzidos pelo *Lb. sanfranciscensis* são: etilacetato (menos do que de outras espécies), alcóois (etanol, 1-propanol, 2-metil-1-pentanol, 1-heptanol e 1-octanol), aldeídos (3-metil-1-butanal, heptanal, trans-2-heptanal, octanal e nonanal) e ácido acético. Alguns desses compostos, em particular 3-metil-1-butanal e nonanal têm sido considerados aromas potentes em massas ácidas de pão de centeio e trigo (Gobbetti e Corsetti, 1997).

Para o estudo da influência dos parâmetros de fermentação na produção de compostos voláteis e ácidos, Gobbetti *et al.* (1995 a) estudaram a associação de *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* e *S. cerevisiae*, por ser encontrada freqüentemente em fermentos naturais de vários países europeus. Aumentando a temperatura de 25 para 30°C efetivamente aumentou-se a fermentação da levedura; enquanto que a 25°C, a massa ácida foi quase exclusivamente caracterizada pela presença de etil acetato, ácido láctico e ácido acético, a 30°C etanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-propanol foram nitidamente mais produzidos; o aumento da temperatura para 35°C reduziu a área total dos voláteis e não alterou o perfil.

Gobbetti *et al.* (1995a) também detectou que as maiores porcentagens de etil acetato e a presença de 2- e 3-metil-1-butanal e diacetil foram garantidas pela firmeza da massa. Lund *et al.* (1989) também encontrou boa relação entre as habilidades de acidificar das bactérias homo- e heterofermentativas com a firmeza das massas ácidas. Lorenz (1983) verificou que a consistência da massa também afeta as proporções formadas de ácido láctico e acético; massas moles favorecem a formação de ácido láctico e massas duras favorecem a formação de ácido acético.

O maior número de precursores de aromas em farinha de trigo com alto grau de extração pode ser responsável pelo aumento da quantidade total de compostos voláteis. No trabalho de Spicher e Rabe (1983), o etanol também aumentou significativamente com o aumento do teor de cinzas, e os ácidos láctico e acético diferiram significativamente somente quando o teor de cinzas variou de 0,55% a 1,0%. A alta quantidade de ácido encontrado em farinha escuras (de trigo ou centeio) está relacionado com a capacidade tamponante dessas farinhas, e em particular, a presença de compostos como fitato que possibilitam a fermentação láctica para estendê-la sem repressão pelo baixo pH (citado por Gobbetti *et al.*, 1995a).

Pães de massa ácida de farinha de trigo com adição de frutose e citrato proporcionaram porcentagem mais alta de iso-álcoois e metil-aldeídos. Os compostos voláteis e os ácidos láctico e acético podem ser monitorados por vários parâmetros biotecnológicos durante a sua produção (Gobbetti e Corsetti, 1996)

Análises químicas dos compostos aromáticos estão sendo combinadas com análise sensorial de pão ou com uma mistura sintética de compostos voláteis no pão para descobrir a influência que os compostos tem sobre o aroma sentido. Compostos que tem correlação positiva com o aroma do pão são: acetaldeído, 2-metil-propanal, 3-metil-butanal, isopentanal, 2-nonenal, benziletanol, 2-feniletanol, dimetil sulfito e 2-furfural (Hansen e Hansen, 1996).

Segundo Hansen e Hansen (1996), quanto mais se adicionou massa ácida, mais aumenta a acidez dos miolos observado por painel de provadores. O pão controle apresentou um odor de levedura adocicado e um sabor de pão doce. Cultura *L. sanfranciscensis* resultou num pão com um odor suave e azedo e um sabor de pão feito em casa. Os miolos tiveram um sabor salgado comparado com os outros. É possível aumentar a intensidade do sal aumentando a acidez. Pães feitos com massa ácida de *L. plantarum* tiveram um odor forte, azedo e desagradável e um sabor ácido metálico com sabor residual. Esta diferença de percepção de odor e sabor azedo entre pães com *L. sanfranciscensis* e *L. plantarum* podem ser devido à diferença de ácido acético. O ácido acético pode estar agindo como um realçador de outros compostos aromáticos. Quando *S. cerevisiae* foi adicionada com *L. plantarum*, o pão adquiriu o maior odor aromático e gosto. O forte

gosto azedo metálico foi substituído por um pão de trigo com mais aroma (Hansen e Hansen, 1996).

2.1.9. Atividade da microflora durante a fermentação da massa ácida

As propriedades organolépticas e estruturais dos produtos panificados de centeio e trigo, como também a manutenção de sua qualidade e as mudanças nas propriedades associadas à retrogradação, são notavelmente afetadas pela dinâmica de fermentação e a flora microbiológica da massa. Já é conhecido que leveduras e bactérias lácticas afetam nas características da massa de diferentes maneiras. Os efeitos individuais dos “starters”, temperatura, consistência da massa ou rendimento da massa, adição de NaCl, quantidade de oxigênio na massa, como o tipo de farinha e pH nas propriedades da massa ácida tem sido investigadas (Gianotti *et al.*, 1997).

Um apropriado balanço entre os metabolismos de vários “starters” é também fundamental para o desenvolvimento de boas características. Estudos recentes com leveduras e bactérias (Martinez-Anaya *et al.*, 1990; Gobbetti *et al.*, 1994c e d; 1995c) colocaram em grande evidência os mecanismos do antagonismo microbiológico e mutualismos nas massas ácidas. A adição de frutose e citrato (Gobbetti *et al.*, 1995c, Gobbetti e Corsetti, 1996) tem sido uma ferramenta para o aumento da fermentação das bactérias lácticas modificando positivamente o tipo e a concentração de produtos finais e, em geral, para redução da competição por fontes de carboidratos entre as bactérias e as leveduras. O uso de “starters” selecionados permite processos reduzidos, melhora e padronização das características da massa e do pão, aumento do valor nutritivo, maior shelf-life e menor custo de produção (Gianotti *et al.*, 1997).

O gerenciamento e controle de “starters” - de massa ácida fresca, congeladas ou liofilizadas - é limitado pelo conhecimento incompleto de fatores chaves que controlam as interações entre as espécies de “starters” misturados. O papel e a importância dos ingredientes e condições físico-químicas nas interações entre leveduras e bactérias lácticas e suas atividades metabólicas podem ser investigadas analisando seus efeitos individuais e interativos através de modelos experimentais de dados (Gianotti *et al.*, 1997).

Segundo planejamento experimental de Gianotti *et al.* (1997), o crescimento das leveduras foi afetado significativamente somente pelo NaCl e a quantidade da massa ácida (g de massa ácida /100 g de farinha ou DY). Em particular, os sinais positivos e negativos dos coeficientes dos termos individual e quadrático da regressão para DY indicaram a existência de um valor ótimo deste fator para o crescimento das leveduras.

O crescimento das bactérias lácticas foram afetados pelos mesmos fatores (NaCl e DY), entretanto, o NaCl teve um efeito negativo em todas as concentrações e esta inibição pode seletivamente favorecer as leveduras. Gianotti *et al.* (1997) constatou que um maior crescimento de bactérias pode ser obtido quando o máximo nível de NaCl é combinado com o máximo nível de DY ou quando ambos estão no seu nível mínimo. As equações sugerem que as interações entre as leveduras e as bactérias podem ser controladas por uma modificação apropriada do NaCl e da atividade de água (a_w).

A formação de etanol foi influenciada por todas as variáveis com exceção do NaCl. A produção de etanol pode ser associada à disponibilidade de açúcares fermentáveis, porém as duas fontes de etanol (bactérias heteroláticas e leveduras) deixam essa interpretação difícil (Gianotti *et al.*, 1997).

As variações de citrato e frutose afetaram significativamente o metabolismo das bactérias e das leveduras, entretanto, foi provado ser inefetivo no seu crescimento. Altos níveis de citrato e frutose tiveram um efeito positivo na produção de etanol. Quando a frutose e as outras variáveis estão em seus níveis intermediários, maiores produções de etanol são atingidas com níveis máximos de citrato e glúten. Segundo Gianotti *et al.* (1997), esses resultados podem ser interpretados baseando-se em algumas modificações no metabolismo microbiano devido à adição dessas fontes de carbono. O citrato não é fermentado por *S. cerevisiae* enquanto que a frutose e o citrato são co-fermentados pela cepa heterofermentativa *L. sanfranciscensis* (Gobbetti *et al.*, 1995b; Gobbetti e Corsetti, 1996). Entretanto, a co-fermentação do citrato ou frutose reduziu a produção bacteriana de etanol, e ao mesmo tempo a competição pela fonte de carbono foi reduzida, resultando numa maior disponibilidade de maltose e glicose para a fermentação das leveduras.

Enquanto o citrato e a frutose aumentam a produção de ácido acético, o citrato residual da co-fermentação tem uma atividade tamponante, o qual pode ter um efeito

negativo na variação de pH durante a fermentação. O fraco papel do glúten pode ser atribuído ao fato de que um aumento nesta variável não significa necessariamente um aumento na quantidade de glúten mas de preferência uma qualidade de glúten. Quando o glúten aumenta, uma quantidade maior de água disponível é absorvida reduzindo a atividade de água da massa (Gianotti *et al.*, 1997).

2.1.10. A estabilidade microbiológica

Na produção de pão de centeio, é necessária a acidificação da massa para deixá-la panificável. Estas necessidades são devidas a não presença de glúten na farinha. No centeio, as funções do glúten (absorção de água e retenção de gases) são feitas pelas pentosanas, cuja solubilidade e absorção da água são ótimas em meios ácidos. A bactéria láctica que se desenvolve na massa pode se originar da seleção natural na farinha ou da adição de um “starter” contendo uma ou mais espécies. Muitas padarias na Europa ainda usam fermentos naturais em suas produções (Rosenquist e Hansen, 2000).

A seguir alguns exemplos de bactérias lácticas identificadas nos fermentos naturais de farinha de centeio por Rosenquist e Hansen (2000):

- homofermentativas: *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* e *L. farciminis*.
- heterofermentativas facultativas: *L. alimentarius*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* e *L. plantarum*.
- heterofermentativas: *L. brevis*, *L. viridescens*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. buchneri* e *L. sanfrancisco*.

Segundo estes autores, as bactérias lácticas isoladas de fermentos naturais são difíceis de serem cultivadas em meios de laboratório. Isto pode ser devido a estas bactérias terem sido selecionadas durante repetidas propagações resultando em uma flora com condições de crescimento e nutrientes requeridos especializados. Massa ácida é um sistema microbiano que ainda não está totalmente investigado. Novas espécies de bactérias lácticas podem ocorrer nesse ecossistema (Rosenquist e Hansen, 2000).

Saccharomyces cerevisiae foi a espécie de levedura mais freqüentemente isolada das massas ácidas estudadas por Rosenquist e Hansen (2000). A ocorrência repetida de

diferentes tipos de bactérias lácticas e leveduras durante o período de amostragem pode ser uma consequência desses tipos terem uma vantagem nutricional no sistema da massa ácida em comparação aos microorganismos adicionados na massa junto com as matérias-primas. Esta seleção pode ser também resultado da produção de substâncias antimicrobianas pela microflora da massa. Tais compostos são principalmente ácidos láctico e acético, mas a produção de diacetil, H_2O_2 e bacteriocinas podem também ter um papel importante na regulação das interações microbianas na massa (Rosenquist e Hansen, 2000).

Tendo um efeito na estabilidade da massa ácida, as substâncias antimicrobianas produzidas durante a fermentação podem também contribuir para a inibição de bactérias deteriorativas. Na produção de pão de trigo, o uso de fermento natural tem mostrado ser um inibidor efetivo do roque causado pelo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Rosenquist e Hansen, 2000) e contra coliformes (Barber e Báguena, 1989).

Há um bom tempo, o uso de propionato tem sido permitido na produção de pães com objetivo de retardar a propagação de mofo no pão. Mas os consumidores, atualmente, tendem a buscar produtos mais naturais sem uso de aditivos. Tentando buscar uma alternativa para isto, Javanainen e Linko (1993) mostraram a possibilidade de se utilizar bactérias que produzem ácido propiônico em conjunto com as bactérias lácticas em substituição ao uso do propionato no processo com massa ácida. O pH e a acidez obtidos nos testes foi acima dos pães produzidos por fermentação natural. Isto pode ter acontecido devido parcialmente a adição de carbonato de cálcio no fermento, que pode causar dissociação dos ácidos acético, láctico e propiônico. Referências mostram que um pão leva em média 4 dias para iniciar a propagação de mofo quando cortado em fatias e embalado em plásticos de polietileno a 23 a 25°C. Os pães do experimento mantiveram-se estáveis por pelo menos 6 dias. O uso de misturas “starters” incluindo bactérias propiônicas podem ter resultados bastante expressivos no que se diz respeito ao aumento de shelf-life.

A atividade do *S. sanfranciscensis* promove uma mistura de ácidos (acético, caprótico, propiônico, butírico e n-valérico) que age de forma sinérgica, que é responsável pela sua atividade antimófo (Gobbetti, 1998).

Na Tabela 3, são apresentados alguns exemplos de produtos metabolizados por bactérias lácticas com propriedades antibacterianas (Holzapfel, 1997).

TABELA 3 – Compostos antimicrobianos metabolizados por Bactérias Lácticas

Composto antimicrobiano	Principais microorganismos alvos
Ácido láctico	Bactérias putrefativas e gram-negativas e alguns fungos.
Ácido acético	Bactérias putrefativas, clostrídio, algumas leveduras e fungos.
Peróxido de hidrogênio	Microorganismos deterioradores e patogênicos, especialmente em alimentos ricos em proteínas.
Enzima – sistema de lactoperoxidase com H ₂ O ₂	Bactérias deterioradoras e patogênicas.
Enzima – Lisozima	Bactérias gram-positivas indesejáveis.
Reuterina (3-OH-propionalaldeído)	Bactérias selvagens, bolores e leveduras.
Diacetil	Bactérias gram-negativas.
Ácidos graxos	Diferentes bactérias.
Nisina	Algumas bactérias lácticas e gram-positivas, notavelmente formadoras de endosporos.
Outros	Bactérias gram-positivas, espectro inibitório de acordo com a cepa produtora e o tipo de bacteriocina

O trabalho de Kirschner e Von Holy, 2002 (citado por Katina *et al.*, 2002) mostrou que a deterioração do pão chamada “rope” é normalmente causada pelo gênero *Bacillus*, especialmente o *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Recentemente foi confirmado que algumas cepas de *B. licheniformis* são toxigênicas (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). A forma eficiente de prevenir o “rope” é controlar o crescimento e germinação dos esporos dos bacilos que já estão presentes no pão; a ocorrência de esporos de bacilos é muito comum em matérias-primas usadas na panificação (Bailey e Von Holy, 1993; Rosenquist e Hansen, 1995).

Um dos métodos livre de aditivos para prevenir a formação de rope é usar massa ácida de trigo. Pão de fermentação natural é um jeito antigo de fazer pão de alta qualidade com um shelf-life microbiológico maior e melhor sabor (Brümmer e Lorenz, 1991).

No estudo de Katina *et al.* (2002), as atividades antimicrobianas do *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* e *P. pentosaceus* foram evidentes no testes de panificação, principalmente devido à inibição de crescimento e germinação durante 7 dias de estocagem, quando o pH e a acidez titulável foram ajustadas a bons níveis na massa ácida. O nível de acidez necessário para a redução da contagem de bacilos é dependente da contagem inicial dos esporos e da proporção de ácido láctico e acético. A inibição mais efetiva, neste estudo, foi vista na massa ácida feita com *Lb. brevis*. O efeito inibitório foi provavelmente causado pela produção de ácido acético. Os testes de panificação mostraram que a redução da contagem dos bacilos foi fortemente dependente do nível de acidez da massa ácida.

Um teste adicionando ácido láctico no pão não preveniu o desenvolvimento do “rope”. Isto indica que embora o nível de acidez da massa ácida seja o maior fator de influência no efeito inibitório, há também outros fatores que estão envolvidos no mecanismo antimicrobiano (Katina *et al.*, 2002).

2.2 SECAGEM DE MICROORGANISMOS

2.2.1. Métodos de secagem de microorganismos

O melhor método de secagem para um produto alimentício é determinado pela qualidade requerida, característica desejada e fator econômico, isto é, o processo de custo inferior que atenda a qualidade e as características necessárias. Um dos maiores problemas dos métodos de secagem é o binômio tempo X temperatura a que o produto é submetido. Para a secagem de microorganismos, é necessário otimizar a troca de calor para que o tempo de secagem não seja alto (Arsdel *et al.*, 1973).

É experimentalmente comprovado que as partículas pequenas secam mais rapidamente que as grandes tendo, portanto, teores de umidade e temperaturas diferentes a cada instante. Estas diferentes combinações de tempo-temperatura afetam os microorganismos presentes no material e a qualidade do produto final (Arsdel *et al.*, 1973).

Vários microorganismos são freqüentemente preservados por congelamento e/ ou secagem no uso de culturas “starters” nas indústrias de alimentos. Entretanto, ocorre uma considerável inativação das células durante o processo de secagem e, por isso, é necessário entender as respostas fisiológicas dos microorganismos na secagem. No processo de

secagem por liofilização, que é mais usado para secagem de microorganismos, nem todas as cepas sobrevivem tendo níveis de sobrevivência na faixa de 0,1% (Kets *et al.*, 1996).

Muitos estudos mostram que a liofilização é o método que mais consegue conservar as características dos produtos, porém o seu custo é 4 a 8 vezes mais caro que os outros métodos de secagem. Cada caso deve ser avaliado separadamente, pois a energia gasta pode se tornar insignificante quando consideramos o valor agregado ao produto e as vantagens obtidas no produto final. A liofilização é um processo de desidratação de alimentos em condições de pressão e temperatura tais que a água, previamente congelada, passa diretamente do estado sólido para o gasoso. Esse processo é indicado em muitas aplicações, porque a baixa temperatura usada conserva as propriedades químicas e organolépticas dos alimentos e no caso de microorganismos vivos a agressão é menor (Gava, 1984), protege de contaminações ou infestações durante a estocagem e facilita na sua distribuição (Ratti, 2001). A fase de congelamento é a fase crítica no processo. O grau de congelamento ótimo parece ser quando a célula não perde água e alcança o ponto de congelamento em um estado amorfo (Alpas, 2001).

Outro método de secagem também utilizado é o de atomização em “Spray dry”, que consiste numa simples operação. O produto a ser seco deve estar no estado fluído. O fluído é dispenso por meio de um atomizador dentro de uma câmara com uma corrente de ar quente que tem função de evaporar a umidade do produto. As partículas secas do produto separadas do ar e coletadas e a umidade evaporada é retirada por um exaustor. Devido ao pequeno tamanho das partículas desenvolve-se uma relação área/volume bastante elevada que permite atingir altos fluxos de calor e de massa reduzindo conseqüentemente os tempos de secagem. A velocidade de secagem de uma partícula depende de muitas variáveis como: velocidade, diâmetro, umidade de equilíbrio, temperatura e umidade de ar (Arsdel, 1973). Entretanto, bons resultados são encontrados apenas com algumas bactérias lácticas termodúricas, as bactérias mesófilas são muito sensíveis ao processo de atomização (Champagne *et al.*, 1991).

Outro método é o de secagem em estufa com ou sem ar forçado. Apesar de ser um dos métodos mais simples e barato, ele é pouco utilizado para secagem de microorganismos em geral.

2.2.2. Efeitos da secagem nos microorganismos do fermento

Os processos de secagem são normalmente utilizados para promover a preservação e estocagem dos microorganismos na produção de culturas “starters”. O ótimo desempenho das cepas durante o congelamento ou a secagem depende da estabilização de seu potencial de sobrevivência e atividade metabólica (Bâati *et al.*, 2000).

A secagem mais utilizada para lactobacilos é a liofilização e para o fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) é a tecnologia de secagem em leito fluidizado (Champagne e Gardner, 2001) ou em spray drier.

A preservação das culturas microbianas requer familiaridade com técnicas modernas que causem o menor dano possível nas células, e garanta a viabilidade máxima e estabilize o comportamento genótipo (Safronova e Novikova, 1996).

Como outros microorganismos, as bactérias lácticas se confrontam com a diminuição da atividade de água ao longo do período de secagem, acumulando solutos compatíveis como betaína e arnitina. (Hutkins *et al.*, 1987). Acredita-se que esses compostos sejam benéficos para as bactérias lácticas, não somente durante o estresse osmótico, mas também durante a secagem. Os organismos provavelmente não são capazes de acumular solutos compatíveis durante um curto período de secagem, portanto eles devem ser acumulados antes do processo de secagem. Kets *et al.* (1996) mostraram que a adição de betaína num meio osmoticamente estressado protegeu *L. plantarum* e *L. halotolerans* durante a secagem.

Durante todos os processos de secagem de microorganismos também podem ocorrer efeitos indesejáveis como desnaturação de proteínas sensíveis e diminuição de viabilidade para muitos tipos de células. Para se reduzir estes efeitos, substâncias protetoras como leite desnatado, sacarose, polímeros, albumina, mel, polióis e aminoácidos podem ser adicionadas às amostras antes do início de processos de congelamento ou secagem (Leslie *et al.*, 1995).

No processo de liofilização, perda da viabilidade pode ocorrer durante o congelamento, a secagem ou a estocagem. A formação do gelo e o aumento das

concentrações de sal e o processo de desidratação podem ser os responsáveis pelo dano nas membranas das células dos microorganismos (Champagne *et al.*, 1991).

Barber *et al.* (1988) mostraram que na secagem há diferentes graus de sobrevivência entre diferentes lactobacilos. Geralmente, *L. plantarum* é mais resistente que *L. brevis* durante a liofilização. A capacidade de produção de ácidos é o parâmetro mais afetado pela liofilização.

A quantidade de água é um parâmetro importante na estabilidade das culturas secas. Existem alguns estudos sobre a adição de polímeros em microorganismos durante a secagem. Champagne *et al.* (1996) testaram gelatina, maltodextrina e goma xantana. Não houve diferença significativa do grau de sobrevivência. No estudo da estocagem do microorganismo seco, a gelatina teve um efeito positivo na população viável dos microorganismos após 12 meses de estocagem. A adição de polímeros, como a gelatina, pode ajudar no aumento da estabilidade, mas os efeitos não foram maiores quando suplementados com uma base de sacarose e leite.

O processo de secagem pode causar danos na membrana celular dos microorganismos. Apesar de sobreviverem à secagem, alguns microorganismos ficam mais sensíveis a algumas substâncias ou a condições de armazenamento. Na pesquisa de Brennan *et al.* (1986), foi observado que *Lactobacillus acidophilus* que passaram por um processo de secagem ficaram mais sensíveis a oxgall, lisozima e NaCl. Mais de 90% das células que sobreviveram à secagem se tornaram sensíveis a 0,1% de oxgall e 100 µg de lisozima/ML, e perderam a habilidade de formação de colônias; células normais quase não mostraram sensibilidade a estes dois compostos. Neste mesmo estudo, 32% de células normais foram sensíveis a 8% de NaCl; 61 e 87% de células secas (liofilizadas e secas em “vacuum-drier”, respectivamente) mostraram sensibilidade a este composto.

Medidas de fotomicrografias de elétrons de células normais sugerem a presença de um material que recobre toda a superfície da célula. Em células secas, a capa não está presente. No lugar, pedaços de diferentes tamanhos estão presentes. As células secas em “vacuum-drier” comparadas com as liofilizadas, são enrugadas. O desenvolvimento de sensibilidade em bactérias gram-negativas secas a sais biliares e lisozima está relacionado com a destruição dos componentes da parede celular, mais especificamente às moléculas

que normalmente agem como barreira a estes compostos. A sensibilidade de bactérias liofilizadas ou secas em “vacuum-drier” pode estar relacionada ao dano dos componentes das paredes da célula como o mucopeptídeo. Ainda na pesquisa de Brennan *et al.* (1986), o dano da membrana dos *L. acidophilus* que sobreviveram à secagem também é evidente devido ao aumento da sua atividade de β -galactosidase. Células normais têm uma atividade baixa, mas quando essas células são tratadas com tolueno para destruir a membrana citoplasmática (permeabilizada), suas atividades aumentam bastante (atividade total). Atividade aumentada das células secas também está relacionado com destruição da membrana. Entretanto, o fluido sobrenadante das células não tem atividade de β -galactosidase, indicando que o dano não foi severo o suficiente para a liberação das enzimas do citoplasma para o meio.

Nesses estudos, ambos métodos de secagem resultaram em 99% ou mais de perda de viabilidade de *L. acidophilus*, como determinado pela perda de habilidade de formação de colônias. O exame da célula normal e da célula reidratada sobre uma fase contraste no microscópio (aumento de 400 X) revelou a presença de menos de 5% de células fantasmas (células rompidas) nas amostras das células secas. Por outro lado, não foi observado diferença entre as células normais e secas, mesmo quando nas amostras secas mais de 99% das células estavam mortas (Brennan *et al.*, 1986).

É possível assumir que a liofilização e a secagem à vácuo desestabilizam as ligações envolvidas na camada da parede da célula na *L. acidophilus*, resultando numa perda parcial da superfície de proteína. Este estudo também indicou que tanto a liofilização e o “vacuum drier” resultaram em danos na superfície da proteína, parede e membrana. O dano na camada de proteína resultou na perda parcial da célula. O dano na estrutura da parede e membrana não só afetaram suas funções como também os fizeram suscetíveis a alguns tratamentos (Brennan *et al.*, 1986).

É surpreendente como embora na liofilização, as células são expostas ao choque de frio, fase de transição de líquido e cristais de gelo no qual a água é removida por sublimação em contraste ao método de secagem à vácuo que a água é perdida por evaporação, em ambos tipos as células secas têm comprometido a superfície protéica, parede e membrana de forma similar. Nos dois métodos, a água ligada foi removida das

células e isto tem sido associado com o dano das células secas. A água ligada através de diferentes tipos de ligações fracas tem um importante papel na estabilização estrutural e integridade funcional das macromoléculas biológicas, incluindo aquelas presentes na parede e membrana celular. A remoção da água pode desestabilizar sua integridade estrutural, resultando em perda ou prejuízo de suas funções. Pelo menos as moléculas da superfície protéica que estão ligadas à parede celular por pontes de hidrogênio são afetadas pela secagem. A perda de viabilidade das células secas resulta na desestabilização de diferentes estruturas, incluindo a parede e a membrana (Brennan *et al.*, 1986).

Scott e Bernard (1985) mostraram num estudo de resistência de leveduras à secagem, que as leveduras que tiveram a maior resistência foram as cepas *Sacharomyces. S. cerevisiae* teve um $D_{126,7^{\circ}\text{C}}$ acima de 2 minutos e um $D_{132^{\circ}\text{C}}$ de quase 1 minuto.

2.2.3. Uso de agentes protetores em secagem de microorganismos

Durante a secagem, a remoção das ligações de hidrogênio da água, aumenta a probabilidade da ocorrência das interações de Van der Waals. Como resultado, os lipídios podem passar por uma transição de líquido cristalino para a fase gel. Sobre reidratação, membranas secas, que estão em fase gel em temperatura ambiente, passam por uma transição de gel para fase de cristal líquido. Como as membranas passam por essa fase, há regiões com defeito causando furos na membrana. Adicionando dissacarídeos aos microorganismos (como a trealose) antes da secagem, é possível diminuir a temperatura de transição das membranas secas através da reposição de água entre o lipídio, prevenindo a fase de transição e que continua durante a reidratação (Leslie *et al.*, 1995).

Trealose e sacarose têm mostrado que 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).

Um estudo feito pela Universidade de Saskatchewan mostrou que o uso de temperaturas de secagem de fermento biológico acima de 50°C aumentou significativamente a morte das leveduras. Em temperaturas abaixo de 50°C , a taxa de morte é na sua maioria devido à desidratação e não por causa da temperatura. Nesse mesmo

estudo, a secagem até 15% de umidade com ar forçado foi otimizada com a adição de trealose no fermento. Comparado a um fermento seco sem a trealose obteve-se um desempenho superior a 30%. A trealose é um dissacarídeo (glicose-glicose) que atua como protetor hidratante (ou osmoprotetor) de microorganismos (Bobbio e Bobbio, 2003). Os microorganismos utilizam a trealose quando formam esporos ou estão em estado latente, no caso do fermento desidratado a trealose o mantém vivo até ele ser reidratado (Bayrock e Ingledew, 2001).

Trealose e sacarose são capazes de proteger tanto bactérias gram-negativas como gram-positivas. Para os açúcares protegerem a bicamada, é necessário que estejam presentes nos dois lados da membrana. Nas pesquisas de Leslie *et al.* (1995), a trealose e a sacarose protegeram os microorganismos *E. coli* e *B. thuringiensis* quando as bactérias foram reidratadas imediatamente após a secagem, mas apenas a trealose exibiu a capacidade de proteger durante a exposição após a secagem. O autor citou duas possíveis explicações para isso: (1) a trealose pode ser um antioxidante mais efetivo que a sacarose ou (2) estudos prévios tem mostrado a importância da manutenção de materiais biológicos secos no estado vitrificado durante a estocagem. Se, por exemplo, lipossomas secos são aquecidos acima da temperatura de transição vítrea pelo açúcar estabilizante, eles fundem e perdem seus conteúdos para o meio.

Muitos estudos mostram componentes que aumentam a sobrevivência das bactérias lácticas no método de liofilização, mas poucos para a secagem comum com fluxo de ar. A presença de solutos compatíveis no meio, tais como betaína e trealose, aumentam a sobrevivência dos microorganismos no ar forçado. É comprovado que a sobrevivência na secagem comum está associada com um acúmulo intracelular de solutos compatíveis. Este acúmulo é promovido pelas condições estressantes de crescimento, particularmente em resposta à pressão osmótica do meio. Entretanto, a síntese de betaína e trealose não acontece nas culturas lácticas, e estes solutos compatíveis devem ser adicionados no meio de crescimento e ser assimilado para ser efetivo (Kets *et al.*, 1996).

O uso de espessantes (por exemplo: alginatos, goma xantana e goma guar) pode diminuir o tempo de secagem e pode também manter níveis de umidade maiores devido às

suas habilidade de se ligarem à água sem alterar a atividade de água do meio (Champagne e Gardner, 2001).

No trabalho de secagem de *S. cerevisiae*, Bayrock e Ingledew (1997) constataram que a curva de sobrevivência das leveduras com 1% de trealose mostraram maior viabilidade em comparação à curva de controle. Em outro trabalho, foi constatado que usando leite desnatado em combinação com 2 compostos de mel, glutamato de sódio, trealose ou rafinose, fizeram a sobrevivência da *S. cerevisiae* aumentar de 30 para 96-98% (Abadias *et al.*, 2001).

Abadias *et al.* (2001) mostram que o uso de vários agentes protetores pode ser mais efetivo aumentando sua dosagem. Eles utilizaram 4 grupos de agentes e variaram sua dosagem na liofilização de *Candida sake*. Os grupos foram: açúcares (glicose, frutose, galactose, sacarose, lactose e trealose), polióis (glicerol, manitol, sorbitol, adonitol e inositol), polímeros (amido, polietilenoglicol e dextrana) e compostos de nitrogênio (glutamato e peptona). A 1% de concentração todos os aditivos foram inefetivos na conservação. A 5% o melhor agente foi a rafinose, com 13,2% de células viáveis. As melhores sobrevivências foram observadas com 10% de glutamato, rafinose e galactose, 19,8%; 19,1% e 16,6%, respectivamente.

O uso de leite desnatado combinado com outros agentes resultou no aumento da sobrevivência de *C. sake*, porém soluções com 5 ou 10% de leite desnatado não secaram completamente. O melhor resultado foi obtido com 10% de leite desnatado mais 10% de lactose obtendo-se 40% de células viáveis. Acredita-se que as proteínas do leite formam uma capa protetora nas células. A ação de cada agente pode mudar também dependendo do microorganismo estudado variando assim, a quantidade de células viáveis. A adição de substâncias protetoras, como açúcares e gliceróis, reduzem a quantidade de água na superfície das proteínas. Os agentes protetores podem formar pontes de hidrogênio com proteínas na substituição da água com o objetivo de estabilizar a proteína (Abadias *et al.*, 2001).

No trabalho de Safronova e Novikova (1996), o leite desnatado continuou sendo popular obtendo resultados satisfatórios na liofilização de bactérias. Um meio de leite-

sacarose-ácido ascórbico é usado comercialmente com uma solução protetora para liofilização de culturas lácticas (Champagne *et al.*, 1991).

No estudo de Champagne e Gardner (2002), o efeito benéfico da trealose na secagem comum não demonstrou uma proteção superior que a lactose e a sacarose. Duas razões podem explicar isso: primeiro, a trealose não é o único carboidrato que age como soluto compatível; e segundo, o acúmulo de solutos compatíveis é aumentado pelo estresse osmótico.

Os agentes protetores podem ter diferentes ações (Champagne *et al.*, 1991):

- ✓ Polióis: em soluções com água, os polióis aumentam a sobrevivência de *Streptococcus thermophilus* na liofilização, com exceção do manitol, eles oferecem uma proteção menor do que os sólidos do leite. Quando seis polióis são adicionados com leite desnatado e avaliado pelo seu efeito crioprotetivo em 12 cepas de lactobacilos e *Leuconostoc*, mais de 80% da sobrevivência foi obtida com adonitol para 9 das 12 cepas testadas. Infelizmente, o custo do adonitol limita o seu uso industrial. Dulcitol, manitol, m-inositol e sorbitol proporcionaram pouco ou nenhuma proteção quando adicionados ao leite. Glicerol, que é um crioprotetor efetivo e bastante usado em concentrados congelados, proporciona alguma proteção durante a liofilização. Entretanto, o glicerol é líquido em temperaturas normais de estocagem (4°C), e pode não ser útil durante uma secagem.
- ✓ Polissacarídeos: polímeros como polietileno glicol e dextrana aceleram a secagem. Se a adição de compostos específicos influenciam no grau de secagem ou no nível de umidade residual e água disponível, isto pode influenciar na sobrevivência de culturas liofilizadas. Pectina e dextrana aumentam a sobrevivência da maioria dos lactobacilos. A adição de glicogênio não é efetiva.
- ✓ Dissacarídeos: a lactose é um importante agente crioprotetor para bactérias lácticas. Sacarose também pode ser usada com sucesso. Radicais livres têm sido associados com perda de viabilidade de bactéria liofilizada exposta ao ar, açúcares como lactose e sacarose inibem a produção de radicais livres. Polióis e açúcares parecem requerer a presença de pelo menos 5 grupos de hidroxilas para proporcionar

proteção. A adição de substâncias protetoras, reduz a quantidade de ligações de água na superfície das proteínas. Os agentes protetores podem formar ligações de hidrogênio com a proteína, substituindo a água para manter a estabilidade da proteína. Isto deve diminuir o número de grupos polares e apolares da proteína que ficam exposto a uma possível desnaturação que a exposição pode trazer.

- ✓ Aminoácidos, proteínas e seus hidrolisados: aminoácidos como glutamato de sódio, ácido aspártico e cisteína foram usados com sucesso como crioprotetores durante a liofilização. A produção do aminoácido pode ser o resultado de uma reação entre os grupos carboxil das proteínas dos microorganismos e do grupo amino do agente protetor, estabilizando a estrutura da proteína. A cisteína, entretanto, previne a oxidação dos grupos SH para ligações SS. Peptonas, extratos de levedura e proteínas hidrolisadas aumentam a sobrevivência da maioria das cepas, mas são menos efetivos que leite e sacarose.
- ✓ Vitaminas: a vitamina C (ácido ascórbico) é sempre adicionada a um meio em suspensão para liofilização. Isto ajuda aumentar o grau de cobertura. Vitamina C pode, entretanto, ser tóxica às células. Reações com proteínas podem ocorrer, resultando na formação de radicais livres. Na presença de ar, há uma redução da viabilidade da células. Felizmente, a presença de açúcares inibe a formação desses radicais livres. Adição de 1% de extrato de levedura ou 0,03% de vitamina E com leite desnatado proporciona uma preservação efetiva da atividade de *S. lactis* durante a estocagem.

2.2.4. Reidratação dos microorganismos após secagem

A reidratação é um passo importante para o microorganismo seco. Hidratações diretas podem causar em alta mortalidade. O meio e as condições de reidratação irão afetar no contato inicial do microorganismo com o meio. O uso de água como meio para as células secas provoca um efeito considerável na viabilidade dos microorganismos. Neste caso, meios compostos de sacarose, dextrose, e leite desnatado reconstituído melhoram substancialmente a reativação dos microrganismos. É claro que existem variações entre

cepas e espécies. Normalmente o uso de minerais proporciona bons resultados dependendo da cepa (Champagne *et al.*, 1991).

O volume de líquido usado para reidratar uma cultura liofilizada influenciará na sobrevivência de bactérias lácticas, e adicionando grandes quantidades de líquidos parece não ser recomendado. Este efeito é atribuído a um choque osmótico (Champagne *et al.*, 1991).

Segundo Valdez *et al.* (1983), suspensões de bactérias secas normalmente contêm células mortas e células não danificadas como também aquelas subletalmente feridas. O dano pode não levar diretamente à morte desde que estejam num meio apropriado em que as células injuriadas possam se reparar e reiniciar as funções normais (citado por Valdez *et al.*, 1985).

No caso de bactérias lácticas, a complexidade do grupo e a diversidade das reações obtidas mostraram que não é possível fazer generalizações para um único meio de reidratação. Entretanto, o uso de soluções concentradas como 20% de sacarose ou fluidos com alta concentração de sólidos como 10% de leite desnatado promovem a recuperação de lactobacilos mesófilos. Este efeito favorável é provavelmente atribuído à habilidade de alguma soluções em agir como tampões osmóticos, regulando a entrada de água dentro das células (Valdez *et al.*, 1985).

A reidratação de culturas secas em meio líquido acontece dentro de poucos segundos, e desta forma, as células estão sujeitas a mudanças muito rápidas de condição seca para uma mistura de colóides hidratados e soluções aquosas que cobrem a célula viva. A complexidade das mudanças e a velocidade em que ocorrem podem dificultar a medição ou o controle dos eventos que ocorrem (Valdez *et al.*, 1985).

O uso de fermento natural seco hidratável na produção de pães pode simplificar consideravelmente o processo da massa nas padarias. A principal vantagem é que é possível produzir pré-misturas que podem ser usada em qualquer tipo de padaria. Os fermentos naturais secos reidratáveis garantem um padrão alto e uniforme no produto final devido às características da qualidade do fermento natural e a possibilidade de variações de dosagem na receita. Estas são as características que colocam o fermento seco reidratável em um nível

igual com os agentes acidificantes conhecidos. Além disso, devido ao fato de que é possível revitalizar os microorganismos presentes no fermento seco em atividade latente, tais fermentos podem ser reativados de tal forma que eles podem ser usados como “starters” para fermentos naturais (Meuser *et al.*, 1995).

Na literatura, os fermentos secos reativáveis (FSR) são referidos como “fermento na forma seca”. No FSR, algumas das bactérias lácticas presentes no fermento podem estar em atividade latente. Em condições médias, estes microorganismos são capazes de reassumir suas atividades metabólicas na massa, que envolve a produção de ácidos, e podem ser estimulados a crescer e proliferar. Este processo, que é chamado de “reidratação”, pode ser iniciado misturando o FSR com farinha e água e mantendo a massa a uma temperatura boa para a revitalização dos microorganismos (Meuser *et al.*, 1995).

No estudo de Meuser *et al.* (1995), a reidratação do fermento foi feita com 1 parte de fermento seco e 9 partes de farinha e 10 partes de água com aproximadamente 58% de umidade. As massas foram aquecidas a 40°C (banho-maria) e deixadas fermentando por 24 hs (chamado primeiro estágio).

Depois de passado um curto tempo, os microorganismos que são capazes de se revitalizar iniciam suas atividades e, num período razoável de tempo, produz um fermento natural ativo, tendo características típicas da microflora que são desejáveis para o pão com as características de qualidade usuais (Meuser *et al.*, 1995).

Tecnicamente, é interessante notar que o número de microorganismos capazes de revitalizarem é influenciado pelo processo de secagem aplicado e pelo acompanhamento dos parâmetros de secagem. Os processos de secagem bem conhecidos são: secagem pelo ar, por leito fluidizado, secagem de rolos a vácuo e liofilização. A última opção parece ter sido a com melhores resultados de rendimento na habilidade de revitalização dos microorganismos. São encontradas entre 10^3 e 10^8 bactérias lácticas por grama no FSR. A contagem de células pode diminuir com o aumento do tempo de estocagem do FSR (Meuser *et al.*, 1995).

Testes de Meuser *et al.* (1995) mostraram que depois da massa fermentar por 24 horas, novos fermentos foram feitos usando alíquotas do fermento inicial. Neste caso, 5%

de primeiro estágio foi usado no novo. Em contraste ao primeiro estágio, a temperatura usada no 2º foi reduzida de 40°C para 30°C, a temperatura normal de desenvolvimento de fermento natural. Após 24 horas, o terceiro estágio (mais 24 horas) foi feito de forma idêntica ao 2º. Foram avaliados: contagem total de bactérias lácticas e leveduras, acidez total titulável, pH, concentração de ácido láctico, ácido acético e etanol. Os testes foram feitos até o fermento seco ter 6 meses.

Os testes de revitalização mostraram que a proliferação de bactérias lácticas e também tipo e sua performance metabólica não se estabiliza até ter passado por 3 ou 4 refrescos. É importante citar que alguns metabólitos são produzidos na massa como resultado de uma larga variedade de microorganismos que se desenvolvem mais ou menos independentes da massa no primeiro e no segundo estágio. Alguns desses microorganismos freqüentemente dão à massa um odor desagradável que não desaparece até que os microorganismos típicos do fermento natural dominem a atividade metabólica, como um resultado do processo de seleção que os microorganismos estão sujeitos durante a fermentação (Meuser *et al.*, 1995).

Já as leveduras se revitalizaram no primeiro estágio da preparação da massa. A proliferação de leveduras continuou no segundo estágio. O desenvolvimento da contagem de leveduras foi limitado pelo pH (Meuser *et al.*, 1995).

Meuser *et al.* (1995) concluíram que quando os fermentos naturais são secos sob condições favoráveis e controladas, o fermento seco pode ser reativado e usado como “starter” na produção de outros fermentos já que eles contêm bactérias lácticas capazes de serem revitalizadas. É possível usar mais de um tipo de método de secagem (ar quente e liofilização). O ponto importante da secagem é permitir que parte da população de bactérias lácticas passe da transição do estado ativo para latente. Algumas espécies da microflora da farinha podem se desenvolver dependendo das condições de fermentação, uma fermentação espontânea pode ocorrer e danificar o fermento. Isto pode ser evitado se as bactérias lácticas reativadas dominarem rapidamente o desenvolvimento da microflora da massa. Estas condições são normalmente satisfeitas quando a contagem total de bactérias lácticas é 100 vezes maior que a microflora presente na farinha usada na reativação.

A atividade das bactérias lácticas depende do seu estado latente e das condições o nas quais a revitalização acontece. Afim de criar condições adequadas para a revitalização das baterias, uma proporção de uma parte de fermento seco para nove partes de farinha é recomendável, com uma alta temperatura de fermentação nas primeiras 24 horas (40°C) para inibir o desenvolvimento de microorganismos que causam putrefação (Meuser *et al.*, 1995).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATÉRIAS-PRIMAS

3.1.1. Farinha de Trigo

A farinha utilizada no fermento natural, na reativação do fermento seco e nos testes de aplicação foi fornecida pelo Moinho Pacífico. Características da farinha: umidade máxima de 15%, teor de cinzas entre 0,35 e 0,45% e teor de glúten de 8 a 10%.

3.1.1.1. Análises da Farinha

- Umidade: foi determinada em estufa a 105 °C por 5 horas, seguindo o método 6.1.1 das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Volume 1 (1985).
- Teor de cinzas: foi calculado após calcinação das amostras em mufla de 550 a 570°C até as cinzas terem ficado brancas ou ligeiramente acinzentadas e com peso constante segundo o procedimento do método 4.8 das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Volume 1 (1985).
- Teor de glúten: O método utilizado foi 6.1.5 das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Volume 1 (1985) e se baseia na insolubilidade do glúten na água e na propriedade de se aglomerar formando uma massa..

3.1.2. Outros Ingredientes

Segue abaixo os ingredientes que foram utilizados nas etapas de: desenvolvimento do fermento, fabricação do panetone, preparação do fermento para secagem e reidratação do fermento seco.

- Ácido ascórbico – fornecido C.R. Roeper CMBH (Alemanha).
- Açúcar cristal– fornecido pela CIA Energia Santa Elisa.
- Açúcar mascavo – fornecido pela Pró-vida Alimentos Naturais e Integrais.
- Antimofo Comspray – fornecido pela Quality Foods. Princípio ativo: sorbato de potássio.
- Batata tipo inglesa – adquirida no comércio local.

- Beta-caroteno – fornecido pela Roche.
- Caldo de cana-de-açúcar fresco – adquirido no comércio local.
- Essência de panetone – fornecida pela Quest Internacional.
- Estearoil-2-lactil lactato de cálcio – fornecido pela Purac Sínteses.
- Fruta cristalizada – adquirida no comércio local.
- Gemas frescas – adquirida no comércio local.
- Glúten – fornecido pela C.R. Roeper CMBH (Alemanha).
- Goma guar – fornecida pela Saporiti do Brasil.
- Gordura vegetal hidrogenada – fornecida pela Triângulo Alimentos Ltda.
- Iogurte natural – marca Nestlé.
- Leite em pó integral – fornecido pela La Sereníssima.
- Maçã tipo Fuji – adquirida no comércio local.
- Monooleato de sorbitana – fornecido pela Nicron Química Ltda.
- Propionato de cálcio – fornecido pela Nicron Química Ltda.
- Sal refinado iodado – fornecido pela Romani S/A Ind. Com.
- Sorbitol – fornecido pela Quality Foods.
- Uva passa – adquirida no comércio local.

3.2. EQUIPAMENTOS

- Amassadeira de pães de 2 velocidade Kon Zeelandia.
- Analisador de textura TAXT2 (Texture Technologie Corp. Scarsdale NY / Surrey Stable Microsystems, SMS, Godalming, Surrey, UK).
- Autoclave Horizontal Lutz Fernando 39204 capacidade 150 L.
- Estufa para umidade Controlador Modelo A-LT da Fanem.
- Extrusora TECNOPAST tipo BF 6 de Pirâmide Alimentos – Quality Foods.
- Homogeneizador de laboratório Stomaker 400.
- Estufa de cultura bord CONSUL NOVA TÉCNICA NT 705 (temperatura de 10 a 50°C).
- Phmêtro B374 da Micronal
- Secador de bandejas (Proctor & Schwartz / Inc / Philadelphia, PA, USA).
- Spray Drier Niro Atomizer / capacidade de secagem 2 Kg água por hora.
- Fatiadeira – marca Almac.

3.3. REAGENTES

- Nutriente de fermento: cloreto de amônio, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio.
- Análises microbiológicas: água peptonada (0,1%), meio de cultura Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) da Difco e APT Ágar da Difco.

3.4 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO

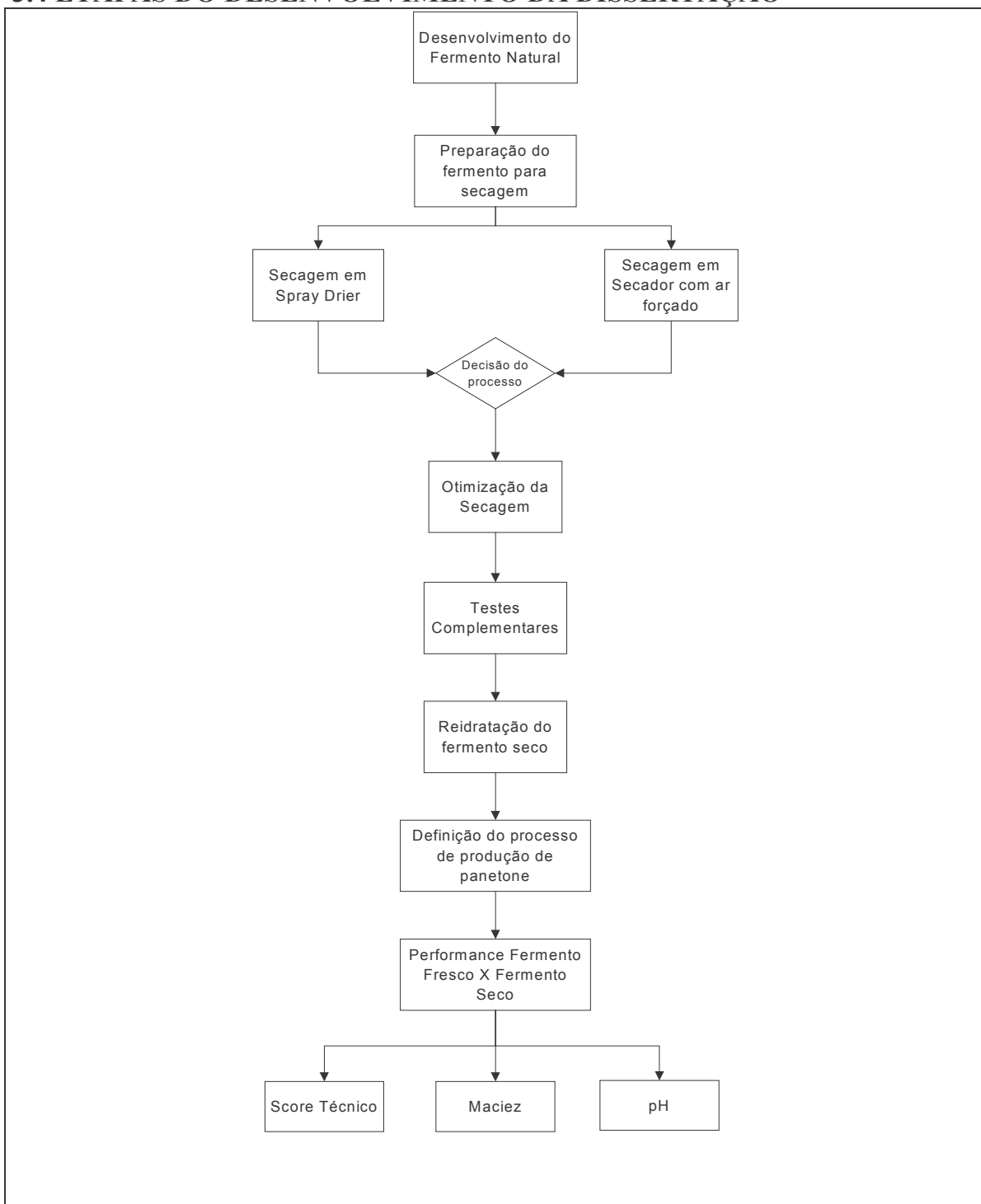


FIGURA 4 – Etapas do Desenvolvimento da Tese

A Figura 4 mostra a seqüência cronológica das atividades realizadas neste trabalho.

3.5. DESENVOLVIMENTO DO FERMENTO NATURAL

O desenvolvimento do fermento natural consistiu na preparação de três fermentos naturais e no acompanhamento do seu desempenho na fabricação de panetones. Segue abaixo os fermentos testados:

- Fermento obtido a partir de batata (tipo inglesa) e iogurte natural (ANEXO 2)
- Fermento obtido a partir de caldo de cana de açúcar (ANEXO 3)
- Fermento obtido a partir de maçã (tipo Fuji) e açúcar mascavo (ANEXO 4)

3.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SECAGEM

3.6.1. Secagem em “Spray Drier”

O fermento foi diluído em água em diferentes porcentagens para a determinação da vazão (de 18,4 a 26% de sólidos). A pressão de atomização foi de 3,85 Kg/cm². A temperatura de entrada variou entre 200 a 250°C e a de saída de 55 a 62°C. O tempo de residência da amostra no equipamento foi de 2 a 4 segundos.

3.6.2. Secagem em Secador de bandejas com ar forçado

O fermento natural foi misturado com farinha de trigo para obter a consistência e a umidade (máximo 30%) necessárias para o produto passar pela extrusora de macarrão.

O preparo dos fermentos tiveram início aproximadamente 24 horas antes da secagem. O fermento foi misturado com água, farinha, sorbitol, sacarose e goma guar (apenas nos testes finais). Antes do início da secagem o produto foi extrudado em extrusora de macarrão numa taxa de compressão 1:1 com uma matriz de diâmetro de 0,8 mm e comprimento de aproximadamente 1 a 2 cm.

3.7. EXPERIMENTOS DE SECAGEM DO FERMENTO NATURAL

3.7.1 Testes Iniciais

3.7.1.1 Spray Drier

- *Equipamento Niro Atomizer*
Capacidade de secagem 2 Kg água / hora

Manômetro do atomizador – 3,85 Kg/cm²

Tempo de residência – 2 a 4s

- *Preparação do fermento para secagem do Teste 1*

40% de água

60% de fermento (com média de 57% de umidade)

% de sólido da mistura – aproximadamente 26%

- *Preparação do fermento para secagem do Teste 2*

Diluição 1

40% de água / 60% de fermento (com média de 57% de umidade)

% de sólidos da mistura – aproximadamente 26%

Diluição 2

57,15% de água / 42,85% de fermento

% de sólidos da mistura – aproximadamente 18,43%

3.7.1.2 Secador de bandejas com ar forçado.

O processo de secagem foi determinado pela sua umidade final. O intervalo de umidade foi de 12 a 15%. A bandeja de tela (dimensão: 73 X 48 cm) foi forrada com papel manteiga e foi colocado 1.200 g de fermento extrudado em cada uma. A temperatura de secagem foi 40°C com uma variação máxima de $\pm 3^\circ\text{C}$. A velocidade do ar pôde ser controlada apenas pelas aberturas laterais do equipamento e a temperatura foi controlada por duas resistências.

3.7.2. Otimização da secagem

Para a otimização o processo de secagem foi aplicado um planejamento experimental completo 2³. Através do planejamento foi possível estudar os efeitos da temperatura (°C), do sorbitol (%) e da sacarose (%) (Tabela 4). As variáveis foram estabelecidas com três níveis codificadas três níveis como -1, 0 e +1 e dois níveis de variáveis axiais codificadas como - α e + α . O valor de α é função do número de variáveis independentes K, sendo definida pela seguinte equação:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,682 \quad (I)$$

TABELA 4 - Níveis das variáveis independentes do Planejamento Experimental

Variáveis	- 1,682	-1	0	+1	+1,682
T – Temperatura (°C)	18,55°C	24°C	32°C	40°C	45,45°C
SR - Sorbitol (%)	0%	2%	6%	10 %	12,73%
SA - Sacarose (%)	0%	1%	3%	5%	6,36

O planejamento teve também três pontos centrais de nível zero para a estimativa do erro experimental e determinação da precisão da equação polinomial. A faixa de variação do planejamento foi estabelecida através de testes preliminares e dados de literatura. As variáveis resposta foram: o tempo de secagem, a contagem das células viáveis de leveduras e de bactérias lácticas (Tabela 5).

TABELA 5 – Variáveis do Planejamento Experimental 2³

Variáveis Independentes	Variáveis dependentes (respostas)
Temperatura de Secagem (T)	Tempo de Secagem (TS)
% de Sorbitol (SR)	Contagem de células Viáveis de Leveduras (CL)
% de Sacarose (SA)	Contagem de células Viáveis de Bactérias Lácticas (CB)

TABELA 6- Delineamento Experimental

Exper. N°	TP	SR	SA
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,682	0	0
13	+1,682	0	0
14	0	-1,682	0
15	0	+1,682	0
16	0	0	-1,682
17	0	0	+1,682

3.7.3. Variáveis dependentes

As variáveis dependentes (Tabela 5) ou também chamadas variáveis resposta definidas no planejamento foram: tempo de secagem (TS), contagem de células viáveis de bactérias lácticas (CB) e contagem de células viáveis de leveduras (CL).

3.7.3.1. Determinação do Tempo de Secagem

O tempo de secagem foi definido através da umidade final do fermento seco. A definição da umidade final desejada se baseou no estudo de Bayrock e Ingledew (1997) e na umidade média do ingrediente predominante, neste caso a farinha de trigo. O trabalho em questão mostrou que a sobrevivência de leveduras durante uma secagem teve o declínio acentuado quando a umidade atingiu valores abaixo de 15%. O uso de uma umidade acima de 15% poderia afetar a estabilidade do fermento seco, pois a farinha de trigo - matéria-prima predominante – tem uma média de umidade entre 12 a 15%. Foi definido que a faixa de umidade final deveria ficar entre 12 a 15%. A resposta do tempo de secagem para cada teste foi definida através de testes de umidade das amostras de fermento que foram coletadas do secador de 30 em 30 minutos.

A análise da umidade das amostras foi realizada em duplicada em estufa a 150°C por 3 horas.

3.7.3.2. Determinação da Contagem de Células Viáveis das Bactérias Lácticas

Para a contagem de células viáveis foi utilizado 25 g de fermento seco. O fermento foi homogeneizado em 225 ML de água peptonada durante 30 segundos. Todas as análises foram feitas com cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}) e o intervalo entre a homogeneização e a preparação das diluições não ultrapassou 3 minutos. Inoculou-se 1ML de cada diluição em placas de petri estéreis vazias, adicionando, em seguida, o meio de cultura APT ágar. As placas foram incubadas invertidas a 30°C em atmosfera microaerófila por 72 horas. As colônias desenvolvidas foram contadas e analisadas em exame microscópico por coloração de Gram para confirmação. O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônias por grama de fermento (U.F.C./g)

3.7.3.3. Determinação da Contagem de Células Viáveis das Leveduras

Para a contagem de células viáveis das leveduras foi utilizado 25 g de fermento seco. O fermento foi homogeneizado em 225 ml de água peptonada durante 30 segundos. Todas as análises foram feitas com cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}) e o intervalo entre a homogeneização e a preparação das diluições não ultrapassou 3 minutos. Inoculou-se 0,1ml de cada diluição em placas de petri previamente preparadas com meio de cultura rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. As colônias desenvolvidas foram contadas e multiplicadas por 10. O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônias por grama de fermento (U.F.C./g).

3.8. APLICAÇÕES DO FERMENTO SECO

3.8.1. Reidratação do fermento seco

O processo de reidratação foi baseado na fórmula de fermento líquido de El Dash *et al.* (1982) e adicionado de leite em pó em diferentes concentrações. A análise do crescimento dos microorganismos foi feita com 12, 24 e 30 horas de fermentação.

3.8.2. Definição do processo de produção de Panetone

Após a definição do melhor fermento seco, iniciaram-se os testes para definir o melhor processo de fabricação. Os testes tiveram variações na dosagem do fermento, na receita e no processo. A Figura 5 mostra o processo utilizado na fabricação dos panetone deste trabalho.

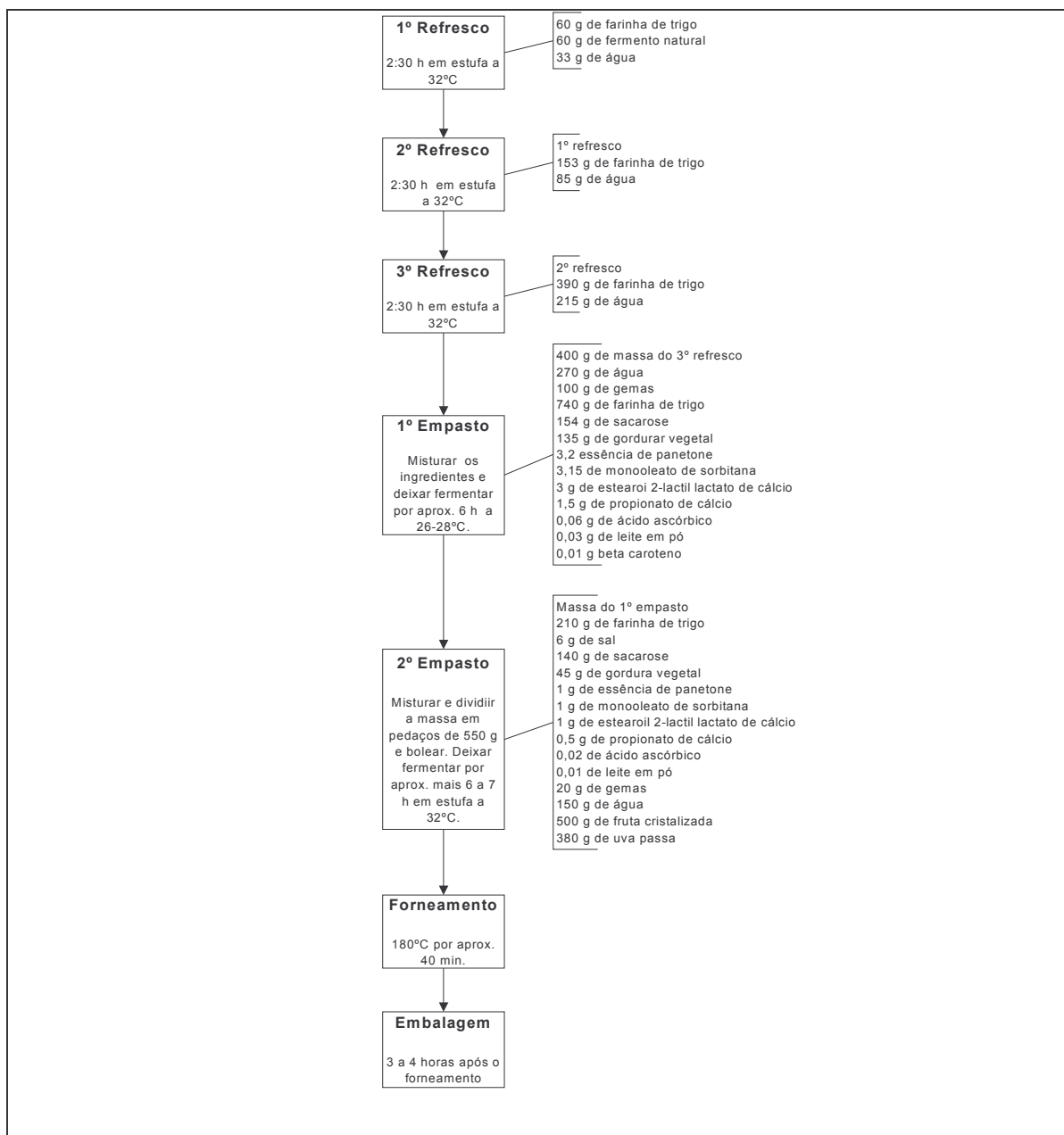


FIGURA 5 – Fluxograma do processo de fabricação do Panetone

3.8.3. Comparação da performance dos Panetones

Depois da definição do processo de produção do panetone feito com fermento natural seco, foi realizada a produção dos panetones feitos com fermento natural fresco (padrão) e fermento natural seco. Após a fabricação, os panetones foram analisados e comparados visualmente e sensorialmente.

3.8.3.1 Score Técnico

Com o objetivo de pontuar o panetones do ponto de vista técnico, foi utilizado um modelo modificado de pontuação baseado em El-Dash *et al.* (1982) para pão. Os valores máximos dos pesos de algumas variáveis foram alterados para a obtenção uma maior adequação na análise do panetone (Tabela 7). A cor da crosta que tinha peso 10 passou a ter peso 5, pois a cor da crosta é menos importante no panetone do que em pão francês; a estrutura do miolo (fibrosidade) teve um aumento de peso de 10 para 15 e o aroma passou de peso 15 para 20 pois estas duas últimas características são as que mais caracterizam o produto em questão. A avaliação foi realizada por uma equipe sensorial de 6 provadores previamente treinados com os padrões de valor mínimo e máximo de cada característica analisada.

TABELA 7 – Score Técnico para análise de amostras de Panetone

Características Externas	Valor Máximo
1 – Volume (volume específico X 3,33)	20
2 – Cor da crosta (fatores indesejáveis: não uniforme, muito clara, muito escura)	5
Características Internas	Valor Máximo
1 – Características da Crosta (fatores indesejáveis: borrachenta, quebradiça, muito grossa, muito fina)	5
2 – Cor do miolo (fatores indesejáveis: muito branco ou muito marrom)	10
3 – Estrutura do miolo (fibrosidade)	15
4 – Umidade do miolo (fatores indesejáveis: muito seco)	10
Aroma e Gosto	Valor Máximo
Aroma (fatores indesejáveis: falta de aroma, aroma desagradável, estranho)	20
Gosto (fatores indesejáveis: muito ácido, estranho)	15
Contagem Total	100

3.8.3.2 Análise da Maciez

Para a quantificação e comparação da maciez do panetone com fermento seco em relação ao padrão, eles foram avaliados em texturômetro durante 70 dias. Após a

fabricação, os panetones foram avaliados no primeiro dia e na sequência de 10 em 10 dias até ter completado 80 dias da data de fabricação.

O procedimento adotado foi semelhante ao de medição de maciez de pão de forma. As formas de papel do panetone foram retiradas e o panetone foi fatiado em fatiadeira como pão de forma no sentido transversal. Para medição foram utilizadas duas fatias (4° e 5° de baixo para cima).

TABELA 8. Parâmetros utilizados na medição

Parâmetros	Dados
“Probe”	P35
“Pré-speed”	2,0 mm/s
“Speed”	1,0 mm/s
“Post-speed”	10,0 mm/s
Distância	9,4 mm
Distância “probe”	400 mm

3.8.3.3 Determinação do pH do miolo

A leitura do pH foi realizada 7 dias após a fabricação. Para a medição, misturou-se 15 g do miolo do panetone (sem frutas e uvas passas) com 85 g de água e peneirou-se a mistura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do fermento natural

As receitas de fermento natural foram preparadas e os testes tiveram início duas semanas após sua preparação. No teste inicial dos fermentos, o de caldo de cana de açúcar e o de maçã com açúcar mascavo não tiveram um crescimento desejável e o fermento de batata e iogurte atingiu um bom crescimento, mas ainda não o desejável.

Na terceira semana, os três fermentos já estavam mais fortes, porém o melhor tempo de fermentação foi do fermento de batata e iogurte.

Os critérios avaliados no fermento foram: tempo de fermentação (força do fermento), sabor e aroma do panetone. Como o fermento de batata e iogurte teve o melhor desempenho (ANEXO 2), ele foi o escolhido para ser utilizado na próxima etapa do trabalho. Após a seleção do fermento natural, foi avaliada a formulação da receita do panetone para se atingir boa maciez, sabor e crescimento.

4.2. EXPERIMENTOS DE SECAGEM DO FERMENTO NATURAL

4.2.1. Testes Iniciais

4.2.1.1. “Spray Drier”

Seguem abaixo o resultados dos testes iniciais em equipamento “Spray drier”:

- Resultados do Ensaio 1

Depois de 20 minutos de funcionamento, a bomba parou de puxar o produto. A bomba esquentou muito e acabou acelerando a formação de gases do fermento e a solução começou a espumar.

Com a quantidade de amostra que se obteve, foi possível apenas calcular a umidade e análise microbiológica. Coletou-se 2 amostras: uma que saiu do spray e uma que ficou grudada na parede da câmara de secagem.

- Resultados do Ensaio 2

1º Tentativa – diluição 1 numa vazão de 1,715 Kg / h numa mangueira de 2mm para bombear no bico atomizador. A mistura estava muito viscosa para passar pela mangueira.

2º Tentativa – diluição 1 numa vazão de 2,24 Kg / h e a mangueira fina foi substituída por uma mangueira de 7mm. A vazão e a viscosidade ficaram muito altas e a mistura começou acumular na parede do spray.

3º Tentativa – diluição 2 numa vazão inferior a anterior (2 Kg / h) na mesma mangueira grossa. Após um tempo o produto começou acumular nas paredes como na tentativa anterior.

4º Tentativa – diluição 2 numa vazão de 1,63 Kg / h numa mangueira de diâmetro intermediário (5 mm de diâmetro interno). O produto secou de forma satisfatória. Média: 4,6 g de fermento em pó / minuto.

TABELA 9 – Resultado de umidade e análise microbiológica das amostras de fermento em pó

Ensaio	Amostra	Umidade (%)	Contagem de Bolores e Leveduras (UFC/G)	Contagem Bactérias Lácticas (UFC/G)
1	1	7,8	$5,4.10^5$	$2,0.10^5$
1	2	6,7	$6,1.10^6$	$1,4.10^6$
2	3	7,76	$1,4.10^4$	$9,9.10^3$

Constatou-se que no decorrer da secagem, o amido da composição do fermento começou a gelatinizar no disco rotativo atomizador deixando a mistura de fermento e água altamente viscosa, atrapalhando a sua secagem. Durante a secagem formou-se uma camada espessa de fermento incrustada na parede do equipamento que não secou durante a atomização.

No trabalho de Bayrock e Ingledew (2001), a contagem de células viáveis de leveduras após uma secagem foi extremamente afetada por umidades abaixo de 15%. Apesar da referência de Bayrock e Ingledew, neste trabalho a umidade final desejada inferior a 12-15%, pois utilizou-se a faixa de umidade estável da farinha de trigo.

4.2.1.2. Secador de ar forçado

- Preparação da amostra :

Em uma amostra de fermento foi adicionado 18% de farinha de trigo e em outra, 18% de farinha mais 3% de sorbitol. O objetivo do uso de sorbitol foi verificar sua ação protetora durante a secagem conforme mostrou Abadias *et al.* (2001) na liofilização de *Candida sake* em que 1%, 3% e 10% sorbitol tiveram respectivamente a sobrevivência em 0,6%, 2,6% e 13%.

- Secagem

O tempo de secagem para as duas amostras foi de 2:30 hs. Segue a baixo os resultados de sobrevivência dos microorganismos durante a secagem. O preparo dos fermentos tiveram início aproximadamente 24 horas antes da secagem. O fermento foi misturado com água, farinha, sorbitol, sacarose e goma guar (apenas nos testes finais). Antes do início da secagem o produto foi extrudado em extrusora de macarrão numa taxa de compressão 1:1 com uma matriz de diâmetro de 0,8 mm e comprimento de aproximadamente 1 a 2 cm.

TABELA 10 – Sobrevivência dos microorganismos durante a secagem em secador de ar forçado

Etapas do Processo	Contagem de Bac. Lácticas (UFC/g)	Contagem de Leveduras (UFC/g)	Proporção Bac. Láctica:Lev.	Umidade (%)*
Fermento natural fresco	$1,3 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	0,42	57
Fermento natural + farinha de trigo (antes extrusão)	$3,3 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^7$	0,15	32,6
Mistura de fermento natural + farinha (depois extrusão)	$7,1 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^6$	9,34	32,3
Mistura de fermento natural + farinha + sorbitol (depois extrusão)	$9,4 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$	62,60	32,3
Fermento sem sorbitol após secagem	$8,8 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$	0,04	16,2
Fermento com sorbitol após secagem	$< 10^4$	$9,0 \cdot 10^5$	0,01	15,90

(*) valores obtidos em duplicata.

As análises microbiológicas mostraram que é possível obter resultados tão bons quantos os obtidos na secagem em spray num processo mais simples. O sorbitol teve um efeito protetor na sobrevivência dos microorganismos durante o processo de secagem. As bactérias tiveram uma sobrevivência 13,6% superior em comparação a amostra sem sorbitol e as leveduras tiveram um acréscimo de 275% na sobrevivência. O tempo de secagem não foi suficiente para as amostras atingirem uma umidade abaixo de 15%, seria necessário pelo menos mais 30 a 60 minutos de secagem.

Durante todo o processo notou-se que a proporção bactérias lácticas:leveduras variou bastante. Martinez-Anaya *et al.* (1990), Gobbetti (1998) e Gobbetti *et al.* (1994) mostraram que a proporção entre as bactérias e leveduras influenciam nas suas interações e por consequência podem alterar as características finais do pão como aroma, gosto, maciez, dentre outros.

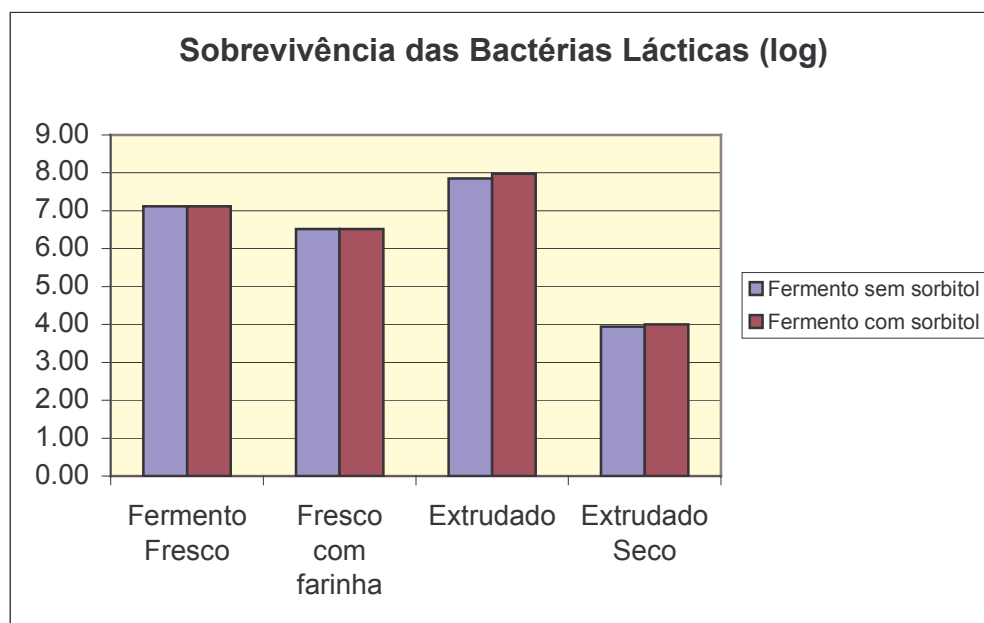


FIGURA 6 – Gráfico da sobrevivência das Bactérias Lácticas durante o processo de secagem.

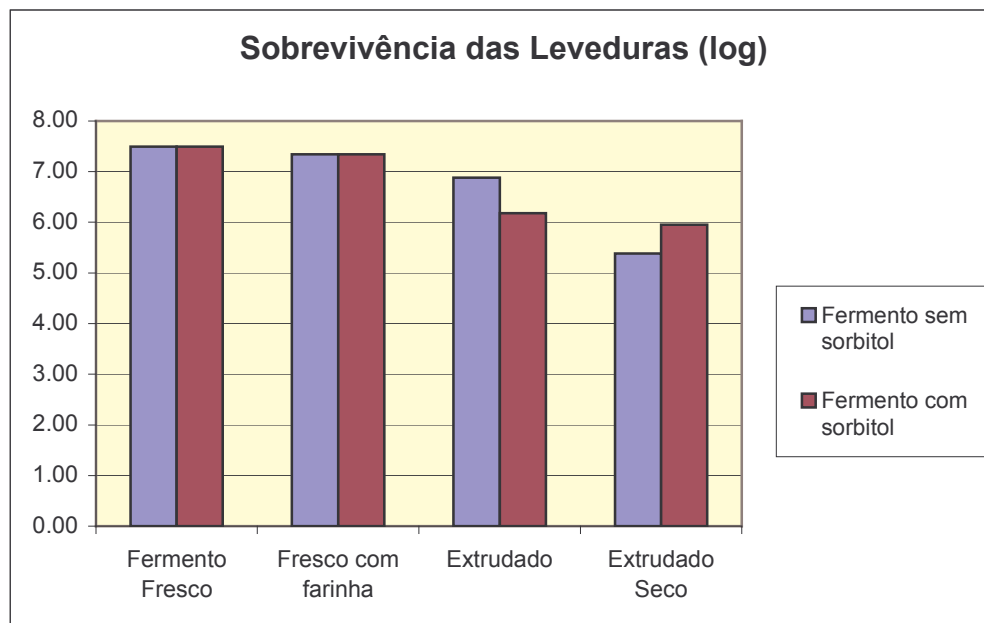


FIGURA 7 – Gráfico da sobrevivência das Leveduras durante o processo de secagem

Para a montagem do planejamento experimental utilizou-se a sacarose como mais um agente protetor. O trabalho de Abadias *et al.* (2001) estudou a ação de vários agentes protetores durante a liofilização *Candida sake*. A sacarose em uma dosagem de 10% proporcionou um aumento de 12.5% na sua sobrevivência.

4.2.2. Planejamento Experimental

4.2.2.1 Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas um dia antes da secagem. Todos os testes foram adicionados de 165% de farinha de trigo e 40% de água sobre o fermento fresco. O sorbitol e a sacarose tiveram suas dosagens variando conforme o planejamento montado.

4.2.2.2. Análise do Tempo de Secagem

TABELA 11 – Resultados das Umidades e do Tempo de Secagem obtidas nos experimentos do planejamento.

Ensaio	Temperatura °C	Umidade (%)	Tempo Secagem (h)
1	24	13,22	7:00
2	40	13,31	3:30
3	24	14,52	7:30
4	40	13,35	3:30
5	24	14,09	7:30
6	40	13,16	3:30
7	24	15,00	7:30
8	40	12,87	2:30
9	32	13,80	5:30
10	32	14,98	5:30
11	32	13,39	5:30
12	18,5	14,00	10:00
13	45,4	13,13	2:30
14	32	12,75	4:30
15	32	13,30	5:00
16	32	13,37	5:00
17	32	12,84	4:30

(*) valores de umidade obtidos em duplicata.

A Tabela 11 apresenta as umidades obtidas para cada ensaio do planejamento e a variável resposta “Tempo de secagem”. As maiores temperaturas de secagem resultaram em menores tempos de secagem.

TABELA 12 - Coeficientes de Regressão para Tempo de Secagem (TS)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (residual)	t(7)	p
Média	5,50*	0,12	44,92	0,0000
Temperatura (L)	-2,13*	0,06	-37,11	0,0000
Temperatura (Q)	0,28*	0,06	4,47	0,0029
Sorbitol (L)	0,025	0,06	0,43	0,6770
Sorbitol (Q)	-0,25*	0,06	-3,92	0,0057
Sacarose (L)	-0,01	0,06	-1,71	0,1311
Sacarose (Q)	-0,25*	0,06	-3,92	0,0057
Temp (L) X Sorb (L)	-0,19*	0,08	-2,50	0,0411
Temp (L) X Sac (L)	-0,19*	0,08	-2,50	0,0411
Sorb (L) X Sac (L)	-0,19*	0,08	-2,50	0,0411

Obs: valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Os fatores sorbitol (L) e sacarose (L) não foram significativos a 90% de confiança (Tabela 12).

TABELA 13 - Coeficientes de Regressão ajustados para Tempo de Secagem (TS)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (residual)	t(9)	P
Média	5,50	0,13	42,38	0,0000
Temperatura (L)	-2,13	0,06	-35,01	0,0000
Temperatura (Q)	0,28	0,07	4,21	0,0023
Sorbitol (Q)	-0,25	0,07	-3,70	0,0050
Sacarose (Q)	-0,25	0,07	-3,70	0,0050
Temp (L) X Sorb (L)	-0,19	0,08	-2,36	0,0428
Temp (L) X Sac (L)	-0,19	0,08	-2,36	0,0428
Sorb (L) X Sac (L)	-0,19	0,08	-2,36	0,0428

Obs: valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Os fatores não significativos foram ignorados e os coeficientes de regressão foram ajustados para o Tempo de secagem (Tabela 13).

TABELA 14 – Tabela ANOVA para o Tempo de Secagem (TS)

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado (0.90; 7; 9)}
Regressão	66,0	7	9,4	184	2,51
Resíduos	0,46	9	0,05		
Falta de ajuste	0,46	7			
Erro puro	0,00	2			
TOTAL	66,5	16			

% variação explicada (R^2) = 0,99314

A Tabela 14 (ANOVA) mostrou que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 184, isto é, 73,3 vezes maior que o valor de F_{tabelado} , indicando que o modelo obtido é estatisticamente significativo e preditivo para as secagens testadas. Desta forma, o tempo de secagem pode ser estimado em função da temperatura de secagem, do sorbitol e da sacarose.

TABELA 15 – Tempo de Secagem Real X Tempo de Secagem Preditivo

Nº Exp	Tempo de Secagem Real	TS Preditivo (mod. cod.)	Desvio (mod. cod)	TS Preditivo (mod. real)	Desvio (mod. real)
1	7,50	6,81	2,71	7,20	-2,87
2	3,50	3,37	3,71	3,73	-6,71
3	7,50	7,57	-0,93	7,77	-3,58
4	3,50	3,37	3,71	3,41	2,66
5	7,50	7,57	-0,93	7,73	-1,32
6	3,50	3,37	3,71	3,85	-9,91
7	7,50	7,57	-0,93	7,60	-3,13
8	2,50	2,61	-4,40	2,81	-12,60
9	5,50	5,50	0,000	5,19	5,55
10	5,50	5,50	0,000	5,19	5,55
11	5,50	5,50	0,000	5,19	5,55
12	10,00	9,81	1,76	9,72	2,78
13	2,50	2,76	-10,41	2,76	-10,32
14	4,50	4,79	-6,51	4,76	-5,84
15	5,00	4,79	4,14	4,84	3,16
16	5,00	4,79	4,15	5,19	-3,89
17	4,50	4,79	-6,509	5,16	-14,62

A Tabela 15 mostrou que os maiores desvios foram identificados nos menores tempos de secagem, por serem valores menores, o valor do desvio é mais evidente mesmo com variações pequenas. O desvio médio do modelo codificado foi 3,21% e com o modelo real foi de 5,88%. Para o cálculo da regressão com os valores reais foram utilizados os fatores significativos da regressão codificada.

Equação com os valores codificados:

$$TS = 5,5 - 2,1 * T + 0,28 * T^2 - 0,25 * SR - 0,25 * SA - 0,19 * T * SR - 0,19 * T * SA - 0,19 * SR * SA \quad (2)$$

Equação com os valores reais:

$$TS = 22,86 - 0,90 * T + 0,011 * T^2 - 0,014 * SR - 0,087 * SA - 0,0033 * T * SR - 0,014 * T * SA - 0,021 * SR * SA \quad (3)$$

A partir deste modelo foi possível obter a superfície de resposta que permite visualizar as melhores condições de temperatura de secagem (T), porcentagens de sorbitol (SR) e sacarose (SA).

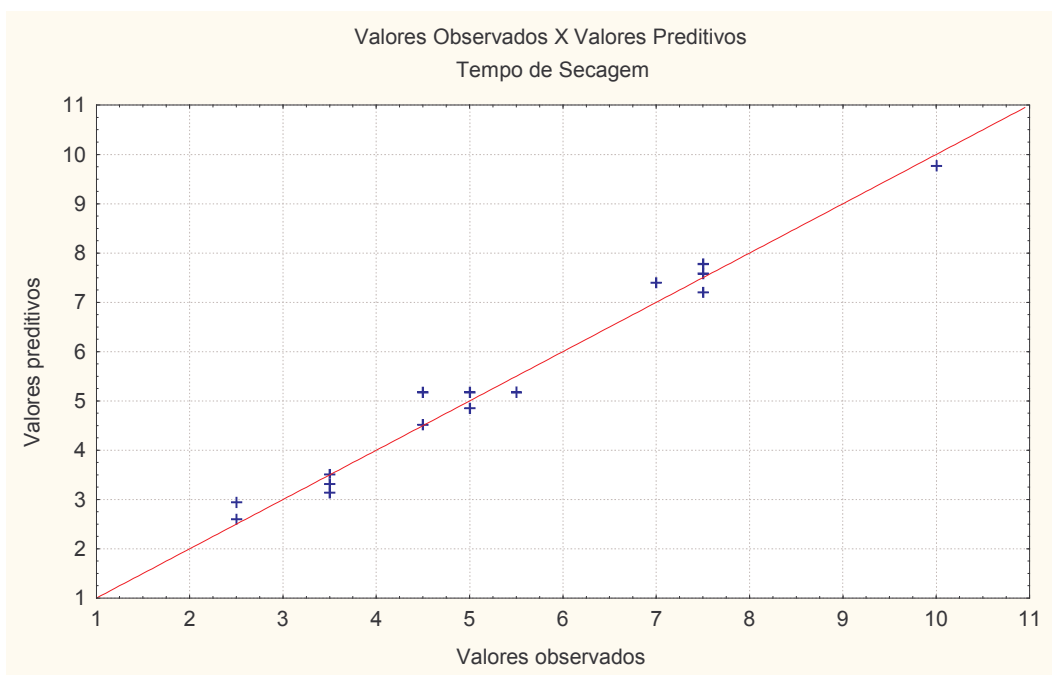


FIGURA 8 – Tempo de Secagem observado (h) X Tempo Preditivo

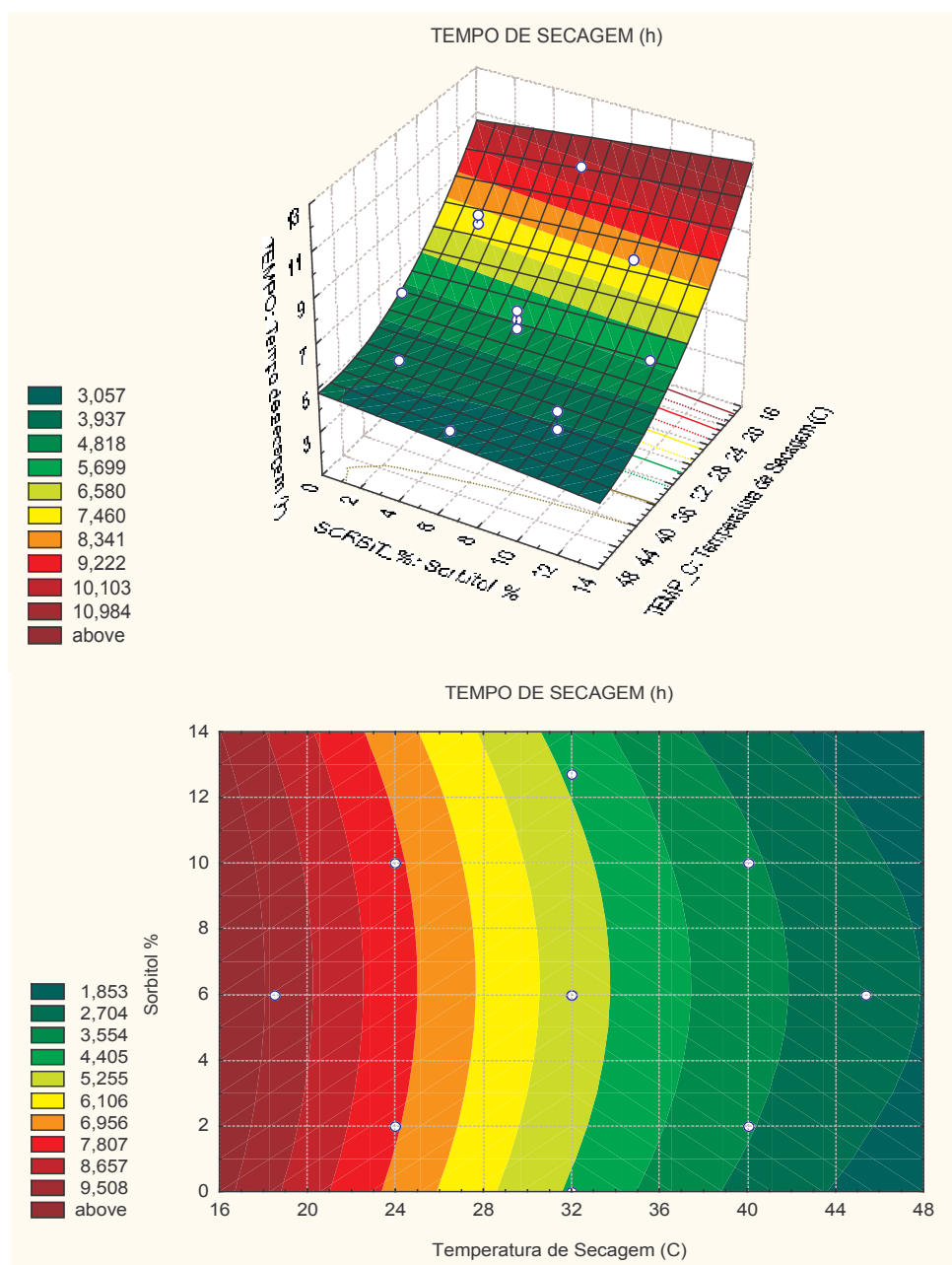


FIGURA 9 – Efeito da Temperatura de Secagem e o Sorbitol no Tempo de Secagem do fermento

Pela análise da Figura 9 observa-se que o Tempo de Secagem (TS) é regido basicamente pela temperatura de secagem. A variação de dosagem do sorbitol não influenciou no tempo de secagem. Quanto maior a temperatura, menor foi o tempo de secagem.

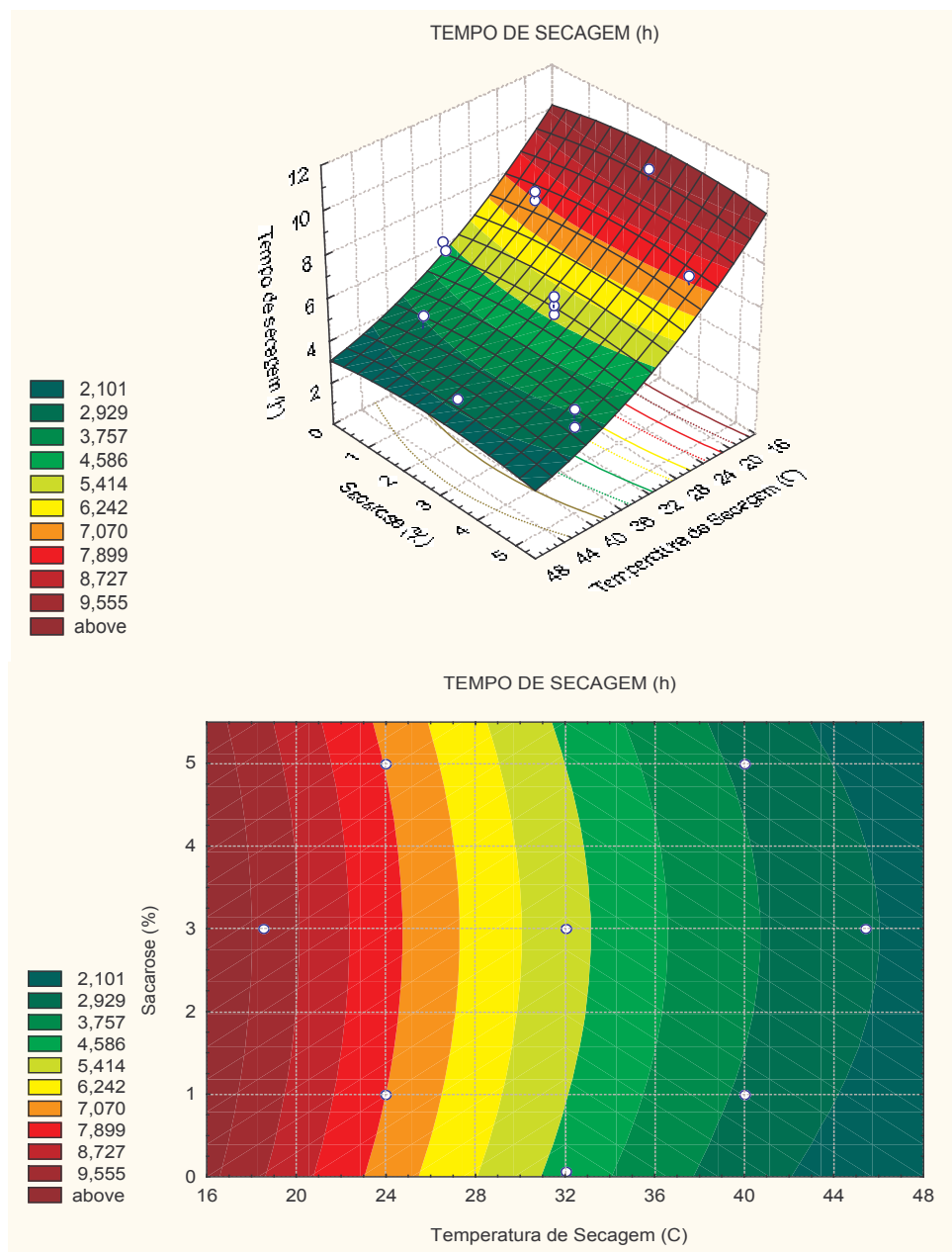


FIGURA 10 – Efeito da Temperatura de Secagem e a Sacarose no Tempo de Secagem do fermento

A Figura 10 mostra que da mesma forma que o sorbitol, a sacarose não influenciou no tempo de secagem do fermento.

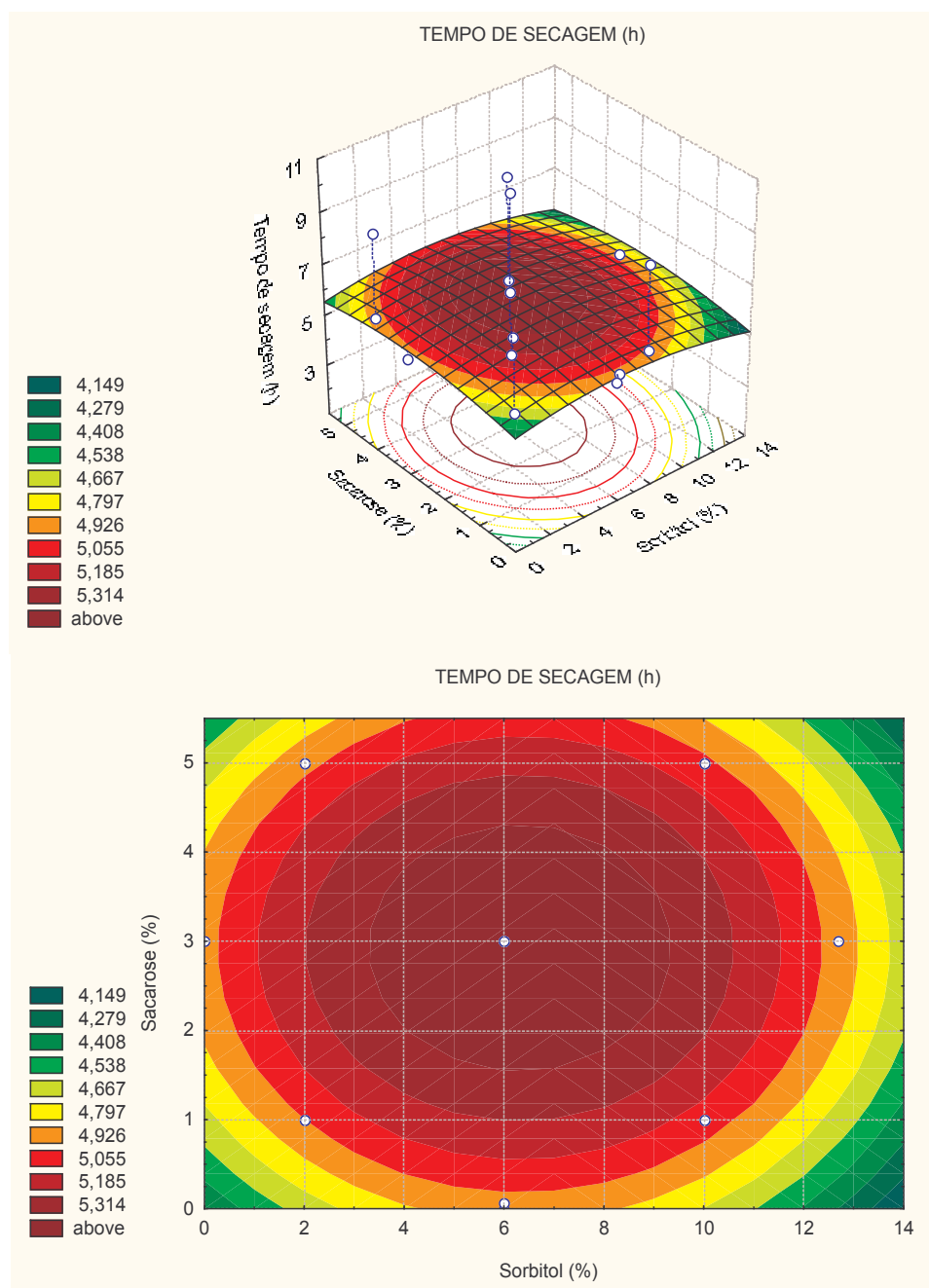


FIGURA 11 – Efeito do Sorbitol e da Sacarose no Tempo de Secagem do fermento

A Figura 11 mostra que o tempo de secagem teve a tendência a ser menor nos valores máximos de sorbitol e máximo e mínimo de sacarose. É desejável que o tempo de secagem não seja alto, porém é necessário avaliar os outros resultados de sobrevivência, pois o sorbitol e sacarose podem estar fazendo o papel de agentes protetores durante a secagem.

4.2.2.3. Análise da Contagem de Células Viáveis de Bactérias Lácticas

A Tabela 16 mostra que o ensaio 1 apresentou maior sobrevivência das bactérias lácticas.

TABELA 16 – Resultados das Contagem de Bactérias Lácticas nos experimentos do planejamento.

Ensaio	Temperatura °C	Contagem B.L. (UFC/g)
1	24	$3,8.10^4$
2	40	<10
3	24	$7,0.10^3$
4	40	$1,0.10^1$
5	24	$3,0.10^4$
6	40	<10
7	24	$1,3.10^4$
8	40	$6,0.10^3$
9	32	<10
10	32	$2,0.10^1$
11	32	<20
12	18,5	$2,9.10^3$
13	45,4	$5,0.10^1$
14	32	<10
15	32	<10
16	32	<10
17	32	$1,4.10^2$

Os valores de contagem de bactérias lácticas foram apresentados como log para que fosse possível alcançar uma melhor linearidade dos valores.

TABELA 17 – Coeficientes de Regressão para Contagem de Bactérias Lácticas (CB)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (erro puro)	t(2)	p
Média	3,25*	0,79	4,13	0,054
Temperatura (L)	-2,23*	0,37	-6,01	0,0265
Temperatura (Q)	1,44*	0,41	3,53	0,0717
Sorbitol (L)	0,28	0,37	0,76	0,5241
Sorbitol (Q)	0,15	0,41	0,37	0,7452
Sacarose (L)	1,10*	0,37	2,98	0,0963
Sacarose (Q)	1,02*	0,41	2,52	0,1282
Temp (L) X Sorb (L)	1,12*	0,48	2,31	0,1475
Temp (L) X Sac (L)	0,75	0,48	1,55	0,2604
Sorb (L) X Sac (L)	0,91	0,48	1,87	0,2018

Obs: valores estatisticamente significativos a 85% de confiança ($p < 0,15$).

Os fatores sorbitol (L) e (Q), Temp(L) X Sac(L) e Sorb(L) X Sac (L) não foram significativos a 85% de significância (Tabela 17).

TABELA 18 – Coeficientes de Regressão ajustados para Contagem de Bactérias Lácticas (CB)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (erro puro)	t(2)	p
Média	3,45	059	5,83	0,282
Temperatura (L)	-2,23	0,37	-6,01	0,0265
Temperatura (Q)	1,39	0,39	3,58	0,0699
Sacarose (L)	1,10	0,37	2,98	0,0963
Sacarose (Q)	0,98	0,39	2,52	0,1280
Temp (L) X Sorb (L)	1,12	0,48	2,31	0,1475

Obs: valores estatisticamente significativos a 85% de confiança ($p < 0,15$).

De acordo com a análise dos coeficientes, observa-se que a contagem de bactérias lácticas após a secagem foi influenciada significativamente pelos efeitos lineares e quadráticos da temperatura (T e T^2), pelos efeitos lineares e quadráticos da sacarose (SA e SA^2) e pelo efeito de interações entre temperatura vs sorbitol ($TS.SR$). Entretanto os efeitos lineares e quadráticos do sorbitol (SR e SR^2) e as interações entre temperatura vs sacarose ($T.SA$) e sacarose vs sorbitol ($SA.SR$) não tiveram influência a 85% de significância (Tabela 18).

TABELA 19 – Tabela ANOVA da Contagem de Bactérias Lácticas (CB)

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado} (0.85; 5; 11)
Regressão	124	5	24,8	5,3	2,15
Resíduos	51,3	11	4,7		
Falta de ajuste	47,6	9			
Erro puro	3,7	2			
TOTAL	175,3	16			

% variação explicada (R^2) = 0,707

coeficiente de correlação (R) = 0,84

A Tabela 19 (ANOVA) mostrou que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 5,3, isto é, 2,5 vezes maior que o valor de F_{tabelado} . Considerando que o modelo descreve a contagem de microorganismos podemos concluir que o modelo obtido é estatisticamente significativo para as secagens testadas. Desta forma, a contagem de bactérias lácticas pode ser estimada em função da temperatura de secagem, do sorbitol e da sacarose.

TABELA 20 – Contagem de Bactérias Lácticas Real X Preditiva

Nº Experimento	Contagem de Bactérias Lácticas Real (log)	Contagem de B. L. Preditivo (log)	Desvio (valor codificado)	Contagem de B.L. Preditivo (valor real)	Desvio (valor real)
1	10,545	8,070	23,473	7,274	38,33
2	10,309	10,270	0,378	9,554	10,53
3	8,854	5,830	34,152	7,274	19,17
4	9,473	8,030	15,230	9,554	-4,26
5	2,303	1,370	40,502	2,570	21,31
6	2,303	3,570	-55,043	4,850	-96,82
7	2,303	3,610	-56,780	2,570	-25,94
8	8,700	5,810	33,215	4,850	35,40
9	7,972	11,132	-39,629	10,358	-35,32
10	3,912	3,631	7,181	2,398	18,04
11	2,303	3,450	-49,832	2,926	1,85
12	2,303	3,450	-49,832	2,926	-58,16
13	2,303	4,372	-89,888	5,536	-94,25
14	7,244	80,72	-11,424	5,391	39,74
15	2,303	3,450	-49,832	2,926	-94,25
16	2,996	3,450	-15,164	2,926	-49,31
17	4,942	3,450	30,185	2,926	9,49

Os desvios foram relativamente grandes (Tabela 20), mas levando-se em consideração de que é uma equação de sobrevivência de microorganismos, o valor de R^2 de 0,70 é um valor ainda aceitável (desvio médio codificado = 35,40 e desvio médio valor real = 37,83). Durante o desenvolvimento do trabalho foi verificado que a contagem inicial antes da secagem apresenta variações, e por isso, é mais conveniente utilizar o modelo para estabelecer tendências e não para prever os valores exatos de sobrevivência de bactérias lácticas.

Modelo com os valores codificados:

$$\text{Log CB} = 3,45 - 2,23 * T + 1,39 * T^2 + 1,1 * SA + 0,98 * SA^2 + 1,12 * T * SR \quad (4)$$

Modelo com os valores reais:

$$\text{Log CB} = 36,46 - 1,74 * T + 0,0225 * T^2 - 1,72 * SA + 0,40 * SA^2 + 0,0034 * T * SR \quad (5)$$

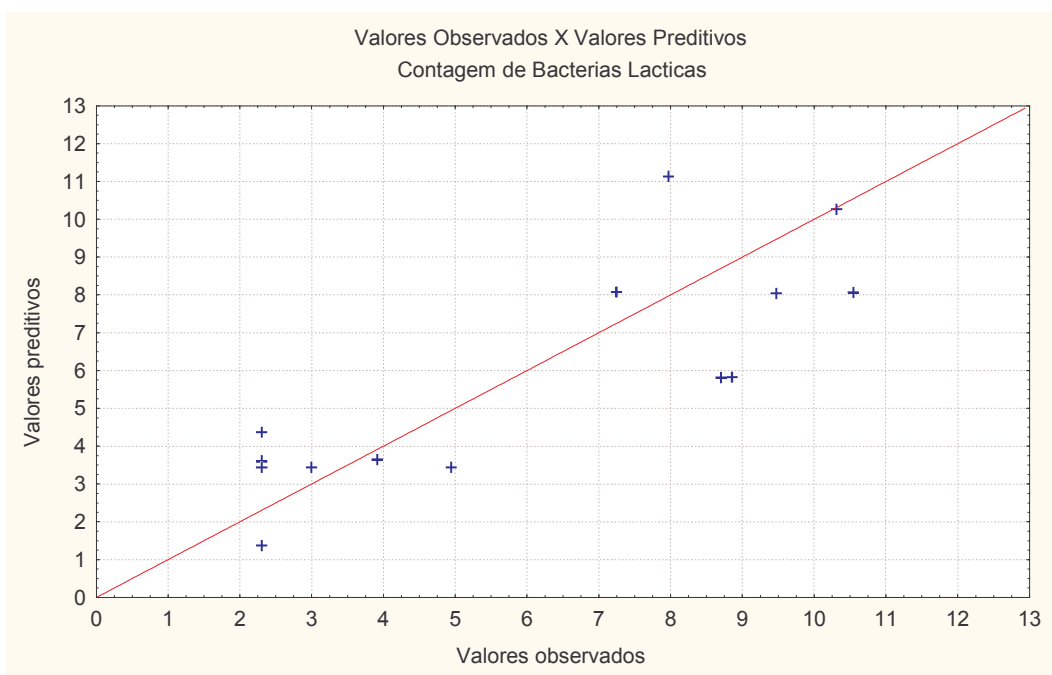


FIGURA 12 – Contagem de Bactérias Lácticas observadas (log) X Preditivas

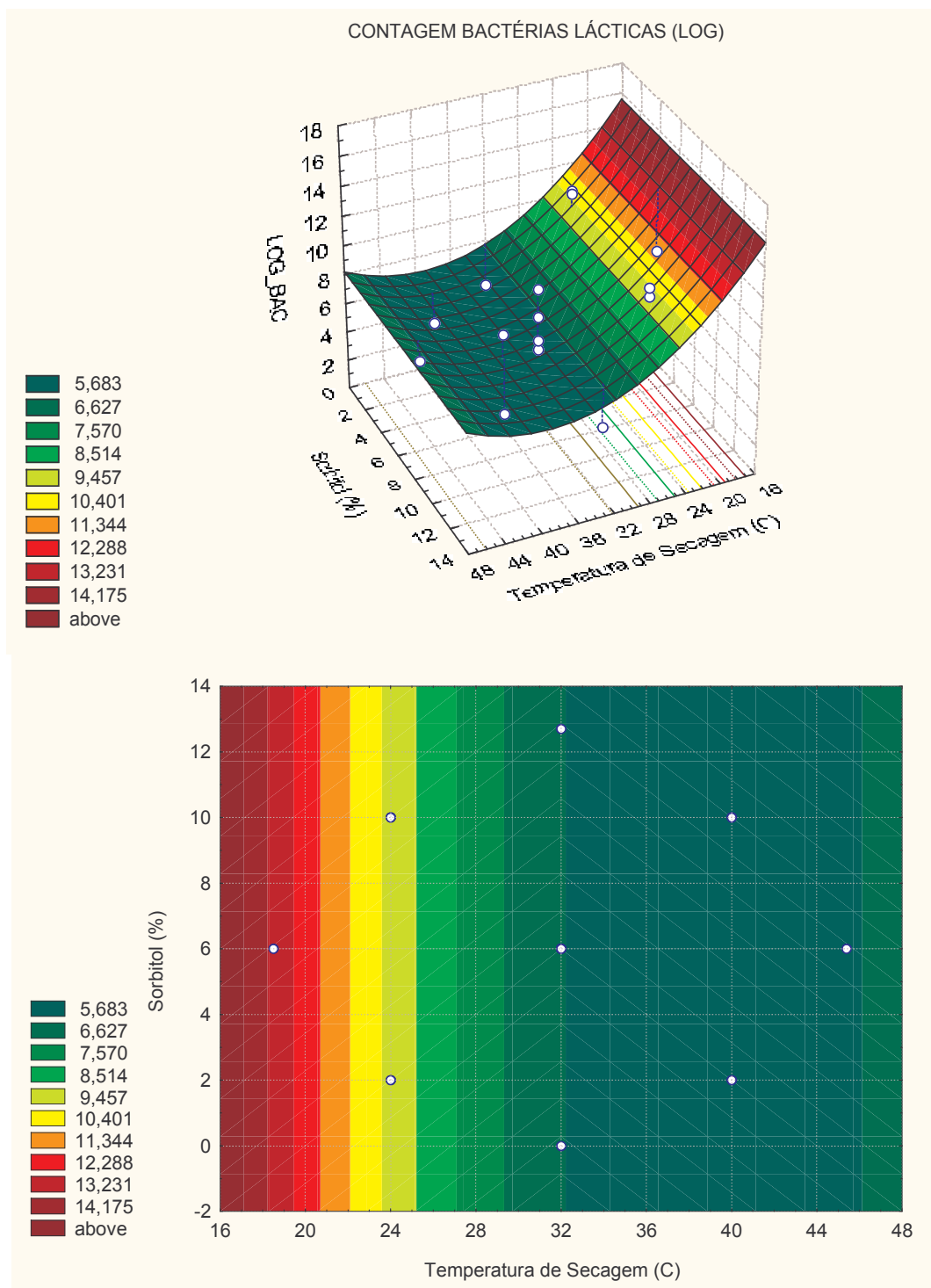


FIGURA 13 – Efeito da Temperatura de Secagem e o Sorbitol na Contagem de Bactérias Lácticas

Pela análise da figura 13 se conclui que a sobrevivência das bactérias lácticas foi influenciada exclusivamente pela temperatura de secagem. As maiores contagens foram

obtidas com as menores temperaturas. Diferente do trabalho de Abadias *et al.* (2001) sobre liofilização de *Candida sake*, nesta situação o sorbitol não teve uma ação protetora durante a secagem e não foi um fator significativo nos coeficientes de regressão.

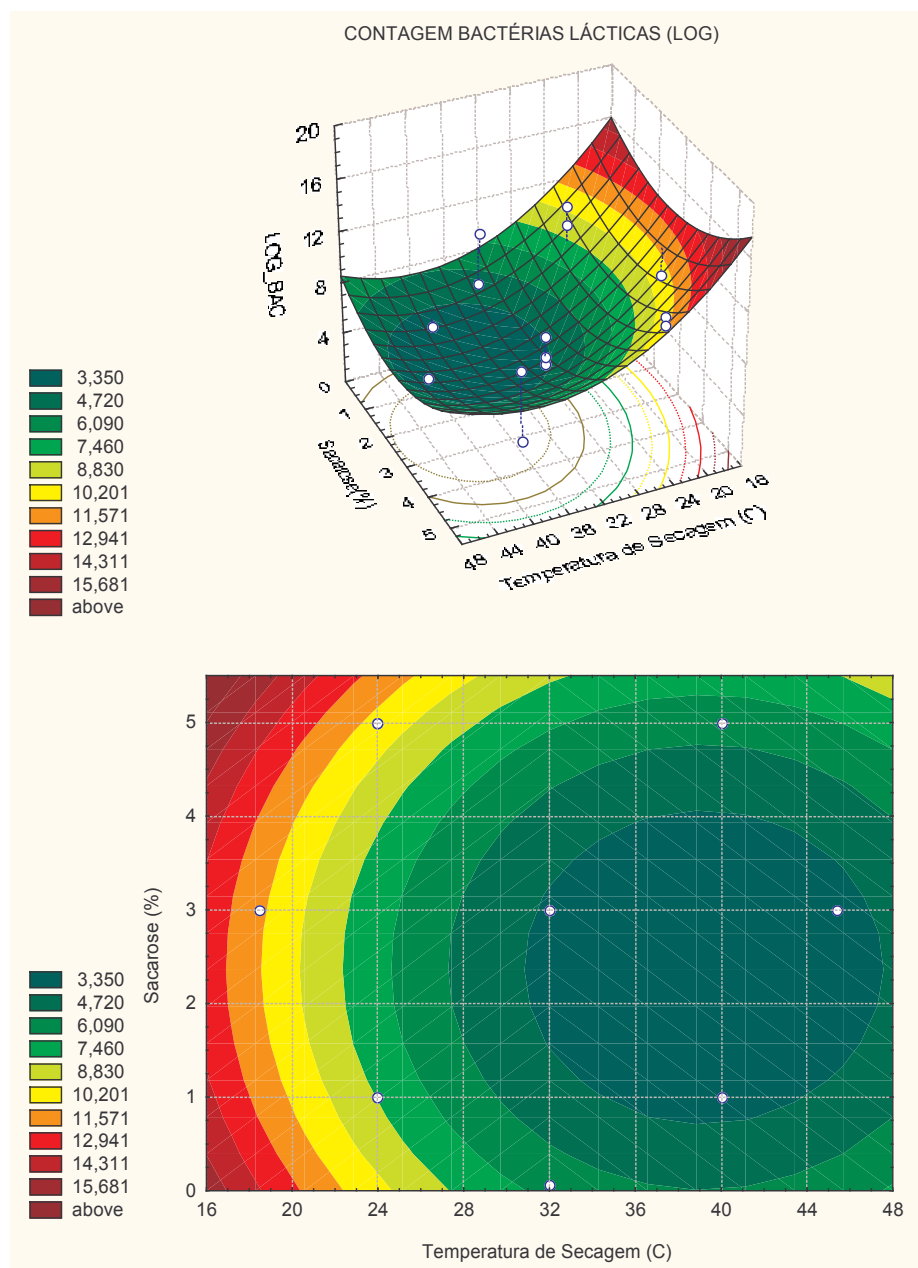


FIGURA 14 – Efeito da Temperatura de Secagem e a Sacarose na Contagem de Bactérias Lácticas

A temperatura de secagem teve uma influência forte na sobrevivência nas bactérias lácticas. A sacarose teve uma influência um pouco menor, mas a figura 14 mostra que em dosagens acima de 5% a sobrevivência das bactérias aumenta.

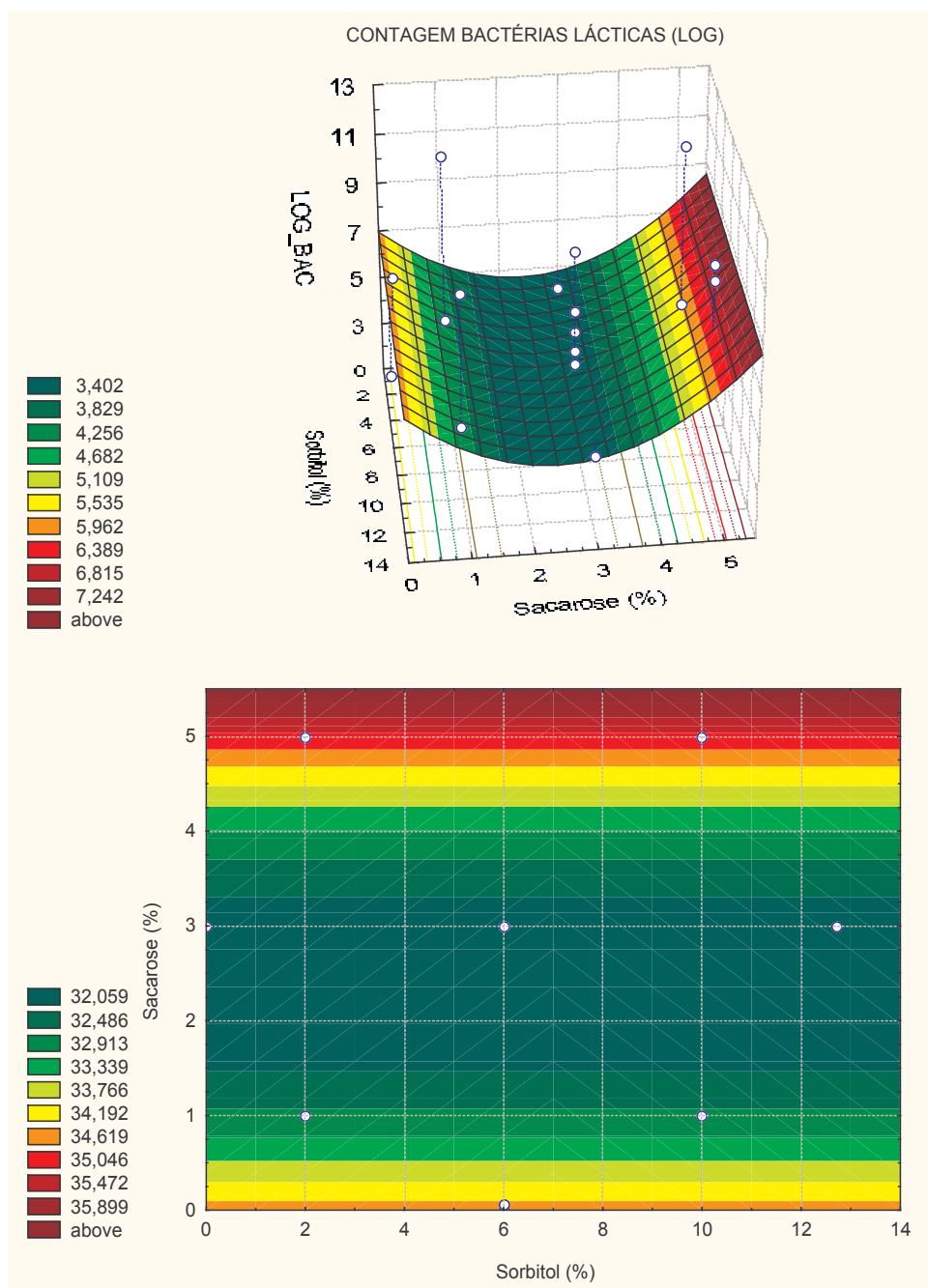


FIGURA 15 – Efeito da Sacarose e do Sorbitol na Contagem de Bactérias Lácticas

A figura 15 confirma as conclusões dos dois gráficos anteriores. O sorbitol não teve influência na sobrevivência das bactérias lácticas e a sacarose acima de 5% mostra a tendência de se alcançar um ponto ótimo de sobrevivência.

4.2.2.4. Análise da Contagem de Células Viáveis de Leveduras

Os valores de contagem das leveduras foram tabulados com o valor do log para que fosse possível alcançar uma melhor linearidade dos valores.

TABELA 21 – Resultados das Contagem de Bactérias Lácticas nos experimentos do planejamento.

Ensaio	Temperatura°C	Contagem Leveduras (UFC/g)
1	24	$2,8.10^5$
2	40	$<10^2$
3	24	$4,2.10^4$
4	40	$<10^2$
5	24	$3,4.10^4$
6	40	$<10^2$
7	24	$7,0.10^4$
8	40	$<10^2$
9	32	<10
10	32	$<10^2$
11	32	20
12	18,5	$2,9.10^3$
13	45,4	50
14	32	$<10^2$
15	32	$<10^2$
16	32	$<10^2$
17	32	$1,4.10^2$

TABELA 22 – Coeficientes de Regressão para Contagem de Leveduras (CL)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (erro puro)	t	p
Média	6,98*	1,42*	4,90*	0,0017*
Temperatura (L)	-2,47*	0,67*	3,70*	0,0077*
Temperatura (Q)	0,66	0,73	0,90	0,3975
Sorbitol (L)	-0,09	0,67	-0,13	0,9011
Sorbitol (Q)	-0,36	0,73	-0,48	0,6420
Sacarose (L)	-0,12	0,67	-0,17	0,8660
Sacarose (Q)	-0,36	0,73	-0,48	0,6420
Temp (L) X Sorb (L)	0,15	0,87	0,17	0,8711
Temp (L) X Ac (L)	0,20	0,87	0,23	0,8255
Sorb (L) X Ac (L)	0,33	0,87	0,37	0,7187

(*)Valores estatisticamente significativos a 85% de confiança ($p < 0,15$).

O único fator significativo na regressão foi a temperatura linear e média (Tabela 22).

TABELA 23 – Coeficientes de Regressão ajustados para Contagem de Leveduras (CL)

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão (erro puro)	t	p
Média	6,94	0,47	14,90	0,0000
Temperatura (L)	-2,47	0,52	-4,75	0,00026

Valores estatisticamente significativos a 85% de confiança ($p < 0,15$) / % variação explicada $R^2 = 0,60$

Como a maioria dos fatores do coeficientes de regressão do modelo não foram significativos a 85% de significância, o modelo não é preditivo, portanto pode-se apenas fazer uma análise das tendências através dos efeitos.

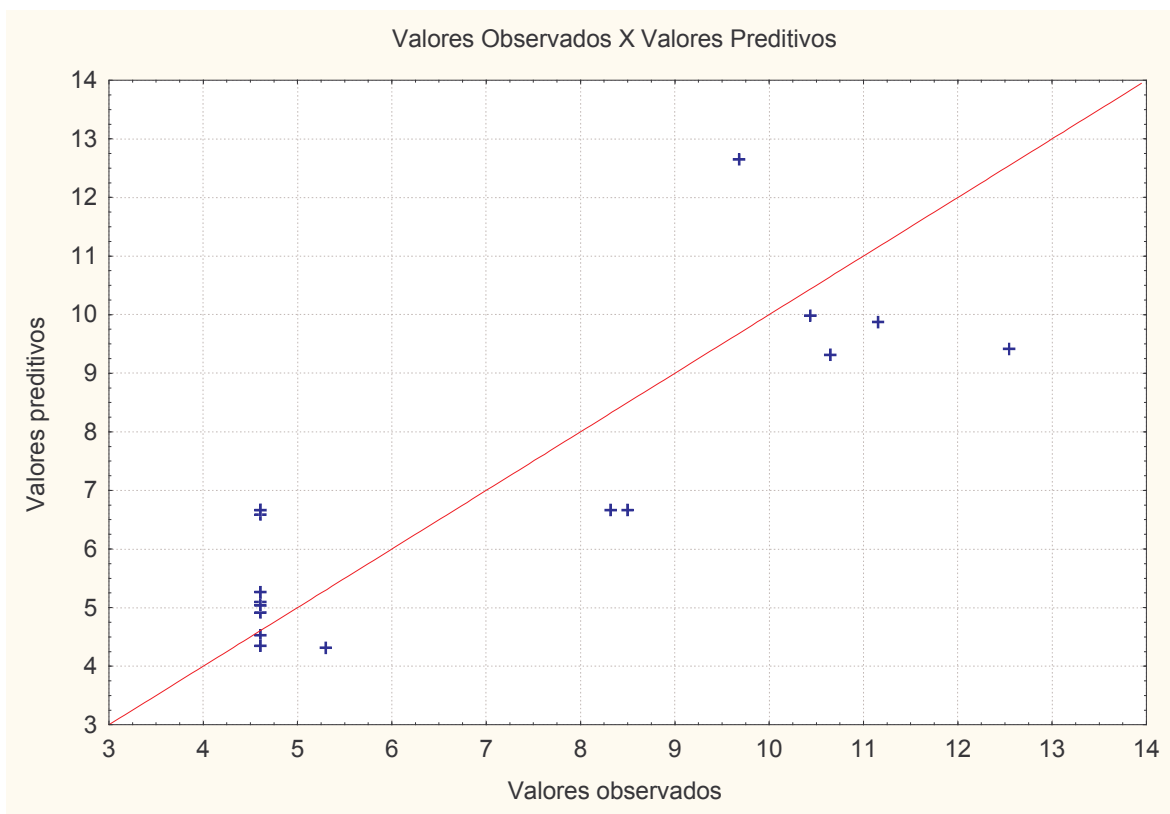


FIGURA 16 – Contagem de Leveduras observadas (log) X Preditivas

A sobrevivências das leveduras durante o processo de secagem foi determinada pela temperatura de secagem. A sacarose e o sorbitol não tiveram influência no processo (Tabela 23).

4.2.2.5. Testes Complementares

Com o objetivo de melhorar a contagem final dos microorganismos no fermento seco, foram fixadas as variáveis do planejamento experimental no melhor teste obtido (teste 1) e planejamos mais testes; um variando a preparação da amostra (teste 18) e outro variando a preparação da amostra e adicionando 1% de goma guar (teste 19).

A preparação da amostra foi modificada com o objetivo de diminuir a diluição dos microorganismos do fermento natural fresco antes de passar pela extrusora. Na preparação alterada, a amostra de fermento fresco começa a ser manipulada 48 horas antes da secagem.

O uso de uma goma teve o objetivo de diminuir o tempo de secagem do produto e verificar uma possível ação protetora. Algumas macromoléculas podem microencapsular ou imobilizar os microorganismos, deixando-os mais estáveis durante a secagem e a estocagem (Champagne *et al.* 1996). Neste caso utilizamos a goma guar devido ao baixo custo em relação a outras gomas disponíveis. Normalmente os hidrocolóides são utilizados em pequenas quantidades (até 1%) pois aumentam significativamente a retenção de água (Collar *et al.* 1990).

TABELA 24 – Formulação da preparação das amostras

	48 horas antes da secagem		24 horas antes da secagem		
Ingredientes (*)	Teste 18	Teste 19	Teste 1	Teste 18	Teste 19
Farinha de trigo (%)	110	110	165	120	120
Água (%)	47	47	40	47	47
Sorbitol (%)	--	--	6	2	2
Açúcar (%)	--	--	3	1	1
Goma guar	--	1	--	--	1

(*) porcentagem dos ingredientes são dadas sobre a quantidade de fermento fresco

TABELA 25 – Comparação da performance dos Testes Complementares X Teste 1

Fermento	Tempo de Secagem (h)	Umidade final do fermento (%)	Contagem de Bac. Lácticas (UFC/g)		Contagem de Leveduras (UFC/g)	
			Triplicata	Média	Triplicata	Média
1	7,0 ^a	13,65	3,9.10 ⁴ 3,2.10 ⁴ 4,3.10 ⁴	3,8.10 ⁴ (b)	3,0.10 ⁶ 2,9.10 ⁶ 2,5.10 ⁶	2,8.10 ⁶ (c)
18	7,0 ^a	13,96	1,9.10 ⁴ 2,8.10 ⁴ 2,8.10 ⁴	2,5.10 ⁴ (b)	1,5.10 ⁶ 2,2.10 ⁶ 2,3.10 ⁶	2,0.10 ⁶ (c)
19	7,0 ^a	14,67	4,4.10 ⁴ 3,7.10 ⁴ 2,7.10 ⁴	3,6.10 ⁴ (b)	1,7.10 ⁶ 2,0.10 ⁶ 2,9.10 ⁶	2,2.10 ⁶ (c)

(*) as letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias.

A contagem microbiológica (Tabela 24) não apresentou diferença significativa entre os três testes no Teste de Tukey a 95% de significância. Sabendo que a etapa de reidratação tem grande influência no desempenho do fermento seco, a escolha do melhor teste foi concluída na aplicação no panetones.

4.3. APLICAÇÕES DO FERMENTO SECO

4.3.1 Reidratação do Fermento Seco

Durante vários testes preliminares foi detectado que mesmo tendo uma boa sobrevivência dos microorganismos durante a secagem, a reidratação é um ponto crucial para que o fermento seja reativado.

Para a reidratação do fermento utilizou-se para início dos testes, a receita de fermento líquido foi baseado na receita de El-Dash *et al.* (1982). Os fermentos utilizados nos testes iniciais foram o número 1 do Planejamento experimental e o teste com goma guar (teste 19).

TABELA 26 – Composição do Fermento Líquido

INGREDIENTE	QUANTIDADE (g)	% SOBRE A FARINHA
Farinha de Trigo	500,0	100
Fermento seco	50,0	10
Sacarose	2,5	0,5
Nutriente de fermento	2,5	0,5
Água	500,0	100

A receita foi alterada apenas na quantidade de fermento, pois o fermento utilizado é diferente e mais diluído do que o fermento biológico (Tabela 26).

TABELA 27 – Composição do Nutriente de Fermento

INGREDIENTE	PORCENTAGEM (%)
Cloreto de amônio	20,0
Carbonato de cálcio	35,0
Sulfato de cálcio	15,0
Farinha de trigo	20,0
Sal	10,0

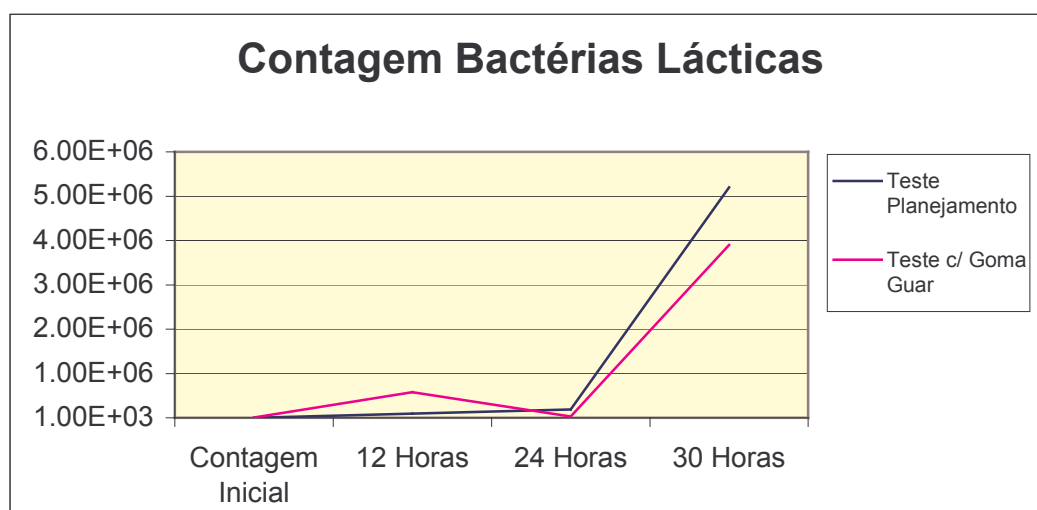
A reidratação dos fermentos secos não foi satisfatória. A secagem pode ter causado danos na membrana celular dos microorganismos, deixando-os mais sensíveis (Brennan *et al.* 1986) e por isso, a reidratação é uma etapa muito delicada por interagir com a membrana dos microorganismos. Neste caso, podem ser usados compostos como sacarose e leite em pó, que ajudam no recobrimento da membrana (Champagne *et al.* 1991).

Muitos trabalhos mostram que o leite em pó é utilizado na reidratação de bactérias que passaram por um processo de secagem. Acredita-se que as proteínas do leite formam uma capa protetora nas células (Champagne *et al.* 1991) e que quando adicionado na solução de reidratação, age como tamponante osmótico, regulando a entrada de água nas células (Valdez *et al.* 1985). O teste de reidratação com os dois fermentos (teste 1 e teste com goma) foi repetido adicionando 1,5% de leite em pó. Abaixo, as contagens das bactérias lácticas e leveduras durante a reidratação do fermento.

TABELA 28 – Proliferação dos microorganismos durante a reidratação

BACTÉRIAS LÁCTICAS	CONTAGEM INICIAL	12 HORAS	24 HORAS	30 HORAS
Teste Planejamento	$2,80 \cdot 10^3$	$9,90 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^5$	$5,20 \cdot 10^6$
Teste com Goma Guar	$6,80 \cdot 10^3$	$5,80 \cdot 10^5$	$2,90 \cdot 10^4$	$3,90 \cdot 10^6$
LEVEDURAS	CONTAGEM INICIAL	12 HORAS	24 HORAS	30 HORAS
Teste Planejamento	$2,40 \cdot 10^4$	$1,60 \cdot 10^6$	$9,40 \cdot 10^5$	$4,70 \cdot 10^6$
Teste com Goma Guar	$1,10 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^5$	$2,30 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^7$

FIGURA 17 – Crescimento das Bactérias Lácticas durante a reidratação do fermento seco



A curva de proliferação das bactérias lácticas mostrou que a contagem inicial estava entre 10^3 UFC/g, mesmo valor encontrado por Meuser *et al.* (1995). Como o valor máximo de contagem esperado era de 10^7 a 10^8 UFC/g (contagem do fermento natural fresco) não foi obtida com 30 horas de reidratação, estendendo-se o tempo de reidratação para 36 horas (figura 17).

As contagens de bactérias lácticas dos testes com e sem goma durante a reidratação foram próximos.

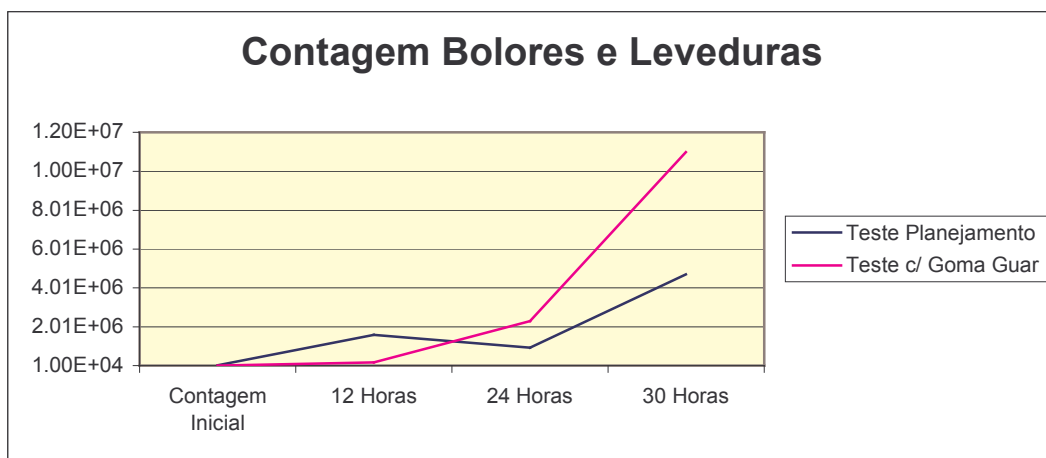


FIGURA 18 – Crescimento das Leveduras durante a reidratação do fermento seco

Os dois testes partiram da contagem inicial de leveduras de 10^4 UFC/g (figura 18) tiveram uma proliferação mais rápida do que das bactérias lácticas. Com 24 horas de reativação, o teste com goma atingiu a contagem que as bactérias lácticas atingiram apenas com 30 horas de reativação. Neste caso a goma guar ajudou na proliferação durante a reidratação. Após 30 horas o teste com goma atingiu 2,3 vezes mais leveduras que o teste 1.

4.3.2. Processo de fabricação de Panetone

Os fermentos líquidos (teste 1, 18 e 19) passaram por 36 horas de reativação e na sequência foram testados em dois processos de fabricação de panetone: processo sem refresco (A) e processo com refrescos (B).

Processo A

1º Empasto (14 horas a 32° C) → 2º Empasto (os panetones 18 e 19 atingiram a fermentação desejada em 7 horas a temperatura ambiente e o panetone 1 em 15 horas – 25°C)

Processo B

1º Refresco (2:30 horas a 32°C) → 2º Refresco (2:30 horas a 32°C) → 3º Refresco (2:30 horas de 32°C) → 1º Empasto (6 horas a temperatura ambiente – 25°C) → 2º Empasto (os panetones 18 e 19 atingiram a fermentação em 6:30 horas a 32°C / o panetone 1 precisaria de mais tempo de fermentação).

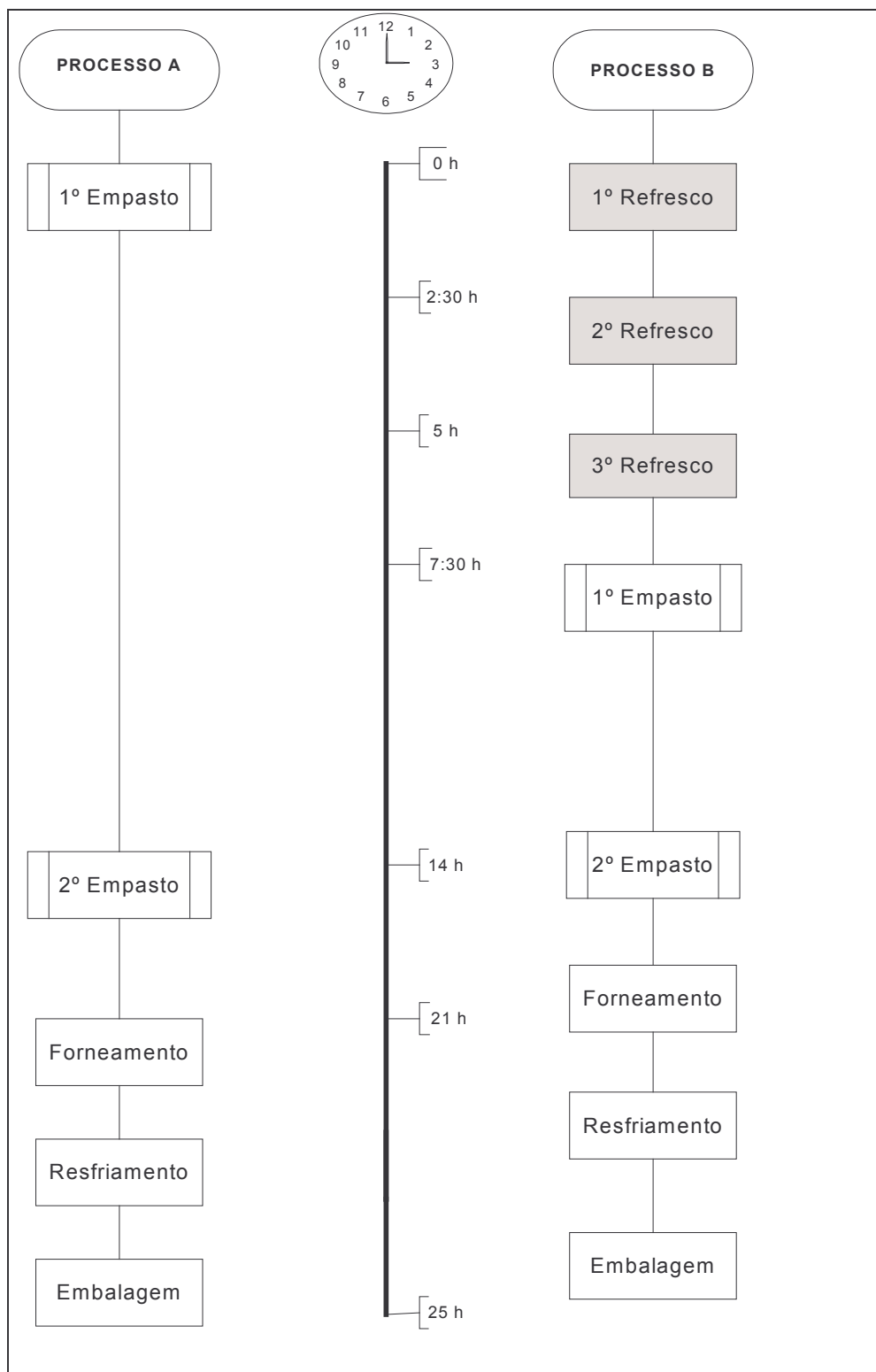


FIGURA 19 – Processo do produção do Panetone

A receita do panetone foi a mesma utilizada na seleção do fermento natural. O fermento seco reidratado foi usado na mesma dosagem que o fermento natural.

Os resultados obtidos que mostraram que a proliferação das bactérias lácticas e a extensão de sua performance metabólica atinge a estabilidade melhor após 3 refrescos. Os panetones feitos com refresco tiveram um melhor desenvolvimento no forno e melhor fibrosidade de miolo. Portanto, definiu-se que o processo B será utilizado no trabalho.

Três horas depois do forneamento, foi aplicado antimoho em sua superfície e embalado em sacos de polipropileno. A estocagem foi feita em temperatura ambiente.

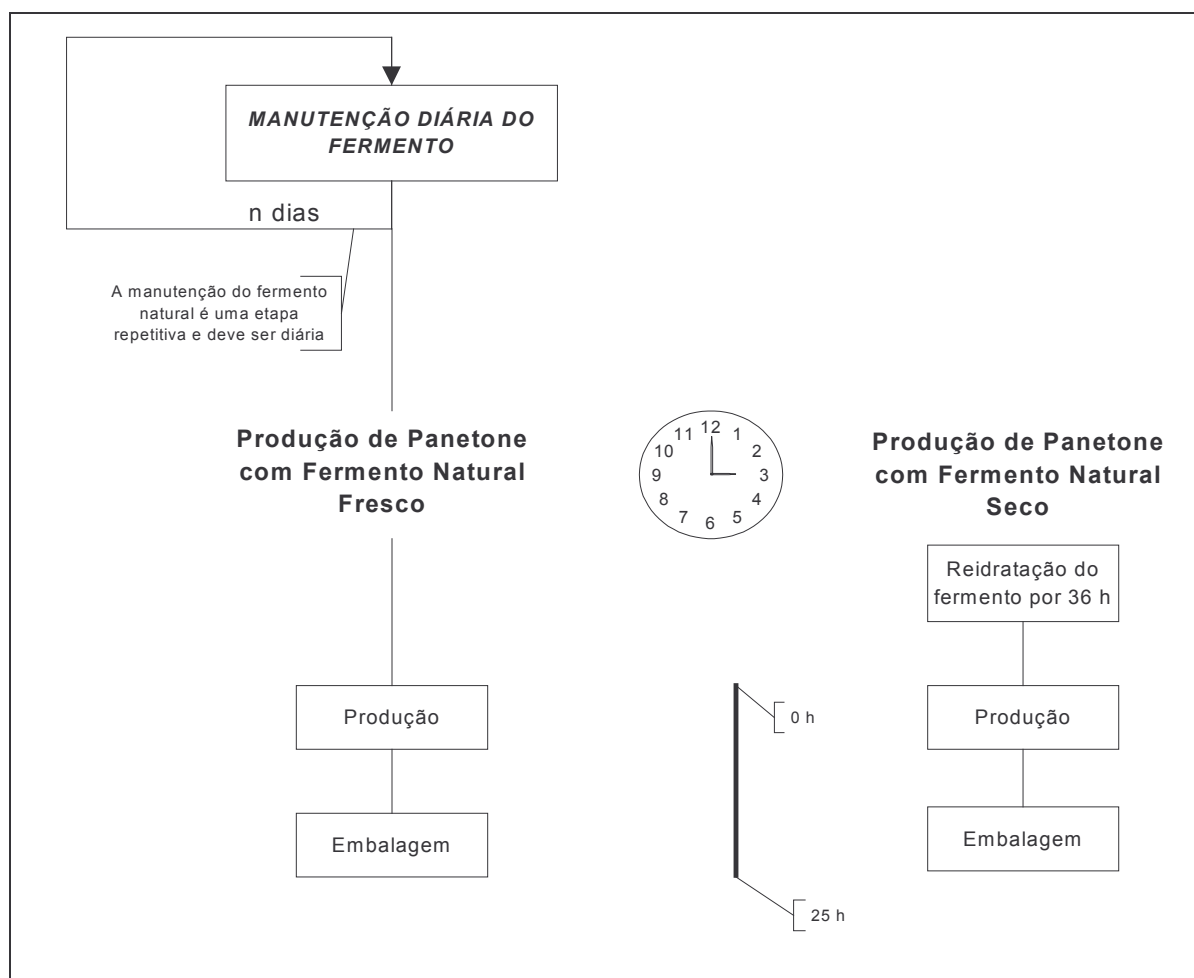


FIGURA 20 – Processo com Fermento Natural Fresco X Processo Fermento Natural Seco

4.3.2.1. Análise do Panetone

Para conclusão do resultado dos testes complementares, os fermentos (1, 18 e 19) foram aplicados na produção de panetone para a escolha do fermento a ser comparado com o fermento fresco. Usamos o processo B (com refresco) e utilizamos o Método de

comparação de médias de Tukey para a escolha do fermento seco. Durante a produção dos panetones, verificou-se que a aplicação do fermento é mais efetiva do que a análise da sobrevivência dos microorganismos. Na análise dos panetones avaliou-se o volume específico (cm^3/g) e o pH.

TABELA 29 - Volume e pH dos panetones obtidos

EXPER.	VOLUME (cm^3/g)	MÉDIA	DESVIO	PH	MÉDIA	DESVIO
1	3,45	3,47 ^a	0,026	4,40	4,43 ^b	0,043
	3,50			4,41		
	3,46			4,48		
18	3,67	3,58 ^a	0,085	4,53	4,51 ^c	0,02
	3,58			4,49		
	3,50			4,51		
19	3,50	3,49 ^a	0,011	4,59	4,57 ^c	0,02
	3,50			4,55		
	3,48			4,57		

Obs: as letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias.

Apesar da contagem de microorganismos inicial ter sido semelhante, durante a produção dos panetones foi verificado que o teste 1 do Planejamento teve um desenvolvimento inferior no forneamento. Os volumes não tiveram diferença significativa, mas o teste 18 teve uma performance um pouco superior. Como os testes 18 e 19 não apresentaram diferença decidiu-se utilizar os dois na comparação com o fermento natural fresco. Através dos testes comparativos com o panetone com fermento natural fresco será possível verificar as diferenças entre o fermento 18 e 19 e a possível ação da goma guar (Tabela 29) .

4.3.3. Score Técnico

Para as análises de Score Técnico, pH e maciez foram produzidos 55 panetones de cada teste avaliado (com fermento natural fresco - controle, com fermento natural seco e com fermento natural seco com goma guar).

A equipe de provadores passou por dois treinamentos antes da análise do Score Técnico. A avaliação foi feita sete dias após a fabricação dos panetones.

TABELA 30 - Características Externas dos Panetones

TESTE	VOLUME (cm ³ /g)		COR DA CROSTA	
	Nota Média (0-20)	Desvio	Nota Média (0-5)	Desvio
Controle	19,43 ^a	0,47	2,08 ^c	0,20
Fermento Natural Seco	18,72 ^{ab}	0,48	5,00 ^d	0,00
Fermento Natural Seco com goma guar	18,33 ^b	0,32	4,17 ^c	0,75

(*) As letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias.

(**) O maior volume obtido nas medições foi considerado como valor máximo (20 pontos).

O volume específico foi calculado através da média de 10 panetones de cada teste escolhidos aleatoriamente. Através da análise de médias (Teste de Tukey) verificou-se que houve diferença significativa a 95% entre o panetone controle e o panetone com fermento natural seco e goma guar (Tabela 30). O panetone com fermento natural seco não apresentou diferença significativa entre os dois panetones. O panetone controle teve uma expansão levemente superior comparado aos outros testes.

Todas as médias de cor da crosta (Tabela 30) apresentaram diferença significativa entre si. Esta diferença pode ser atribuída principalmente por variações de forno, pois o tempo de forneamento foi igual para todos. O panetone com fermento natural seco obteve a maior pontuação neste item.

TABELA 31 - Características Internas dos Panetones I

TESTE	CROSTA		COR DO MIOLO	
	Nota Média (0-5)	Desvio	Nota Média (0-10)	Desvio
Controle	4,17 ^f	0,41	7,67 ^g	0,17
Fermento Natural Seco	4,31 ^f	0,41	7,81 ^g	0,07
Fermento Natural Seco com goma guar	4,19 ^f	0,26	8,83 ^h	0,80

(*)As letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias.

Na análise da crosta (Tabela 31) não houve diferença significativa entre os três panetones, o panetone com fermento natural seco teve uma pontuação levemente maior.

Na análise da cor do miolo (Tabela 31), o panetone com fermento natural seco e goma guar obteve a maior pontuação e apresentou diferença significativa a 95% sobre os outros panetones. Os outros dois panetones não apresentaram diferença significativa entre si.

TABELA 32 - Características Internas dos Panetones II

TESTE	ESTRUTURA MIOLO		UMIDADE MIOLO	
	Nota Média (0-15)	Desvio	Nota Média (0-10)	Desvio
Controle	13,83 ⁱ	1,17	8,00 ^l	0,63
Fermento Natural Seco	10,98 ^j	0,55	7,50 ^l	0,49
Fermento Natural Seco com goma guar	11,00 ^j	0,63	7,93 ^l	0,63

(*)As letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias.

Na análise da estrutura do miolo (Tabela 32), a fibrosidade foi a característica de maior importância. O panetone controle obteve a maior pontuação e apresentou diferença significativa sobre os dois fermentos secos.

A análise da umidade do miolo (Tabela 32) mostrou que não há diferença significativa entre os três panetones.

TABELA 33 - Aroma e Gosto dos Panetones

TESTE	AROMA		GOSTO	
	Nota Média (0-20)	Desvio	Nota Média (0-15)	Desvio
Controle	17,67 ^m	1,37	12,33 ⁿ	1,21
Fermento Natural Seco	17,95 ^m	1,26	13,05 ⁿ	0,98
Fermento Natural Seco com goma guar	18,14 ^m	1,33	13,01 ⁿ	1,79

(*)As letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias

O aroma dos três panetones (Tabela 33) não apresentou diferença significativa. O panetone com fermento natural seco com goma guar teve a maior pontuação. Na avaliação do gosto, também não houve diferença significativa e os panetones com fermento natural seco tiveram praticamente a mesma pontuação.

TABELA 34 – Contagem Total do Score dos panetones

TESTE	CONTAGEM TOTAL (0-100)	Desvio
Controle	85,18 ^o	1,69
Fermento Natural Seco	85,30 ^o	2,76
Fermento Natural Seco com goma guar	85,83 ^o	3,87

(*)As letras diferentes indicam se há diferença significativa a 95% nas médias.

Na contagem total do Score Técnico (Tabela 34), não houve diferença significativa entre os panetones. As maiores pontuações foram divididas entre os três e na média geral não houve diferença significativa. Como os valores do desvio foram baixos podemos dizer que houve um consenso entre os provadores.

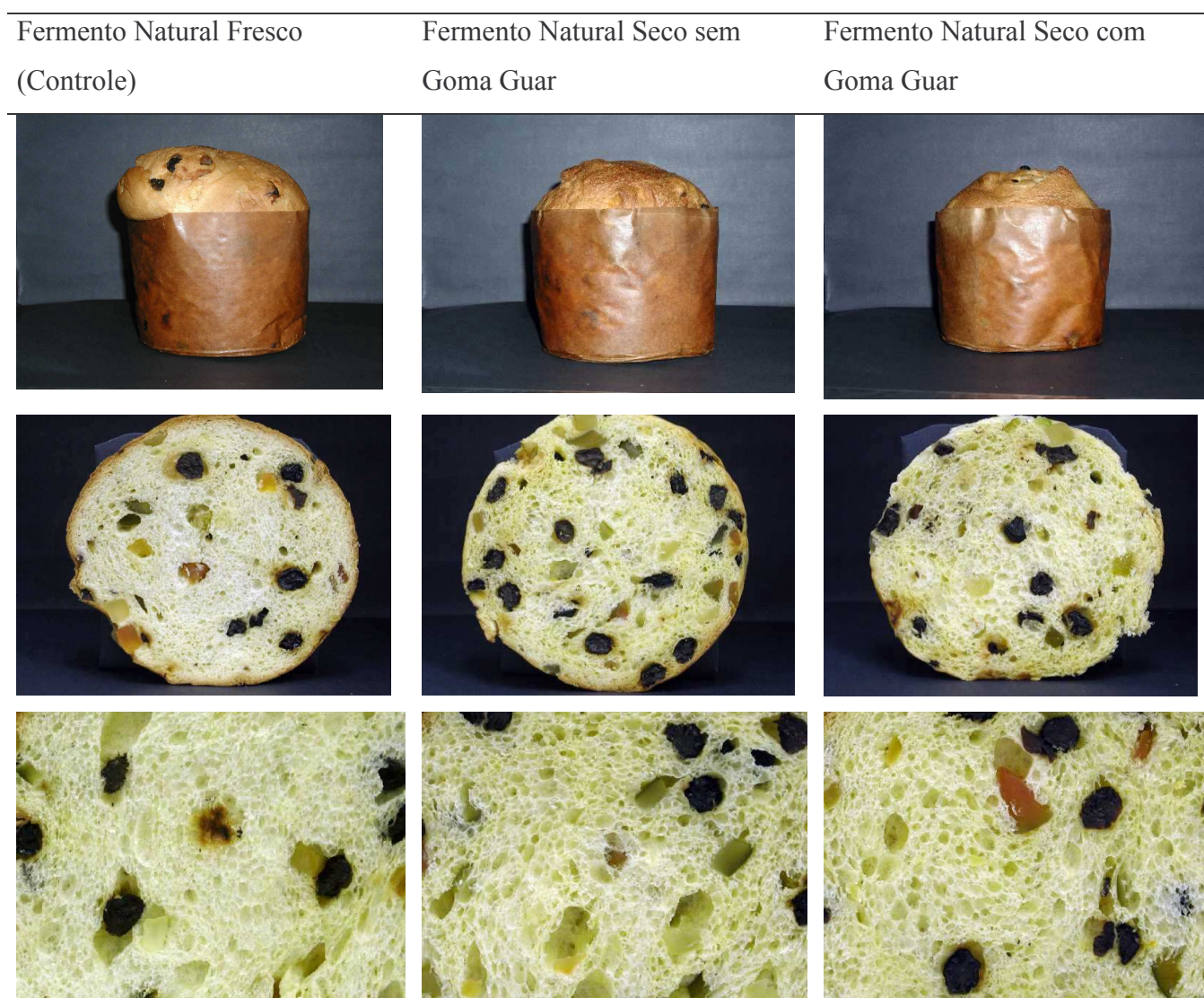


FIGURA 21 – Fotos dos panetones obtidos

4.3.4. Análise da Maciez

A medida no texturômetro feita 24 horas após a fabricação e na sequência de 10 em 10 dias (Tabela 35). Os valores foram obtidos por medições em quadriplicata (ANEXO 6).

TABELA 35 – Força Medida em texturômetro (g)

Dias após fabricação	Panetone Controle	Panetone com Fermento Natural Seco sem Goma Guar	Panetone com Fermento Natural Seco com Goma Guar
1	365,67 ^a	399,40 ^a	440,57 ^a
10	483,32 ^b	616,23 ^b	617,13 ^b
20	758,96 ^c	1026,82 ^c	758,97 ^c
30	746,55 ^d	766,76 ^d	572,28 ^d
40	853,56 ^e	907,69 ^e	604,65 ^e
50	800,54 ^f	844,72 ^f	810,89 ^f
60	590,24 ^g	585,62 ^g	682,49 ^g
70	938,59 ^h	899,03 ^h	887,85 ^h
80	507,22 ⁱ	786,11 ^j	687,27 ^j

(*)As letras indicam se há diferença significativa a 95% de significância nas médias

A avaliação da diferença de médias mostrou que apenas na última medição (com 80 dias) houve diferença significativa entre os panetones controle, com fermento natural seco e fermento natural seco com goma.

Nas medições de maciez com 1 e 10 dias de fabricação, o panetone controle estava mais macio que os panetones com fermento natural seco. A partir da medição com 20 dias o panetone com fermento natural seco e goma guar igualou a maciez do panetone controle e nas medições com 30 e 40 dias, estava mais macio que os outros dois.

Na medição com 50 dias de fabricação, o panetone controle voltou a ser o mais macio, porém o panetone com fermento seco e goma guar apresentou uma maciez muito próxima. Com 60 dias o panetone com fermento seco obteve a melhor maciez seguido muito próximo do o panetone controle.

Na medição com 70 dias o panetone com fermento seco e goma guar foi o mais macio e com 80 o panetone controle voltou a ser o mais macio.

Algumas oscilações podem ser explicadas pela influência das frutas cristalizadas e das uvas passas. Notou-se que o panetone com fermento seco e goma guar estava mais úmido que os outros dois após 20 dias. Esta característica pode ser atribuída à ação da goma guar presente no fermento seco. Os hidrocolóides quando usados em pequenas dosagens (<1%) podem aumentar a retenção de água no produto (Collar *et al.* 1999).

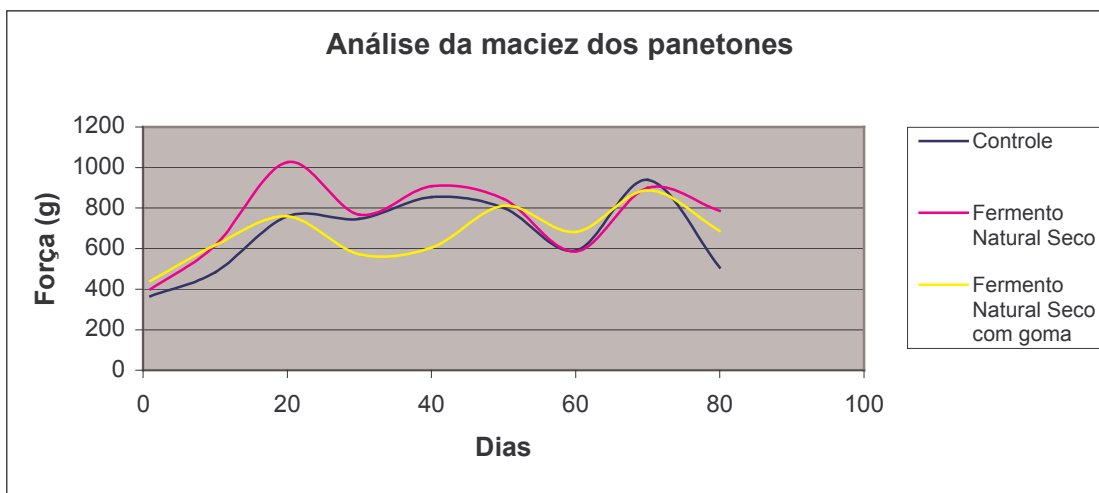


FIGURA 22 – Análise da Maciez dos Panetones

4.3.5. Determinação do pH do Miolo

TABELA 36 - Medição do pH

EXPER.	PH	MÉDIA	DESVIO
Padrão	4,27	4,29 ^p	0,026
	4,29		
	4,28		
	4,33		
18	4,46	4,46 ^q	0,005
	4,46		
	4,47		
	4,46		
19	4,44	4,43 ^q	0,018
	4,45		
	4,41		
	4,42		

As leituras de pH mostraram que o panetone controle atingiu o pH mais ácido e apresentou diferença significativa entre os outros dois panetones (Tabela 36).

Entretanto, os valores atingidos nos panetones 18 e 19 estão dentro dos padrões normais de panetone com fermentação natural (Suwelack, 1999). No trabalho de Gobbetti *et al.* (1995b) massas ácidas com *S. cerevisiae* e *L. sanfranciscensis* alcançaram um pH de 4,72. *S. cerevisiae* com *L. plantarum* atingiram 4,38 e *S. cerevisiae* e *L. farciminis* mediram 4,40.

Hansen e Hansen (1996) analisaram miolos de pães preparados com 15% de massa ácida com diversas variações de bactérias lácticas e tiveram medições de pH de 4,5 a 5,1. O trabalho de Lorenz (1983) testou oito grupos de bactérias em massa ácida e obteve pães com pH de 4,0 a 5,9.

5. CONCLUSÃO

- O sorbitol e a sacarose utilizados em diferentes porcentagens no planejamento experimental, não influenciaram no tempo de secagem do fermento natural fresco.
- A sobrevivência das bactérias lácticas foi influenciada principalmente pelos efeitos da temperatura de secagem (TS e TS²). A sacarose (SA e SA²) e o efeito de interações entre a temperatura e o sorbitol (TS.SR) tiveram também tiveram um menor influência.
- O sorbitol não apresentou ação protetora durante a secagem para as bactérias lácticas. A sacarose mostrou que dosagens acima de 5% podem aumentar a sua ação na sobrevivência das bactérias lácticas.
- A sobrevivências das leveduras durante a secagem foi determinada exclusivamente pela temperatura de secagem. O sorbitol e a sacarose não tiveram influência durante o processo.
- A etapa de reidratação do fermento teve grande influência no desempenho do fermento natural seco. Uma reidratação inadequada pode impedir a reativação dos microorganismos.
- O fermento natural seco com goma guar teve uma maior proliferação dos microorganismos do que o fermento natural seco sem goma.
- Os aromas dos panetones com fermento natural seco não tiveram diferença significativa em relação ao panetone com fermento natural fresco.
- Não houve diferença significativa na pontuação técnica total entre os panetones com fermento natural fresco e com fermento natural seco com ou sem goma guar.
- O pH atingido pelos panetones com fermento natural seco com e sem goma guar ficou dentro de valores esperados.

- A goma guar influenciou positivamente na maciez e na umidade no panetone.
- O fermento natural seco desenvolvido pode ser considerado promissor, uma vez que foi possível obter panetones com qualidades semelhantes ao panetone com fermento natural fresco.
- O fermento natural seco desenvolvido é capaz de eliminar a etapa de manutenção diária necessária no processo com fermento natural fresco.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O trabalho desenvolvido pode ser completado e aprofundado em diferentes frentes. Segue abaixo algumas sugestões:

Secagem do Fermento

- Goma guar - estudar o efeito da variação da dosagem de goma guar na sobrevivência dos microrganismos do fermento natural e no tempo total de secagem.
- Tipo de farinha de trigo - estudar o efeito de diferentes tipos de farinha, como farinha de trigo com diferentes teores de cinzas e farinha de centeio.
- Repetibilidade do processo – variar parâmetros da secagem que não foram explorados, como; quantidade de fermento na bandeja, espessura do fermento natural extrudado, outras temperaturas de secagem com adição de goma guar e outro secar o fermento em outro equipamento de secagem com ar forçado (o modelo preditivo apresentado neste trabalho vale apenas para as condições de espessura do fermento e carga da bandeja).

Aplicação do fermento natural seco

- Shelf-life - estudar a estabilidade do fermento natural seco em diferentes temperaturas e embalagens.
- Receita panetone – testar receitas com diferentes dosagens de fermento natural seco reidratado.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International Journal of food Microbiology**, Catalonia, vol 65, p. 173-182, 2001.
2. ALPAS, H. ; OZILGEN M. ; BOZOGLU, T. F. ; KATNAS, S. **Mathematical modeling of survival and weight loss of Baker's yeast during drying**. Disponível em: <<http://www.probe.br>>. Acesso em: 17 set 2001.
3. ARSDEL, W.B. V.; COPLEY, M. J.; MORGAN, A.I. **Food Dehydration: Drying Methods and Phenomena**. 2º ed. Volume 1. WestportL: The Avi Publishing Company, p. 83-85, 1973.
4. BÂATI, L.; FABRE-GEA, C.; AURIROL, D.; BLANE, P. J. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. **International journal od Food Microbiology**, Toulouse, vol. 59, p. 241-247, 2000.
5. BACA, E.; GOLEBIEWSKI, T. Effects on brewer's yeast propagation intensity on quality beer fermentation by-products. **Acta aliment. Polonica III (XXVII)**, vol 4, p 399-408, 1977. Apud: **Journal of Food Science**, vol. 57, nº 3, p. 1423-1427, 1992.
6. BAILEY, C. P.; VON HOLY, A. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. **Food Microbiology**, Johannesburg, vol. 10, nº 4, p. 281-294, 1993.
7. BARBER, S.; BÁGUENA, R. Microflora de la masa madre panaria. XI. Evolución de la microflora de masas madre durante el processo de elaboración por el sistema de “refrescos” sucesivos y de sus correspondientes masas panarias. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, Valencia, vol. 29, nº 4, p. 478- 491, 1989.
8. BARBER, S.; BÁGUENA, R.; MARTÍNEZ-ANAYA, M. A.; TORNER, M. J. Microflora de masa madre panaria. I. Identificación y propiedades funcionales de microorganismos de masas madre industriales, elaboradas con harina de trigo. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment**, vol 23, nº4, p. 552-562, 1983.
9. BARBER, S; TORNER, M. J.; MARTINEZ-ANAYA, M. A.; BARBER, B. Microflora

- de la massa madre panaria. VI. Efectos de la liofilización sobre la viabilidad y propiedades funcionales de lactobacilos de la fermentación panaria. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, Valencia, vol 28(1), p. 79-89, 1988.
10. BAYROCK, D. ; INGLEDEW, W. M. **Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast**. Disponível em: <<http://www.probe.br>>. Acesso em: 17 set 2001.
 11. BOBBIO, P.; BOBBIO, F. **Introdução à Química de Alimentos**. 2º ed. São Paulo: Livraria Varela, p.45, 2003
 12. BRENNAN, M.; WANISMAIL, B.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, Laramie, vol. 49, nº 1, p. 47-53, Jan 1986.
 13. BRÜMMER, J. M.; LORENZ, K. European Developments in Wheat Sourdoughs. **Cereal Foods World**, vol. 36, p. 310-314, 1991.
 14. CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. **The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying**. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol4/issue3/fuul/4/>>. Acesso em: 13 Ago 2002.
 15. CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; BROCHU, E.; BEAULIEU, Y. The Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. A Review. **Can. Inst. Sci. Technol. J.**, Quebec, vol. 24, nº 3 – 4, p. 118-128, 1991.
 16. CHAMPAGNE, C. P.; MONDOU, F.; RAYMOND, Y.; ROY, D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International**, Quebec, vol 29, nº 5-6, p. 555-562, 1996.
 17. CLARKE, C. I.; SCHÖBER, T. J.; ANGST, E.; ARENDT, E. K. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. **Eur. Food Res Technol**, Cork, vol 217, p. 23-33, 2003.
 18. COLLAR, C.; ANDREU, P.; MARTÍNEZ, J. C.; ARMERO, E. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. **Food Hydrocolloids**, vol. 13, p. 467-475, 1999.
 19. COLLAR, C.; MASCARÓS, A. F.; BARBER, C. B. Amino Acid Metabolism by Yeasts and Lactic Acid Bacteria during Bread Dough Fermentation. **Journal of Food**

- Science**, vol. 57, nº 3, p. 1423-1427, 1992.
20. COLLAR, C.; MASCARÓS, F.; PRIETO, A. J.; BARBER, C. B. Changes in Free Amino Acids During Fermentation of Wheat Doughs Started with Pure Culture of Lactic Acid Bacteria. **Cereal Chemistry**, vol 68(1), p. 66-72, 1990.
 21. CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N.; GOBBETTI, M. **Phenotypic and molecular identification and clusterin of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy**. Disponível em: <<http://www.probe.br>>. Acesso em: 24 Ago 2001.
 22. DAMIANI, P.; GOBBETTI, M.; COSSIGNANI, L.; CORSETTI, A.; SIMONETTI, M. S.; ROSSI, J. The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced. **Lebensm. –Wiss. u.-Technol.**, Perugia, vol. 29, p.63-70, 1996.
 23. EL-DASH, A; CAMARGO, C. °; DIAS, N. M. **Fundamentos da Tecnologia de Panificação**. Série Tecnologia Agroindustrial. Governo do Estado de São Paulo, 1982.
 24. GALAL, A. M.; JOHNSON, J. A.; VARRIANO-MARSTON, E. Lactic acid volatile (C2-C5) organic acids of San Francisco sourdough french bread. **Cereal Chemistry**, vol. 55, nº 4, p. 461-468, 1978.
 25. GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Microflora of the sour dough of “Panettone” cake. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, vol 23 (1/2/3), p. 39-49, 1973. Apud: **Ver. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, vol 23, nº 4, p. 552-562, 1983.
 26. GAVA, AL. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 1º ed. São Paulo: Nobel, p. 197-199, 1984.
 27. GIANOTTI, A.; VANNINI, L.; GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. GARDINI, F.; GUERZONI, M. E. Modellind the activity of selected starters during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, Bologna, vol. 14, p. 327-337, 1997.
 28. GOBBETI, M.; SMACCHI, E.; FOX, P.; STEPANIAK, L.; CORSETTI, A. The Sourdough Microflora. Cellular Localization and Characterization of Proteolytic Enzymes in Lactic Acid Bacteria. **Lebensm. –Wiss. u.-Technol.**, vol 29, p. 561-569, 1996.

29. GOBBETTI, M. CORSETTI, A.; ROSSI, J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeast: metabolism of amino acids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Perugia, vol. 10, p. 275-279, 1994 c.
30. GOBBETTI, M. The sourdough microflora: Interactions of acid bacteria and yeasts. **Trends in Food Science & Technology**, Perugia, vol 9, p. 267-274, 1998.
31. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. Co-metablism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp. *Lindneri* CB1 citrate-negative strain: effect on growth, end-products and sourdough fermentation. **Z. Lebensm Unters Forsch**, Perugia, vol. 203, p. 82-87, 1996.
32. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts in sour-dough using a rheofermentometer. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol 11, nº 6, p. 625-630, 1995b.
33. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J.; LA ROSA, F.; DE VINCENZI, S. Identification and clustering of latic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. **Ital. J. Food Science**, vol. VI, nº I, p. 85-94, 1994 a.
34. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A; ROSSI, J. Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *Lindneri* CB1 fructose-negative strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, Perugia, vol. 42, p. 939-944, 1995c.
35. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A; ROSSI, J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, Perugia, vol. 41, p. 456-460, 1994d.
36. GOBBETTI, M.; SIMONETTI, M. S.; CORSETTI, F.; SANTINELLI, F.; ROSSI, J.; DAMIANI, P. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. **Food Microbiology**, Perugia, vol. 12, p. 497-507, 1995a.
37. GOBBETTI, M.; SIMONETTI, M. S.; ROSSI, J.; COSSIGNANI, L.; CORSETTI, A.; DAMIANI, P. Free D- and L-Amino Acid Evolution During Sourdough Fermentation and Baking. **Journal of Food Science**, Perugia, vol. 59, nº 4, p. 881-884, 1994b.
38. GOBBETTI, M; CORSETTI, A. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. **Food Microbiology**, Perugia, vol.14, p. 175-187, 1997.
39. GREENWOOD, D.; **Sourdough FAQs**. Disponível em: <<http://www.nyx.net/~dgreenw/sourdoughfaqs.html>>. Acesso em: 05 Set 2001.

40. HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In the Genera of Lactic Acid Bacteria 2, **Blackie Academic & Professional**, London, p. 19-54, 1995. Apud: **Food Microbiology**, vol. 14, p. 175-187, 1997.
41. HANSEN, A.; HANSEN, B. Flavour of sourdough wheat bread crumb. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, Copenhagen, vol 202, p. 244-249, 1996.
42. HANSEN, A.; HANSEN, B. Influence of Wheat Flour Type on the Production of Flavour Compounds in Wheat Sourdoughs. **Journal of Cereal Science**, Copenhagen, vol 19, p.185-190, 1994.
43. HANSEN, A.; LUND, B.; LEWIS, M. J. Flavour Production and Acidification of Sourdoughs in Relation to Starter Culture and Fermentation Temperature. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, Frederiksberg, vol. 22, p.145-149, 1989.
44. HOLZAPFEL, W. H. Starter cultures in fermentation. **Food Control**, vol 8, n° 5/6, p.241-258, 1997.
45. HUTKINS, R. W.; ELLEFSON, W. L.; KASHKET, E. R. Betaine Transport Imparts Osmotolerance on a Strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. And Environmental Microbiology**, vol. 53, n° 10, p. 2275-2281, out. 1987.
46. JAVANAINEN, P.; LINKO, Y. Mixed –culture Pre-ferments of Lactic and Propionic Acid Bacteria for Improved Wheat Bread Shel-life. **Journal of Cereal Science**, Espoo, vol. 18, p. 75-88, 1993.
47. KATINA, K.; SAURI, M.; ALAKOMI, H. L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potencial of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, Espoo, vol. 35, p. 38-45, 2002.
48. 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**, Wageningen, vol 62, n° 1, p. 259-261, jan 1996.
49. KIRSCHNER, L. M.; VON HOLY, A. . Rope spoilage of bread. **South African Journal of Science**, vol. 85, p. 425-427, 1989. Apud: **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, Espoo, vol. 35, p. 38-45, 2002.
50. KLINE, L.; SUGIHARA, T. F. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of underscribed bacterial species responsible for the souring activity. **Applied Microbiology**, vol 21, p. 459-465, 1971. Apud: **Food**

Microbiology, Helsinki, vol 20, p. 193-199, 2003.

51. 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**, vol 61, nº 10, p. 3592-3597, ago 1995.
52. LORENZ, K. Sourdough Processes – Methodology and Biochemistry. **Baker's Digest**, Fort Collins, Jul-Ago, p. 41-45, 1983.
53. LUND, B.; HANSEN, A.; LEWIS, M. J. The influence of dough yield on acidification and production of volatiles in sour dough. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, vol22, p.150-153, 1989.
54. MARTÍNEZ-ANAYA, M. A.; BARBER, C. B.; COLLAR, C. Effect of processing conditions on acidification properties of wheat sour doughs. **International Journal of Food Microbiology**, Valencia, vol 22, p. 249-255, 1994.
55. MARTÍNEZ-ANAYA, M. A.; PITARCH, B.; BAYARRI, P.; BARBER, C. B. Microflora of the Sourdough of Wheat Flour Bread. X. Interactions Between Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Wheat Doughs and Their Effects on Bread Quality. **Cereal Chemistry**, Valencia, vol. 67, nº 1, p.85-91, 1990.
56. MEIGNEN, B.; ONNO, B.; GÉLINAS, P.; INFANTES, M.; GUILOIS, S.; CAHAGNIER, B. Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. **Food Microbiology**, Quebec, vol. 18, p.239-245, 2001.
57. MEUSER, F.; BARBER, B.; FISCHER, G. Determination of the microbial activity of dried sourdoughs by revitalization of their lactic acid bacteria and yeasts. **Food Control**, Berlin, vol. 6, nº 3, p. 147-154, 1995.
58. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, São Paulo, vol. 1, 1985.
59. ONNO, B.; ROUSSEL, Ph. Technologie et microbiologie de la panification au levain. **Bacteries lactiques 2**, p. 293-321, 1994. Apud: **Food Microbiology**, vol. 14, p. 175-187, 1997.
60. RATTI, C.; **Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review**. Disponível em: <<http://www.probe.it>>. Acesso em: 18 Set 2001.

61. RICHARD-MOLARD, D.; NAGO, M. C.; DRAPON, R. Influence of the Breadmaking Method on French Bread Flavor. **Baker's Digest**, Nantes Cedex, vol. 53, n° 3, p.34-38, Jun 1979.
62. ROSENKVIST, H.; HANSEN, A . Contamination profiles and characterisation of *Bacillus species* in wheat bread and raw materials for bread. **International Journal of Food Microbiology**, Frederiksberg, vol 26, n° 3, p. 353-363, 1995.
63. ROSENQUIST, H.; HANSEN, A. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. **Food Microbiology**, Frederiksberg, vol. 17, p.241-250, 2000.
64. SAFRONONA, V. I.; NOVIKOVA, N. I. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing. **Journal of Microbiological Methods**, Saint Petersburg-Pushkin, vol 24, p. 231-237, 1996.
65. SALKINOJA-SALONEN, M. S.; VUORIO, R.; ANDERSSON, M. A.; KÄMPFER, P.; ANDERSSON, M. C.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SCOGING, A. C. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, n° 10, p. 4637-4645, Out 1999.
66. SALOVAARA, H.; VALJAKKA, T. The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. **Int. Journal of Food Science Technology**, vol 22, p. 591-597, 1987. Apud: **Food Microbiology**, Perugia, vol 12, p. 497-507, 1995a.
67. SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Resistance of Yeast to Dry Heat. **Journal of Food Science**, Washington, vol. 50, p.1754-1755, 1985.
68. SEIBEL, W.; BRUMMER, J. The Sourdough Process for Bread in Germany. **Cereal Foods World**, Detmold, vol. 36, n° 3, p. 299-304, mar, 1991.
69. SIMONSON, L.; SALOVAARA, H.; KORHOLA, M. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. **Food Microbiology**, Helsinki, vol 20, p. 193-199, 2003.
70. SPICHER, G. Baked Goods. In *Biotechnology Vol V. Food and feed Production with Microorganisms*. Ed. Rehm, H. J. Reed, G., Verlag Chemie, Weinheim, 1983. p. 1-80. Apud: **Food Microbiology**, Perugia, vol 12, p. 497-507, 1995a.
71. SPICHER, G.; NIERLE, W. The microflora of sourdough. XX. Communication: The

- influence of yeast on the proteolysis during sourdough fermentation. **Z. Lebensm. Unters. Forsch**, vol 179, p. 109, 1984. Apud: **Cereal Chemistry**, vol 68(1), p. 66-72, 1990.
72. SPICHER, G.; RABE, E. The microflora of sourdough XVI. Communication: the influence of dough yield on the production of lactate and acetate in sour dough, started with lactic acid bacteria. **Z. Lebensm. Unters. Forsch**, vol. 176, p.190-195, 1983. Apud: **Food Microbiology**, vol 12, p. 497-507, 1995a.
 73. SPICHER, G.; SCHRÖDER, R. The microflora of sourdough. VI. The amino acid requirement of acid lactic bacteria (genus *Lactobacillus beijerinck*) in “Reinzuchtsauer” and in sour dough. **Z. Lebensm. Unters. Forsch**, vol. 168, p. 397-401, 1979. Apud: **Journal of Food Science**, vol. 57, nº 3, p. 1423-1427, 1992.
 74. SPICHER, G.; SCHRÖDER, R.; STEPHAN, H. The microflora of sourdough. X. The baking performance of the lactic acid bacteria occurring in starter cultures. **Z. Lebensm. Unters. Forsch**, vol 171, p.119-124, 1980. Apud: **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, vol 23, nº 4, 1983.
 75. SRIRANGANATHAN, N.; SEIDLER, R. J.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. Cytological and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization studies on *Lactobacillus* isolates from San Francisco sourdough. **Applied Microbiology**, vol. 25, página 461-470, 1973. Apud: **Food Microbiology**, vol. 14, p. 175-187, 1997.
 76. SUWELACK, Sourdough: a question of taste. **European Bakery**, Maio/Junho p.30-36, 1999.
 77. VALDÉZ, G. F.; GIORI, G. S.; HOLGADO, A. A. P. de Ruiz, OLIVER, G. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. **Applied and Environmental Microbiology**, vol 45, p. 302-304, 1983. Apud: **Applied and Environmental Microbiology**, vol 50, nº 3, p. 1339-1341, 1985.
 78. VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVER, G. Effect of the Rehydration Medium on the Recovery of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Tucumán, vol 50, nº 3, p.1339-1341, Nov. 1985.
 79. VOGEL, R. F.; BOCKER, G.; STOLZ, P.; EHRMANN, M.; FANTA, D.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SHLEIFER, K. H.; HAMMES, W. P. Identification of

Lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. **Int. J. System Bacteriol.**, vol 44, p. 223-229, 1994. Apud: **Food Microbiology**, vol. 14, p. 175-187, 1997.

80. WEISS, N.; SCHILLINGER, U. *Lactobacillus sanfrancisco* sp nov., nom. **Rev. System Appl. Microbiology**. 5, p. 230-232, 1984. Apud: Food Microbiology, vol. 14, p. 175-187, 1997.

ANEXO 1 - DEFINIÇÕES UTILIZADAS NA DISSERTAÇÃO

A dissertação contém alguns termos bastante utilizados. Para um melhor entendimento segue abaixo a definição dos termos usados:

Massa ácida – termo genérico usado para uma massa usada como fermento. Pode-se ser proveniente de um desenvolvimento natural da microflora presente inicialmente na massa ou uma massa que foi adicionada de microorganismos específicos que darão características desejadas ao fermento.

Fermento natural – massa ácida desenvolvida através da microflora presente inicialmente na massa. A fermentação espontânea resulta tipicamente de atividades competitivas de diferentes microorganismos, as cepas melhor adaptadas e com maior grau de crescimento irão dominar durante estágios particulares do processo (Holzapfel, 1997).

Refresco – etapa de expansão do fermento natural, sua função é deixar o fermento mais forte para a fermentação do produto.

Empasto – etapas de fabricação de produto em outros ingredientes são adicionados ao fermento natural.

ANEXO 2 – FORMULAÇÃO DO FERMENTO COM BATATA E IOGURTE

INGREDIENTES
1 Kg de batata crua descascada 180 g de glúten 1 litro de iogurte natural industrializado 800 g de farinha de trigo
MODOS DE FAZER
(1) Ralar as batatas e colocar no liquidificador junto com o iogurte, glúten e água. (2) Bater até obter uma pasta homogênea. (3) Colocar num recipiente e adicionar a farinha. (4) Misturar até formar uma massa. (5) Embalar com plástico e um pano de prato amarrado por cima e deixar fermentar por 24 horas a temperatura ambiente.
MANUTENÇÃO
Na primeira semana fazer a manutenção diariamente. Retirar a camada externa do fermento e pesá-lo. Pesar a mesma quantidade de farinha e aproximadamente 47% do peso da farinha em água. Colocar a água e o fermento na amassadeira. Misturar até o fermento diluir na água. Adicionar a farinha e misturar até formar uma massa homogênea. Embalar o fermento no plástico e no pano amarrado e acondicionar na geladeira. Após a primeira semana, repetir a manutenção de 2 em 2 dias.

ANEXO 3 –FORMULAÇÃO DO FERMENTO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

INGREDIENTES
500 g de farinha de trigo 500 g de caldo de cana-de-açúcar
MODO DE FAZER
(1) Misturar até obter uma pasta homogênea. (2) Colocar num recipiente fechado a temperatura ambiente e deixar fermentando por 3 dias. (3) Após 3 dias, misturar 500 g da massa com 500 g de farinha e 470 ml de água. (4) Embalar com plástico e um pano de prato amarrado por cima e deixar fermentar por 24 horas.
MANUTENÇÃO
Na primeira semana a manutenção deve ser diária. Retirar a camada externa do fermento e pesá-lo. Pesar a mesma quantidade de farinha especial e aproximadamente 47% do peso da farinha em água. Colocar a água e o fermento na masseira. Misturar até o fermento diluir na água. Adicionar a farinha e misturar até formar uma massa homogênea. Embalar o fermento no plástico e no pano amarrado e acondicionar na geladeira. Após a primeira semana, repetir a manutenção de 2 em 2 dias (ou no máximo 3 em 3).

ANEXO 4 – FORMULAÇÃO DO FERMENTO DE MAÇÃ E AÇÚCAR MASCADO

INGREDIENTES
1 maçã Fuji 10 g de açúcar mascado 30 g de farinha de trigo
MODO DE FAZER
(1) Cortar a maçã retirando a casca e a semente. (2) Adicionar 10 g de açúcar mascado. (3) Bater num liquidificador. Deixar descansando a 30°C por aproximadamente 3 horas. (4) Adicionar 30 g de farinha e deixar descansando a 30°C por 12 horas. (5) Repetir a operação de adicionar farinha até obter uma massa firme. (6) Adicionar ao fermento o mesmo peso de farinha e 42% de água sobre o peso da farinha. (7) Misturar até a obtenção de uma massa lisa. (8) Acondicionar o fermento em geladeira, embalado por um plástico, enrolado em um pano de prato amarrado.
MANUTENÇÃO
Retirar o fermento da geladeira e deixar em temperatura ambiente de 1 a 2 horas. Retirar a camada externa do fermento e pesá-lo. Peser a mesma quantidade de farinha e 45 a 47% do peso da farinha em água. Misturar o fermento com a água até diluí-lo. Adicionar toda a farinha e misture até obter uma massa lisa. Modelar, embalar em um plástico, enrolar num pano e amarrar bem firme. Acondicionar o fermento em geladeira. Repetir o procedimento a cada 48 hs (ou no máximo 72 horas).

ANEXO 5 – ANEXO ANÁLISES DA FARINHA DE TRIGO

Análises feitas no desenvolvimento do trabalho	Média Umidade – duplicata (%)	Cinzas (%)	Teor de Glúten (%)
Amostra 1	13,67	0,39	8,39
Amostra 2	13,25	0,39	8,84
Amostra 3	13,20	0,40	9,10
Amostra 4	13,73	0,42	8,54
Amostra 5	12,96	0,38	9,31
Amostra 6	13,04	0,39	8,45
Amostra 7	12,89	0,41	8,49
Amostra 8	13,63	0,40	8,95

ANEXO 6 – PONTUAÇÃO DO SCORE TÉCNICO

SCORE TÉCNICO PANETONE

	Notas	VOLUME (20)	COR DA CROSTA (5)	CARAC. CROSTA (5)	COR MIOLO (10)	ESTRUT. MIOLO (15)	UMIDADE MIOLO (10)	AROMA (20)	GOSTO (15)
PADRÃO	1	19,05	2,0	4,5	8,0	14,0	8,0	17,0	12,0
	2	19,89	2,0	3,5	8,0	15,0	7,0	18,0	13,0
	3	19,11	2,5	4,5	7,0	12,0	8,0	16,0	13,0
	4	19,11	2,0	4,0	7,5	14,0	8,0	18,0	13,0
	5	20,00	2,0	4,5	7,5	15,0	9,0	20,0	10,0
	6		2,0	4,0	8,0	13,0	8,0	17,0	13,0
	MÉDIA	19,432	2,08	4,17	7,67	13,83	8,00	17,67	12,33
TESTE 18	1	18,33	5,0	4,0	8,0	11,0	8,0	18,0	13,0
	2	18,5	5,0	4,5	8,0	10,0	7,5	18,0	12,0
	3	19,5	5,0	4,0	8,0	10,0	8,0	18,0	14,0
	4	18,39	5,0	4,5	7,5	11,0	7,0	18,0	14,0
	5	18,89	5,0	5,0	7,5	11,0	7,0	20,0	14,0
	6		5,0	4,0	8,0	10,0	7,0	16,0	12,0
	MÉDIA	18,84	4,58	4,31	7,81	10,98	7,50	17,95	13,05
TESTE 19	1	18,39	5,0	4,0	8,0	11,0	8,0	16,0	10,0
	2	18,83	4,0	4,5	10,0	12,0	9,0	18,0	14,0
	3	17,94	5,0	4,0	10,0	11,0	8,0	18,0	15,0
	4	18,22	3,0	4,0	8,0	11,0	8,0	18,0	12,0
	5	18,27	4,0	4,0	9,0	10,0	8,0	19,0	13,0
	6		4,0	4,5	9,0	11,0	7,0	20,0	14,0
	MÉDIA	18,42	4,23	4,19	8,83	11,00	7,93	18,14	13,01

ANEXO 7 – MEDIÇÕES DO TEXTURÔMETRO

Dias após fabricação	Nº Amostra	Padrão (força g)	Teste 18 (força g)	Teste 19 (força g)
1	1	383,87	241,33	307,27
	2	466,42	339,42	613,96
	3	273,80	456,27	385,24
	4	338,71	560,91	456,37
10	1	443,81	534,60	1053,99
	2	432,88	566,08	305,22
	3	534,08	572,38	696,54
	4	522,803	792,29	412,91
20	1	822,54	1030,95	1039,57
	2	666,91	1125,96	414,87
	3	810,27	1100,58	823,76
	4	720,49	850,11	758,43
30	1	853,70	716,83	674,27
	2	516,28	600,04	656,41
	3	817,31	735,02	618,08
	40	799,21	1015,58	340,69
40	1	1025,65	830,15	422,33
	2	806,54	595,63	903,77
	3	948,10	1106,46	671,70
	4	634,24	1098,71	421,03
50	1	990,41	905,85	815,45
	2	809,90	587,05	526,99
	3	672,96	874,48	854,97
	4	728,89	1011,89	1046,16
60	1	876,72	525,11	778,76
	2	433,16	455,66	541,27
	3	463,35	884,13	397,35
	4	588,65	477,69	1012,68
70	1	961,78	959,86	783,71
	2	1099,09	874,97	766,64
	3	773,26	982,78	1029,08
	4	920,68	778,58	972,33
80	1	463,96	728,19	828,28
	2	472,66	831,28	582,65
	3	465,45	988,31	713,77
	4	626,99	604,84	632,64

ANEXO 8 – MEDIDAS DOS VOLUMES DOS PANETONES (cm³/g)

Panetone Padrão	Panetone 18	Panetone 19
3,43	3,30	3,31
3,58	3,33	3,39
3,44	3,51	3,23
3,44	3,31	3,28
3,60	3,40	3,29

Obs: foram utilizados 2 panetones em cada medição.