

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

RENATA DUARTE MOREIRA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**MICROBIOTA DE FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM
DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA
PARAÍBA E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O
MERCADO DE PANIFICAÇÃO**

**JOÃO PESSOA
2024**

RENATA DUARTE MOREIRA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**MICROBIOTA DE FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM
DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA PARAÍBA E
SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O MERCADO DE
PANIFICAÇÃO**

**JOÃO PESSOA
2024**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663m Araújo, Renata Duarte Moreira Cavalcante de.

Microbiota de fermentos naturais coletados em diferentes regiões climáticas do estado da Paraíba e seleção de leveduras de interesse para o mercado de panificação / Renata Duarte Moreira Cavalcante de Araújo. - João Pessoa, 2024.

80 f. : il.

Orientação: Estefânia Fernandes Garcia.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Fermentação natural - panificação. 2. Seleção de leveduras. 3. Ecologia microbiana. 4. Testes biotecnológicos. 5. Cultura starter. I. Garcia, Estefânia Fernandes. II. Título.

UFPB/BC

CDU 664.654(043)



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição

Ata da 269ª (duo centésima sexagésima nona) Sessão Pública de Defesa de Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Nutrição, da discente Renata Duarte Moreira Cavalcante de Araújo.

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e quatro (29/02/2024), às 09:00 horas, reuniram-se em cerimônia pública de forma remota através do link: <https://meet.google.com/shg-utgf-eeu>, os membros da Banca Examinadora e a mestranda Renata Duarte Moreira Cavalcante de Araújo, candidata ao grau de Mestre em Ciências da Nutrição. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Drª Estefânia Fernandes Garcia (Presidente / Orientadora), Drª Maria Elieidy Gomes de Oliveira (Examinadora Interna), Drª Jailane de Souza Aquino (Examinadora Interna Suplente), Drª Ingrid Conceição Dantas Gonçalves (Examinadora Externa) e Drª Noádia Priscila Araújo Rodrigues (Examinadora Externa Suplente). Dando início à sessão pública, a Profª Drª Estefânia Fernandes Garcia, convidou a mim, Carlos Fernando da Silva para secretariá-los comunicando o fim específico da reunião. A seguir, foi cedida a palavra à examinada para que no prazo estabelecido por Regimento fizesse sua exposição de motivos e objetivos de sua dissertação, metodologia adotada, resultados encontrados, discussão e conclusão, trabalho esse sob o título “: DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DOS FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA PARAÍBA E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O MERCADO DA PANIFICAÇÃO”. Concluída a exposição, a candidata em seguida foi arguida sucessivamente por cada membro da banca examinadora. Dando continuidade, os senhores membros foram inquiridos pela Srª Presidente se estavam aptos a proferir o julgamento e, recebendo respostas afirmativas, procederam com a deliberação da avaliação. Após certo espaço de tempo, a Srª Presidente proclamou como “APROVADA” a dissertação intitulada: “ DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DOS FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA PARAÍBA E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O MERCADO DA PANIFICAÇÃO”. A seguir, preenchendo devidamente os mapas concernentes aos valores e conceitos, declarou que sua autora estava em condições de receber o grau de Mestre em Ciências da Nutrição, devendo a Universidade Federal da Paraíba, providenciar na forma da lei a expedição do respectivo Diploma. Nada mais havendo a ser tratado, eu, Carlos Fernando da Silva Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros da Banca Examinadora. João Pessoa, 29 de fevereiro de 2024.

Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição

Centro de Ciências da Saúde/UFPB - Campus I - Cidade Universitária

CEP: 58051-970, João Pessoa - PB, E-mail: ppgc@ccs.ufpb.br, Tel: (83) 3216-7417

RENATA DUARTE MOREIRA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**MICROBIOTA DE FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM
DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA PARAÍBA E
SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O MERCADO DE
PANIFICAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição do Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Paraíba, para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Estefânia Fernandes Garcia

JOÃO PESSOA
2024

RENATA DUARTE MOREIRA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**MICROBIOTA DE FERMENTOS NATURAIS COLETADOS EM
DIFERENTES REGIÕES CLIMÁTICAS DO ESTADO DA PARAÍBA E
SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE PARA O MERCADO DE
PANIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada em 29 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA

Prof.^a Dra. Estefânia Fernandes Garcia
DGA/CTDR/UFPB

EXAMINADOR INTERNO

Prof.^a Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
DN/CCS/UFPB

EXAMINADOR EXTERNO

Prof.^a Dra. Ingrid Conceição Dantas Gonçalves
DGA/CTDR/UFPB

JOÃO PESSOA

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada eu posso fazer. É Ele quem me sustenta e me fortalece para lutar e vencer todos os dias. Essa jornada foi marcada por Sua graça e bondade.

Ao meu esposo Mário Henrique, aquele que me apoia em todo tempo. Seu suporte foi essencial para que eu conseguisse chegar aqui, sobretudo nos dias nos quais eu queria desistir e ele, com toda sua paz, companheirismo e sabedoria, me ajudou a ir além.

Ao meu filho Samuel Henrique, por toda resiliência durante as minhas ausências, enquanto eu pesquisava e produzia. Embora com apenas 3/4 anos de idade, se mostrou uma criança forte e compreensiva. Agradeço cada cartinha que me foi entregue em dias intensos de estudo e cada “beijinho guardado no coração” para os momentos de maior saudade.

À minha mãe Maria de Fátima, por ter aberto mão de tanto durante esses dois anos para me dar apoio com meu filho enquanto eu ia ao laboratório ou precisava me concentrar para estudar e escrever. Ao meu pai Robério Paredes, por toda preocupação e disponibilidade em ajudar em qualquer coisa que fosse preciso e aos meus irmãos Rafaela Duarte e Robério Filho. Ter família é algo divino e eu fui presenteada com a melhor.

À professora Dra. Estefânia Fernandes Garcia, por sua orientação, disponibilidade e todo ensinamento transmitido. Deu para sentir sua paixão pela fermentação natural e isso foi o diferencial para me atrair pelo interesse no aprofundamento desse assunto.

Aos membros da banca examinadora por toda contribuição na melhoria do trabalho.

Aos meus pastores (também professores dessa Instituição), Neto Moreira e Patrícia Moreira, pelas palavras de incentivo para permanecer firme no que Deus tinha colocado em minhas mãos.

Aos meu diretores Paulo Melo e Érika Martins, por todo acolhimento e empatia durante essa jornada.

Aos meus amigos do trabalho Thaise Maire, Karol Gonzalez, Gustavo Henrique e Jorge Neto, por tornarem meus dias mais leves, seja através dos risos, de chocolate, de um copo d'água em minha mesa ou de um café com leite para me dar uma animada para os estudos após a jornada de trabalho.

Às minhas amigas Maria Helena e Elayne Cristina, que desde o processo seletivo me sustentaram em oração e em palavras de ânimo. Aos demais amigos que compreenderam minhas ausências durante esse tempo.

À professora Dra. Noádia Rodrigues, pelo apoio com a estatística dos resultados.

Às técnicas de laboratório Karoliny Sampaio, Ana Cláudia e Maristela, por todo apoio,

paciência e ensinamentos compartilhados. Aos alunos da iniciação científica Marcus, Luisa, Lilian e Gabriel, assim como as mestrandas Ana Regina e Tatiana e ao, agora mestre, Joanderson e aos demais que passaram pelo laboratório, por toda a parceria durante os experimentos.

À colega do mestrado Giuliane Moura, por toda amizade construída durante as idas e vindas da universidade e durante as horas de estudo para as atividades das disciplinas teóricas.

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, pela oportunidade de cursar o mestrado. Aos professores que transmitiram seus conhecimentos e experiência durante as disciplinas teóricas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A qualidade final do pão é influenciada pela atividade metabólica da microbiota do fermento natural, selecionada pela adaptação às condições durante os processos fermentativos. A inoculação direta de culturas puras com propriedades desejadas permite um maior controle da microbiota e, por isso, o interesse em seu uso tem crescido e requerido melhor entendimento sobre a diversidade genética e fenotípica de cepas para exploração em processos biotecnológicos. Esse estudo inovador, teve por objetivo caracterizar a diversidade microbiana de fermentos naturais coletados nas três diferentes regiões climáticas do estado da Paraíba (úmida, subúmida e semiárida) e avaliar a viabilidade biotecnológica das leveduras isoladas nesses fermentos. Foram coletadas 04 amostras de fermentos naturais, contemplando as 03 regiões climáticas do estado, representadas pelos municípios de João Pessoa, Solânea e Cajazeiras, respectivamente. As cepas de BAL e leveduras foram isoladas e identificadas por MALDI-TOF e as leveduras foram submetidas aos seguintes testes de viabilidade biotecnológica: fermentação de sacarose com formação de CO₂, formação de ácido, viabilidade em diferentes temperaturas e em diferentes concentrações de glicose e de pH. Foram obtidos 71 isolados, sendo 40 BAL e 31 leveduras. Das bactérias, 05 diferentes espécies foram identificadas: *L. plantarum* (19 isolados), *Levilactobacillus brevis* (08 isolados), *Companilactobacillus paralimentarius* (07 isolados), *Lactocaseibacillus paracasei* (01 isolado) e *B. cereus* (05 isolados). Dentre as leveduras, os 31 isolados foram identificados como *Saccharomyces cerevisiae* e submetidos aos testes de viabilidade biotecnológica, se destacando, a partir da Análise de Componentes Principais (PCA), as cepas *S. cerevisiae* 127 (Cajazeiras) e *S. cerevisiae* 57 (João Pessoa B), quanto a formação de CO₂, associado a viabilidade de crescimento em pH 3,5. Ambas cepas foram também identificadas pelo sequenciamento de DNA usando amplicons do marcador ITS como *S. cerevisiae* e foram inoculadas em massas fermentadas para realização de testes de atividade fermentativa: pH e acidez, viabilidade de BAL e leveduras, determinação do aumento de volume e propriedades de textura, durante 24 horas de fermentação, exibindo influência positiva nos parâmetros avaliados, com destaque para maior viabilidade da *S. cerevisiae* 57 após as 24 horas de fermentação. Com o presente estudo, foi possível identificar que a microbiota dos fermentos naturais coletados no estado da Paraíba é caracterizada pela abundância de BAL em relação as leveduras e que há a presença generalizada de *S. cerevisiae*, com destaque para as cepas *S. cerevisiae* 127 (Cajazeiras) e *S. cerevisiae* 57 (João Pessoa), com maior qualidade biotecnológica para possível uso como cultura starter.

Palavras-chave: fermento natural; ecologia microbiana; testes biotecnológicos; seleção de leveduras; cultura starter.

ABSTRACT

The final quality of the bread is influenced by the metabolic activity of the natural yeast microbiota, selected by adaptation to the conditions during the fermentation processes. The direct inoculation of pure cultures with desired properties allows greater control of the microbiota and, therefore, interest in its use has grown and requires a better understanding of the genetic and phenotypic diversity of strains for exploration in biotechnological processes. This innovative study aimed to characterize the microbial diversity of natural yeasts collected in the three different climatic regions of the state of Paraíba (humid, sub-humid and semi-arid) and evaluate the biotechnological viability of the yeasts isolated from these yeasts. 04 samples of natural yeast were collected, covering the 03 climatic regions of the state, represented by the municipalities of João Pessoa, Solânea and Cajazeiras, respectively. The BAL and yeast strains were isolated and identified by MALDI-TOF and the yeasts were subjected to the following biotechnological viability tests: sucrose fermentation with CO₂ formation, acid formation, viability at different temperatures and in different concentrations of glucose and pH. 71 isolates were obtained, 40 of which were BAL and 31 were yeast. Of the bacteria, 05 different species were identified: *L. plantarum* (19 isolates), *Levilactobacillus brevis* (08 isolates), *Companilactobacillus paralimentarius* (07 isolates), *Lacticaseibacillus paracasei* (01 isolate) and *B. cereus* (05 isolates). Among the yeasts, the 31 isolates were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and subjected to biotechnological viability tests, highlighting, from the Main Component Analysis (PCA), the strains *S. cerevisiae* 127 (Cajazeiras) and *S. cerevisiae* 57 (João Pessoa B), regarding the formation of CO₂, associated with growth viability at pH 3.5. Both strains were also identified by DNA sequencing using ITS marker amplicons as *S. cerevisiae* and were inoculated into fermented doughs to carry out fermentative activity tests: pH and acidity, BAL and yeast viability, determination of volume increase and properties of texture, during 24 hours of fermentation, showing a positive influence on the evaluated parameters, with emphasis on greater viability of *S. cerevisiae* 57 after 24 hours of fermentation. With the present study, it was possible to identify that the microbiota of natural yeasts collected in the state of Paraíba is characterized by the abundance of LAB in relation to yeasts and that there is a widespread presence of *S. cerevisiae*, with emphasis on the *S. cerevisiae* 127 strains (Cajazeiras) and *S. cerevisiae* 57 (João Pessoa), with higher biotechnological quality for possible use as a starter culture.

Keywords: natural yeast; microbial ecology; biotechnological tests; yeast selection; starters culture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1:	Fluxograma dos procedimentos metoloógicos utilizados.....	28
Figura 2:	Mapa Climatológico da Paraíba por Município.....	30
Figura 3:	Formação de biomassa durante a reativação das cepas isoladas	34
Figura 5:	Preenchimento do tubo de Durhan com CO ₂	36
Figura 5:	Teste de propriedades reológicas em texturômetro TA-XT2.....	40

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1:	Fluxograma dos procedimentos metoloógicos utilizados.....	52
Figura 2:	PCA das cepas de levedura em função das diferentes características Tecnológicas.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA ARTIGO

Tabela 1: Viabilidade celular e identificação microbiana por localidade de coleta.....	59
Tabela 2: Teste de capacidade de fermentação de sacarose com formação de CO ₂ e produção de ácido por leveduras isoladas de fermentos naturais de diferentes regiões climáticas do Estado da Paraíba.....	61
Tabela 3: Crescimento dos isolados de levedura em diferentes temperaturas.....	63
Tabela 4: Viabilidade celular e parâmetros de fermentação de massas (média±desvio-padrão) inoculadas com diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante 24 h de fermentação a 28 ± 0,5 °C.....	67
Tabela 5: Propriedades de textura de massas inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> 57, <i>S. cerevisiae</i> 127 e Controle durante fermentação.....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1. FERMENTAÇÃO NATURAL	17
2.2. DIVERSIDADE DA MICROBIOTA E ESTABILIDADE DO FERMENTO NATURAL.....	20
2.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL	23
2.4. POTENCIAL TECNOLÓGICO DE LEVEDURAS DE FERMENTAÇÃO NATURAL PARA A APLICAÇÃO EM ALIMENTOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO	28
3.2. DEFINIÇÃO DO MAPA CLIMATOLÓGICO DA PARAÍBA E SELEÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA.....	28
3.3. PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRA	31
3.4. ISOLAMENTO, SELEÇÃO E ABUNDÂNCIA DE BAL E LEVEDURAS NAS AMOSTRAS DE FERMENTO	33
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	33
3.5.1. Identificação dos isolados pela técnica de MALDI-TOF – “MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT”	34
3.5.2. Identificação por sequenciamento de DNA usando amplicons do marcador ITS, das cepas de leveduras selecionadas.	35
3.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DAS CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO FERMENTO NATURAL	36
3.6.1. Teste de Fermentação de sacarose com formação de CO ₂	37
3.6.2. Teste de viabilidade de leveduras sob diferentes temperaturas.....	38
3.6.3. Teste de produção de ácido	39
3.6.4. Teste de crescimento em diferentes concentrações de glicose	39
3.6.5. Teste de crescimento em diferentes concentrações de pH	39
3.7. TESTE DE ATIVIDADE FERMENTATIVA PARA AS CEPAS SELECIONADAS.....	40

3.7.1 pH e acidez.....	38
3.7.2 Viabilidade de BAL e leveduras.....	39
3.7.3 Avaliação do aumento de volume.....	39
3.7.4 Propriedades reológicas.....	39
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4. RESULTADOS.....	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE	45

1. INTRODUÇÃO

O consumo dos produtos de panificação está presente em todo o mundo e ao longo dos anos, tem-se aumentado o uso da fermentação natural para nesses produtos, uma vez que os pães elaborados por esse processo de fermentação, possuem melhor qualidade nutricional, sensorial e microbiológica quando comparados aos pães produzidos por fermentação direta, ou seja, com o uso de fermento biológico comercial (Arıcı *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2016; Sanchez-Adri *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2015).

De um modo geral, o que define o fermento natural é a fermentação espontânea de uma mistura de água e farinha por bactérias lácticas e leveduras, resultando em um ecossistema alimentar natural, sendo a principal diferença entre eles a diversidade microbiana de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras e eventualmente bactérias acéticas (Chavan; Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2014; Gobbetti *et al.*, 2016).

Para o desenvolvimento de um fermento natural são necessárias etapas contínuas de fermentação e propagação (alimentação), de forma que a primeira mistura de farinha e água é fermentada de forma espontânea à temperatura ambiente e, posteriormente, essa massa fermentada é utilizada como inóculo para fermentar uma nova massa subsequentemente, em um processo chamado de *backlopping* (Gobbetti *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2020; Minervini *et al.*, 2014). Esse processo não apenas acelera a fermentação, mas também contribui para a estabilidade da microbiota final do fermento (Gänzle, 2014).

O fermento natural possui um ecossistema específico, caracterizado por um ambiente de baixo pH e alta concentração de carboidratos, o que influencia a sua microbiota típica, caracterizada pela contagem de células bacterianas mais altas quando comparada com as leveduras, pois diferentes processos fermentativos vão selecionar microrganismos com diferentes padrões de crescimento (De Vuyst *et al.*, 2014), impactando na qualidade final do pão produzido, sendo necessário, assim, o controle da composição e atividade da fermentação da microbiota para o alcance da maturação e estabilidade do produto (Calvert *et al.*, 2021; Gänzle, 2014; Gänzle; Ripari, 2016).

Um maior controle da microbiota da fermentação é permitido através da inoculação direta de culturas puras com propriedades desejadas (Gänzle, 2014). De forma que o interesse em culturas iniciadoras para serem utilizadas em fermento natural tem crescido e requerido melhor entendimento sobre a diversidade genética e fenotípica de cepas para exploração em processos tecnológicos, tendo em vista que a padronização da qualidade do pão é influenciada pela comunidade microbiana (Gobbetti *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2019),

porém para a seleção de isolados relevantes para serem usados como cultura starters é essencial a caracterização biotecnológica das cepas selecionadas, baseando-se tanto na capacidade de crescimento como em suas condições de desempenho em massas fermentadas (Perricone *et al.*, 2014).

Sabe-se que a origem geográfica e a temperatura de propagação tem demonstrado forte influência na diversidade da microbiota do fermento (Calvert *et al.*, 2021; Pontonio *et al.*, 2015; Scheirlinck *et al.*, 2007), o que já foi amplamente estudado nos Estados Unidos, Ásia e em outros países, porém, no que se refere ao Brasil, a diversidade microbiana de fermento natural para pão ainda precisa de estudos complementares (Menezes *et al.*, 2020).

Acompanhando essa nova tendência da panificação, no Brasil e também no estado da Paraíba a comercialização de pães com fermentação natural vem se difundindo, mas ainda são escassos os estudos avaliando a microbiota dos fermentos elaborados nas diferentes regiões do Brasil e da Paraíba. No estado citado verificam-se três grupos climáticos distintos: úmido, sub-úmido e semi-árido (Francisco *et al.*, 2015). Dessa forma é interessante investigar se fermentos naturais coletados nas diferentes regiões climáticas do estado da Paraíba apresentam diferenças em sua diversidade e abundância microbiana, bem como se a partir desses fermentos é possível isolar e selecionar leveduras com boa adaptação ao fermento natural e com características tecnológicas desejáveis para aplicação em produtos que utilizam esse tipo de fermento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. FERMENTAÇÃO NATURAL

Ao longo da história, o pão e a fermentação sempre foram elementos centrais, refletindo a espiritualidade e a civilização humana e, até hoje, os produtos da panificação são fundamentais para o sustento do planeta (Arora *et al.*, 2021; Chavan; Chavan, 2011). Ao longo dos anos, o uso da fermentação natural tem aumentado em todo o mundo, uma vez que os pães produzidos por fermentação natural possuem melhor qualidade, quando comparados aos pães produzidos por processos de fermentação direta (por fermento biológico comercial), como menor índice glicêmico, melhor propriedades nutricionais além de uma maior vida útil (Arici *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2016; Sanchez-Adri *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2015).

O uso do fermento natural tem como vantagem a melhoria da consistência da massa, extensibilidade, elasticidade, além da redução ou eliminação do uso de conservantes devido a atividade antimicrobiana e antifúngica da massa, apresentando também melhoria das propriedades nutricionais, de textura e sensorial do pão. Esse impacto positivo é atribuído a microbiota do fermento, constituído por bactérias lácticas e leveduras (Sanchez-Adri *et al.*, 2023).

Do ponto de vista ambiental, a fermentação natural se torna uma alternativa sustentável, uma vez que favorece o uso de matérias primas não convencionais, como o de subprodutos da moagem de cereais, farelos, assim como de pseudocereais, no caso do uso da quinoa ou grão de bico, abrandando, assim, os problemas ambientais relacionados ao descarte de resíduos agroindustriais com alto teor de matéria orgânica (Arora *et al.*, 2021; Boukid *et al.*, 2018).

Em todo o mundo, o principal cereal utilizado para a elaboração de pães é o trigo, e, por este ser o principal ingrediente da massa do pão, as quantidades dos demais ingredientes são calculadas de forma proporcional sobre este, correspondendo a uma base 100%, sendo eles especialmente a água, o fermento e o sal, porém outros ingredientes podem ser adicionados nessa massa, como outros microrganismos, gordura e açúcar (Goesaert *et al.*, 2005; Mondal; Datta, 2008)

O fermento natural é definido pela fermentação espontânea, a partir de uma mistura de água e farinha, por bactérias lácticas e leveduras de forma que um ecossistema alimentar natural é representado a partir dessa fermentação (Chavan; Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2014; Gobbetti *et al.*, 2016; De Vuyst, Huys, Scheirlinck, Meulen, 2009). O que diferencia o

fermento natural do comercial é, principalmente, a microbiota, que é representada basicamente por bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (Chavan; Chavan, 2011) e eventualmente bactérias acéticas, onde são responsáveis pela acidificação e fermentação (Valmorri *et al.*, 2010).

Nesse processo de fermentação, a qualidade da farinha utilizada é fundamental, uma vez que esta matéria prima é uma importante fonte de nutrientes que influenciará a atividade das bactérias lácticas e leveduras, determinando, assim, a estabilidade das massas fermentadas (Tomic *et al.*, 2023; Calvert *et al.*, 2021; Chavan; Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2014).

Durante o processo produtivo, os padeiros utilizam da fermentação por propagação contínua para a obtenção de um maior controle da fermentação da massa. Esse processo também é conhecido como *backlopping*, que é a inoculação de uma porção de uma massa totalmente fermentada, com organismos em fermentação ativa, em um novo lote de massa, resultando em uma fermentação mais rápida deste novo lote. Esse processo, além de acelerar o processo fermentativo, também contribui para a seleção de microrganismos de crescimento rápido, resultando em um consórcio de microrganismos estável (Ganzlez, 2014). O uso de massa fermentada como agente fermentador é o tipo original da panificação para a fermentação natural, porém, a prática industrial atual emprega, além do uso da massa fermentada, o uso combinado com o fermento de padeiro, objetivando uma maior acidificação da massa e uma melhoria na qualidade final do pão (Ganzlez, 2014).

Essas massas fermentadas para uso como agente fermentador são renovadas a cada 6 a 12 horas e devem ser preparadas em uma faixa de temperatura de 20 a 30 °C, não devendo ser congeladas pois o congelamento inativa leveduras, ocasionando em uma perda de grande parte da atividade fermentadora, sendo assim, as massas devem continuar recebendo um refresco contínuo, mesmo quando não estiver ocorrendo produção de pães na padaria (Ganzlez, 2014). Nesse processo, alguns ingredientes adicionais podem ser utilizados, aumentando os nutrientes disponíveis para os microrganismos, podendo ser utilizado nesse processo o suco de uva, mel ou açúcar, por exemplo (Minervini *et al.*, 2014).

Os fermentos naturais podem ser classificados em três tipos, baseado na tecnologia de produção e no seu inóculo: o tipo I, ou tradicional, tem a sua propagação contínua em temperatura ambiente (20 - 30 °C) e se baseia na reinoculação repetida de um novo lote de farinha e água na massa anterior, chamada de massa mãe; o tipo II, ou industrial, é incubado em altas temperaturas (maior que 30 °C), tendo um maior teor de água e um maior tempo de fermentação, contribuindo para uma maior acidificação e sabor da massa, sendo o resultado da adição de uma cultura inicial à mistura de farinha e água; e o tipo III, que são preparações secas das massas industriais, sendo a maneira mais conveniente de introduzir o sabor autêntico

do pão na indústria de panificação de alta tecnologia atual (Sevgili *et al.*, 2023; Calvert *et al.*, 2021; Chavan; Chavan, 2011; DeVuyst *et al.*, 2014). Nos tipos II e III, há a necessidade da utilização do fermento comercial (*S. cerevisiae*) como agente de fermentação, enquanto que no tipo I, não há a necessidade dessa adição (Chavan; Chavan, 2011), porém pode haver a adição de outras matérias primas naturalmente ricas em microrganismos, como frutas ou iogurtes, por exemplo, de forma que a seleção da microbiota da massa fermentada vai ocorrer espontaneamente durante a propagação diária (Sevgili *et al.*, 2023), ocorrendo a manutenção de suas características e resultando em cepas mais adaptadas ao ecossistema do fermento natural (De Vuyst *et al.*, 2013).

Diante da história do uso da massa fermentada ao longo dos anos, assim como da diversidade geográfica na sua prática e das variações nos processos industriais para a produção dos pães por fermentação natural, algumas variações são encontradas, inclusive na diversidade da microbiota da massa e, consequentemente, na qualidade final do pão produzido. Porém, todos esses processos, embora possuam diferenças específicas de cada região (como o uso da farinha utilizada, por exemplo), dependem da propagação contínua da massa para manter leveduras e bactérias lácticas em um estado contínuo, de forma que há uma seleção de uma microbiota dessa fermentação, mostrando uma convergência entre os diferentes países ou continentes e uma alta estabilidade do processo fermentativo ao longo dos anos (Ganzlez, 2014).

Em estudo realizado por Arora *et al* (2021), foi identificado que o tempo médio realizado para fermentação natural é de quatro horas, podendo variar entre 1 a 8 horas, com a utilização mista de fermento comercial. O tempo de fermentação é definido para atingir a acidificação adequada, a densidade das bactérias lácticas e leveduras e o poder de fermentação. Esse tempo pode influenciar na distribuição das células, de forma que, quanto mais longo esse processo, menor distribuição dessas células (Le-Bail *et al.*, 2009). Quando o tempo de fermentação se estende por mais de 8 a 12 horas, haverá um desenvolvimento maior da microbiota láctica, que crescem até atingirem contagens elevadas na massa e o pH cai para valores inferiores a 4,5, resultando em uma acidificação moderada da massa (Ganzlez, 2014).

Quanto a temperatura de fermentação, a média mais comumente identificada foi de 30 °C, com variações de 22 °C a 40 °C, o que impacta nas características bioquímicas e sensoriais gerais do produto final (Vrancken *et al.*, 2011). Quanto ao percentual de inóculo, encontrou-se uma variação média de 10 a 25%, porém alguns estudos também demonstraram uma porcentagem discrepante, considerando 5 ou até 50%, o que influencia não apenas a taxa de fermentação, mas também a síntese de exopolissacarídeos, teor de vitaminas e atributos

sensoriais e reológicos (Bartkiene *et al.*, 2017; Kaditzky; Vogel, 2008; Katina *et al.*, 2006).

O ecossistema do fermento natural é composto por carboidratos complexos, sobretudo o amido, que é parcialmente hidrolisado em mono e dissacarídeos. As proteínas durante o processo fermentativo, são também hidrolisadas em nutrientes mais facilmente utilizáveis, como peptídeos e aminoácidos livres. Embora seja um ecossistema rico em nutrientes, do ponto de vista microbiológico o fermento é específico e estressante, pois se caracteriza pelo alto teor de carboidratos concentrados, um baixo pH e limitação de oxigênio. Essas condições favorecem que as bactérias lácticas e as leveduras superem outros microrganismos e populações (Gobbetti *et al.*, 2016; Minervini *et al.*, 2014).

As bactérias lácticas são responsáveis pela acidificação e degradação proteica da massa, contribuindo positivamente para a qualidade final do pão e seu tempo de prateleira (Illueca *et al.*, 2023) e atividade de fermentação depende principalmente do metabolismo das leveduras (Sanchez-Adri *et al.*, 2023).

Nesse contexto, conhecer a diversidade da microbiota do fermento natural se torna essencial para entendimento da relação entre as microbiotas e a qualidade final do produto, contribuindo, assim, para a busca de uma padronização na produção e aprimoramento dos produtos da panificação.

2.2. DIVERSIDADE DA MICROBIOTA E ESTABILIDADE DO FERMENTO NATURAL

A diversidade da microbiota é considerada um dos principais fatores que influenciam o sabor final do produto, pois as atividades metabólicas que ocorrem na massa fermentada geram elevado número de compostos voláteis e precursores de aroma (Ganzle; Zheng, 2019), como observado em um estudo conduzido por Kaseleht *et al.* (2011), que comparou massas fermentadas feitas por 09 diferentes tipos de bactérias lácticas e constatou que a diferença nos compostos voláteis da massa fermentada e suas substâncias aromatizantes era justamente devido a diferença das cepas.

Existe uma grande diversidade da composição taxonômica da microbiota de bactérias lácticas encontradas nas massas fermentadas em todo o mundo, uma vez que há uma grande variedade de cereais e condições de fermentação distintas e, a cada ano, o número de novas espécies de *Lactobacillus* no fermento natural tem aumentado constantemente (Scheirlinck *et al.*, 2007).

Para conhecer e controlar os processos da fermentação natural, é importante

compreender a origem e variedade das cepas de BAL na fermentação espontânea (Scheirlinck *et al.*, 2007). No início da fermentação, a população microbiana reflete a da farinha, caracterizada pela concentração não maior que 5 log UFC/g de BAL, Gram-positivos, como *Bacillus* sp., Gram-negativos, como *Pseudomonas*, além de *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (Minervini *et al.*, 2014), com a adição da água na farinha, há uma redução do potencial redox da massa, contribuindo para o crescimento de anaeróbios facultativos e de BAL, que por serem adaptadas a mono e dissacarídeos, produzem ácido lático e ácido acético, ocasionando na redução do pH da massa e inibindo o desenvolvimento o crescimento das *Enterobacteriaceae* e, a medida que o processo fermentativo aumenta, as BAL e leveduras vão se adaptando cada vez mais às condições ambientes e dominando o ambiente maduro em concentrações de 6 a 9 log UFC/g e 5 a 8 log UFC/g, respectivamente (Gänzle; Ehmann; Hammes, 1998; Gänzle; Gobetti, 2013; Minervini *et al.*, 2014).

A diversidade das BAL se relaciona com a diversidade dos parâmetros gerais do crescimento e estresse, logo, os diferentes processos fermentativos vão selecionar organismos com diferentes padrões de crescimento. Quando ocorre o processo de *backslopping*, que consiste na inoculação de farinha e água com uma alíquota de massa previamente fermentada (De Vuyst *et al.*, 2014; Minervini *et al.*, 2014), há um domínio da microflora caracterizada pela fermentação espontânea, havendo o domínio dos *Lactobacillus* homofermentativos, mas também a presença de heterofermentadores (De Vuyst; Neysens, 2005).

Ao longo do processo fermentativo, a microbiota que inicialmente representava a da farinha, composta por bactérias lácticas, Gram-positivos (por exemplo, *Bacillus* sp.), Gram-negativos (por exemplo, *Pseudomonas* sp.), *Enterobacteriaceae*, leveduras e bolores, se modifica devido o processo natural de seleção mediante às modificações no meio, como aumento da acidez e redução do pH, por exemplo (Minervini *et al.*, 2014).

No fermento tipo I, ocorrerá uma seleção dos organismos que crescem rapidamente em substratos cereais, uma vez que essa massa é caracterizada pelo retrocesso frequente para atingir a fermentação sem o uso de fermento comercial e nela, haverá a predominância dos *Lactobacillus sanfranciscensis*. Já no fermento tipo II, serão frequentemente encontrados organismos tolerantes a ácidos, como *L. pontios*, *L. fermentum* e *L. reuteri*, uma vez que essa massa é caracterizada pelo longo tempo de fermentação e temperatura mais elevada (De Vuyst; Neysens, 2005; Gänzle; Gobetti, 2013; Vera *et al.*, 2012).

Um fermento maduro é aquele que possui densidades celulares constantes de BAL e leveduras, acidificação e capacidade de fermentação e o tempo de sua obtenção vai variar de cinco a sete dias, dependendo do tipo da farinha (Ercolini *et al.*, 2013). A medida que um

fermento amadurece, a diversidade de gêneros bacterianos na massa fermentada diminui (Minervini *et al.*, 2014), porém a diversidade de linhagens e espécies que persistem ao processo fermentativo, em especial as BAL, podem aumentar ao longo do tempo (Gänzle; Ripari, 2016; Gobbetti *et al.*, 2016).

O ecossistema da massa fermentada abrange não apenas as bactérias lácticas e as leveduras, mas também as bactérias do ácido acético (Sanchez-Adri *et al.*, 2023), que embora menos estudadas, quando abundantes, se correlacionam negativamente com a capacidade fermentativa do fermento, provavelmente devido a produção do ácido acético, assim como pela inibição das leveduras (Landis *et al.*, 2021).

A biodiversidade de BAL no fermento pode ser considerada restrita ou diversa. Quando há uma grande biodiversidade, percebe-se diferentes consórcios microbianos e particulares interações, já no caso de uma biodiversidade restrita, há um número limitado de espécies de BAL, que pode ocasionar a ocorrência de cepas oportunistas, que acabam desempenhando um papel na fermentação da massa ou ocorrer como contaminantes (De Vuyst; Neysens, 2005), quanto as leveduras, um estudo realizado por Vrancken *et al.* (2010), o qual considerou mais de 12 trabalhos estudados, constatou que um único fermento pode abranger uma ou mais espécies de leveduras, sendo a *C. humilis*, *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* as mais frequentes. Outras leveduras podem ser encontradas em massas fermentadas, como às pertencentes às espécies *Kazachstania humilis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii* e *Candida glabrata*. Porém algumas massas estáveis podem conter apenas uma ou duas espécies (De Vuyst *et al.*, 2016).

Quanto as leveduras utilizadas na panificação, estas precisam apresentar como características principais uma adequada produção de gás, bem como uma tolerância a uma ampla faixa de pH, temperatura e concentrações de sal e açúcar. A *S. cerevisiae* reúne essas características desejáveis e, por isso, seu uso é bastante comum pela indústria da panificação (Condessa, 2019), porém esse uso generalizado contribui para uma limitação da complexidade sensorial do produto, assim como uma redução na aplicação e uso de outras leveduras não convencionais na indústria (Heitmann, Zannini, Arent, 2015; Aslankoohi *et al.*, 2016).

Com a fermentação ocasionada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, há uma conversão do açúcar em etanol, dióxido de carbono e água e uma expansão do gás carbônico e do vapor d'água pelo aumento da temperatura, ocasionando na aeração da massa, que é caracterizada pelos núcleos de bolhas de ar no miolo do pão (Mondal; Datta, 2008; Shehzad *et al.*, 2012).

A inoculação direta de culturas puras com as propriedades desejadas, permite um maior

controle da microbiota da fermentação e, por isso, o interesse em culturas iniciadoras para utilizar em fermento natural tem crescido e requerido melhor entendimento sobre a diversidade genética e fenotípica de cepas para exploração em processos biotecnológicos, sendo fundamental um profundo conhecimento dos fatores que determinam a estabilidade da microbiota e de seu metabolismo para que ocorra a adaptação dos processos artesanais a novos produtos e tecnologias, pois tanto a estrutura da massa fermentada, como a qualidade final do pão, são influenciados pelas interações microbianas que ocorrem durante o processo fermentativo (Landis *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2019).

2.3. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROPAGAÇÃO DO FERMENTO NATURAL NO DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS DURANTE PROCESSO FERMENTATIVO

Fatores endógenos (como os carboidratos, fontes de nitrogênio, atividade enzimática, lipídios e ácidos graxos) e exógenos (como a temperatura, número de etapas do processo de fermentação e a presença de oxigênio), influenciam a microbiota do fermento natural e as características dos produtos de panificação fermentados (De Vuyst *et al.*, 2014; Minervini *et al.*, 2014), até o local exato onde o fermento natural é fabricado ou armazenado, assim como as diferentes regiões, topografias e métodos de processamento, pode afetar essa microbiota, de forma que a origem geográfica e a temperatura de propagação tem demonstrado forte influência nesta diversidade (Calvert *et al.*, 2021; Pontonio *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2022).

No contexto da fermentação natural, é preferível diferenciar esses fatores endógenos e exógenos em parâmetros específicos, como pH e temperatura, e parâmetros que não estão totalmente sob o controle de quem realiza diariamente a propagação da massa fermentada, tendo em vista que as interações no fermento natural são complexas, resultando de operações manuais e atividades microbianas, caracterizando um ecossistema peculiar (De Vuyst *et al.*, 2014; Minervini *et al.*, 2014), porém não se pode ignorar o fato de que as múltiplas influências dos parâmetros influenciam no crescimento microbiano e que o uso contínuo dos mesmos parâmetros tecnológicos contribui para a adaptação às condições dos processos e, conseqüentemente, a seleção das cepas microbianas presentes no fermento (Scheirlinck *et al.*, 2007).

A temperatura, tanto de fermentação quanto de armazenamento, é um fator determinante da comunidade dinâmica e cinética de metabólitos no processo fermentativo, sendo responsável por 44% das características físicas, químicas e voláteis de um pão

fermentado, assim como um dos principais fatores responsáveis pelo resultado final da composição da microbiota do fermento natural (Siepmann *et al.*, 2019; Minervini *et al.*, 2014).

A temperatura se relaciona de forma inversa ao tempo de fermentação, de forma que quanto maior a temperatura, menor será o tempo de fermentação e isso ocorre porque ela influencia a composição microbiana do fermento, pois as leveduras, principais envolvidos no processo fermentativo, possuem temperatura ótima de crescimento de 20 a 26 °C, que é inferior as das bactérias lácticas (30 a 40 °C) (Gänzle *et al.*, 1998). A comunidade microbiológica do fermento, pode ser influenciada, também, pelas mudanças sazonais ou diárias de temperatura durante a propagação do fermento (De Vuyst *et al.*, 2014; Gänzle; Ripari, 2016).

Em temperaturas mais baixas, há um favorecimento do crescimento de levedura, com produção de etanol e formação de sabor, enquanto que em condições de temperatura mais elevadas, em uma fermentação a 37 °C, por 24 horas, há uma predominância das BAL homofermentativas (e facultativamente heterofermentativas), tornando o ambiente mais ácido pela produção do ácido láctico, reduzindo assim a capacidade de multiplicação das leveduras, o que reflete uma competitividade destas com as bactérias lácticas ou uma limitação de crescimento das leveduras devido a elevada temperatura (De Vuyst *et al.*, 2014; Vrancken *et al.*, 2011).

Lattanzi *et al.* (2013) afirmam que as condições ambientes, à medida que se modificam, tornam o ambiente mais seletivo para o desenvolvimento de determinadas espécies de microrganismos, tendo como consequência a variações na composição microbiana dos fermentos e diferenças nas espécies que predominam nesses processos fermentativos.

Menezes *et al.* (2020) estudaram a influência da mudança da temperatura durante a propagação do fermento sob a dinâmica do ecossistema em massas fermentadas no Brasil, pela modificação da temperatura durante a propagação da massa, a fim de avaliar a mudança da comunidade bacteriana durante esse processo. No estudo, foi constatado que a massa fermenta, ao ser submetida à alteração da temperatura, mesmo sem alteração da composição da matriz, gerou uma modificação na composição da microbiota final da massa, de forma que constatou que a temperatura de 21 +/- 1 °C pode ser considerada a mais adequada para a propagação da massa fermentada no Brasil, no que se refere ao comportamento bacteriano. O estudo destaca que considerar apenas um parâmetro por vez não é suficiente para explicar completamente a dinâmica da massa fermentada, uma vez que o crescimento microbiano é o resultado de múltiplas combinações de diferentes parâmetros, propondo, ainda, a importância de mais estudos sobre a influência das diferentes condições de processamento nas

composições e dinâmicas das comunidades microbianas nas massas fermentadas em diferentes partes do mundo, como fonte de microrganismos com novas potencialidades fermentativas.

Em outro estudo, Abdel-Rhman *et al.* (2019), demonstraram que a sucessão final da microbiota da massa fermentada foi diferente nas variações das temperaturas entre 23 e 30 °C, de forma que a proporção de espécies bacterianas em massas de centeio propagadas sem controle de temperatura foi afetada pelas flutuações sazonais de temperatura.

Landis *et al.* (2021) afirmam que os principais fatores mais descritos como os que impulsionam a biodiversidade da massa fermentada são a localização geográfica e as práticas de manutenção da massa. Em seu estudo, ele constatou que de fato as massas fermentadas na mesma região podem ter composição semelhantes, devido a dispersão restrita dos microrganismos e também devido aos microclimas regionais, porém ele ressalta que essa influência da estrutura geográfica não foi tão estudada na escala continental e acredita que a diversidade das culturas starters depende mais de como a cultura foi produzida e mantida ao longo dos anos que da relação com a localização geográfica.

Para a realização deste estudo, fermentos naturais coletados de diferentes regiões climáticas da Paraíba foram caracterizados quanto a variedade da microbiota. O estado da Paraíba, apresenta uma área de 56.372 km² e geograficamente se localiza na região Nordeste do Brasil, limitando-se ao norte com o estado do Rio Grande do Norte; a leste, com o oceano Atlântico; a oeste, com o estado do Ceará e, ao sul, com o estado de Pernambuco (Francisco *et al.*, 2010).

Em geral, o clima da Paraíba é especializado conforme índices de pluviosidade e umidade, sendo dividido em três regiões climáticas: a úmida, com média de temperatura superior a 18° C em todos os meses, tendo 3 meses secos; a sub-úmida, com média de temperatura superior a 18 ° C em todos os meses, e tendo de 4 a 5 meses secos e, por fim, a semi-árida, com média de temperatura mensal superior 18° C, com 7 a 8 meses secos (Francisco *et al.*, 2015).

Para esse estudo, fermentos naturais das três regiões climáticas foram coletados, permitindo a abertura de um horizonte investigativo acerca da influência do clima nos processos de fermentação natural.

O comportamento das BAL durante o processo fermentativo, assim como sua caracterização é algo bastante difundido na literatura, enquanto que o aprofundamento na caracterização das propriedades biotecnológicas das leveduras é algo menos estudado, por isso, esse estudo buscou se deter à caracterização das propriedades biotecnológicas das leveduras

isoladas nos fermentos coletados das diferentes regiões climáticas do estado da Paraíba, de forma, a identificar, dentre as cepas isoladas, aquelas com uma maior adaptação ao ambiente característico de um fermento natural maduro, possibilitando um uso futuro destes isolados como culturas starters.

2.4. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS DE FERMENTAÇÃO NATURAL PARA A APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Há uma tendência do desenvolvimento de culturas starters para a otimização da fermentação natural (Ganzle; Quiao; Bechtner, 2023). Essas culturas starters são microrganismos concentrados para inoculação de massas ácidas, que podem ser secas, em pastas ou líquidas (Ganzlez, 2014). Essa preparação microbiana, para ser considerada cultura starter, precisa ter pelo menos um microrganismo a ser adicionado em uma matéria prima e produzir um alimento fermentado, de forma que durante a condução dessa fermentação os critérios de segurança alimentar, prazo de validade e viabilidade tecnológica e econômica sejam garantidas (Champagne; Mollgaard, 2008). Essas cepas devem ser cuidadosamente selecionadas, pois podem ocasionar diferentes resultados, por isso, é essencial o conhecimento sobre a diversidade genética e fenotípica de cepas para a exploração nos processos biotecnológicos (Vancanneyt *et al*, 2007).

O isolamento e a identificação de bactérias lácticas e de leveduras de massas fermentadas tradicionais, permitem o seu uso seguro como cultura starter (Landis *et al.*, 2021). Com o uso de cultura starter, seguida do *backlopping*, pode haver um aceleração do processo, melhorando, também, a capacidade de acidificação e sabor da massa (Siragusa *et al.*, 2009). Porém, para que este objetivo seja alcançado, é necessário um rígido controle no processo fermentativo, para garantir uma microbiota estável e evitar contaminações (Venturi *et al.*, 2012), por isso, a produção da massa fermentada em nível industrial é difícil e limitada (Brandt, 2019).

Algumas vezes, no processo do uso dessas culturas starters, pode haver uma competição entre a microbiota de crescimento espontâneo e a cultura inicial do fermento, que pode acabar sendo eliminada nesse processo devido a falta de adaptação da cultura inicial às condições específicas do ecossistema do fermento natural (Minervini *et al.*, 2010; Moroni *et al.*, 2010; Siragusa *et al.*, 2009). Dessa forma, os starters naturais utilizados devem possuir alta capacidade fermentativa e devem ser robustos o suficiente para garantir sua viabilidade e desempenho em diferentes processos de massa fermentada (Sanchez-Adri *et al.*, 2023).

Durante o processo de *backlopping*, há a seleção natural dos microrganismos mais adaptados às condições da massa fermentada, destacando-se a sobrevivência das bactérias lácticas e das leveduras (Khlestkinet *al.*, 2022). Vrancken (2010) ressalta que diversos estudos tem demonstrado a identificação da diversidade e das espécies de bactérias lácticas em fermentos naturais, porém menos estudos tem focado na identificação de leveduras nesses fermentos e ele considera que o principal motivo seja devido ao uso de leveduras de panificações comerciais como cultura inicial, como ocorre com o uso da *Saccharomyces cerevisiae*, porém, o mesmo ressalta que é possível que uma variedade de leveduras possa dominar o processo fermentativo espontâneo, contribuindo com a diversidade e a originalidade dos produtos de massa fermentada.

A identificação e classificação de leveduras apenas por características morfológicas e fisiológicas, pode resultar em resultados incertos e, por isso, métodos bioquímicos simplificados tem sido utilizados, tendo como base a fermentação e as características de assimilação de substrato, uma vez que as leveduras apresentam uma vasta variação na capacidade de fermentar e assimilar açúcares (Guillamón; Barrio, 2017), porém apenas esses métodos convencionais não são confiáveis para a descrição de novas espécies, sendo o uso do sequenciamento do gene 16S rRNA uma alternativa confiável para a classificação desses microrganismos (Vancanneyt *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, houve o desenvolvimento de ferramentas utilizadas para avaliar o potencial metabólico de cepas, espécies e gêneros específicos de microrganismos, assim como a identificação das diversas características ecológicas e metabólicas específicas para o uso como cultura starters (Ganzle, Qiao, Bechtner, 2023), porém as populações de leveduras em massa fermentada tem sido mal caracterizadas quando aos atributos relevantes para a panificação como a atividade de fermentação em um ambiente estressante (Sanchez-Adri *et al.*, 2023), ainda que se saiba que estas possuem um metabolismo fermentativo rápido e são resistentes a muitos fatores de estresse na panificação (Sevgili *et al.*, 2023).

Não apenas as características biotecnológicas devem ser consideradas na seleção de uma cultura starter, mas, também, seu status de presunção qualificada de segurança, de forma que os microrganismos selecionados não produzam compostos tóxicos ou disseminem resistência a antibióticos, contribuindo para a segurança dos alimentos (Bevilacqua *et al.*, 2012).

Os esforços de bioprospecção tem contribuído com a aceleração do isolamento de microrganismos de diferentes ambientes ecológicos, possibilitando que essa diversidade de

espécies sejam utilizados nos processos de fermentação (Peter; Chiara; Friedrich, 2018). Após a identificação e classificação de espécies de leveduras de fermentação de cereais, são identificadas características funcionais desses microrganismos, objetivando a exploração plena do seu potencial, por meio de ciências básicas aplicadas (Palla *et al.*, 2019).

O uso de leveduras tem se mostrado seguro, tanto na panificação, como na produção de cervejas e, por isso, as leveduras são relevantes em setores comerciais importantes, como na produção de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e enzimas industriais (Perricone *et al.*, 2014). Quanto mais adaptada à massa fermentada, mais resistente a levedura será para suportar as condições de estresse encontrada, como a falta de nutrientes e o estresse causado pelo ácido, temperatura e pressão osmótica (De Vuyst *et al.*, 2016).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais comum no uso para a fermentação de alimentos (Perricone *et al.*, 2014), devido seu curto período de replicação, alta eficiência de replicação e pequeno tamanho do genoma (Gallone *et al.*, 2016), além de sua tolerância à vários estresses, como baixo pH, estresse osmótico e nutricional, além de seu potencial fermentativo (Warringer *et al.*, 2011).

Estudos ressaltam que, no processo industrial, mesmo quando há o uso de mesmas espécies de leveduras, o processo fermentativo pode apresentar grandes diferenças, devido ao fato de que elas podem se adaptar às condições do processo, através de fenômenos como multiplicação de genes ou até mesmo de cromossomos inteiros, resultando em diferenças tanto fisiológicas, como até mesmo genéticas (Marullo *et al.*, 2004; Querol *et al.*, 2003), como foi observado em estudo realizado por Bigey *et al.* (2021), no qual foram comparadas cepas de *S. cerevisiae* de fermento comercial com cepas de *S. cerevisiae* isoladas de massas fermentadas, sendo constatado que as cepas comerciais apresentavam uma latência de fermentação mais curta, porém, cepas isoladas de massa fermentada, pareciam melhor adaptadas as massas fermentadas, de forma que estas apresentaram, quando comparadas em termos de produção de CO₂, um tamanho populacional superior no final da fermentação, além de que apresentaram melhor crescimento em maltose que as cepas comerciais, sugerindo que, de fato, isolados de massas fermentadas estão mais adaptadas ao ambiente da fermentação e possuem recursos genéticos interessantes para melhorar os processos fermentativos de produção de pão por fermento natural.

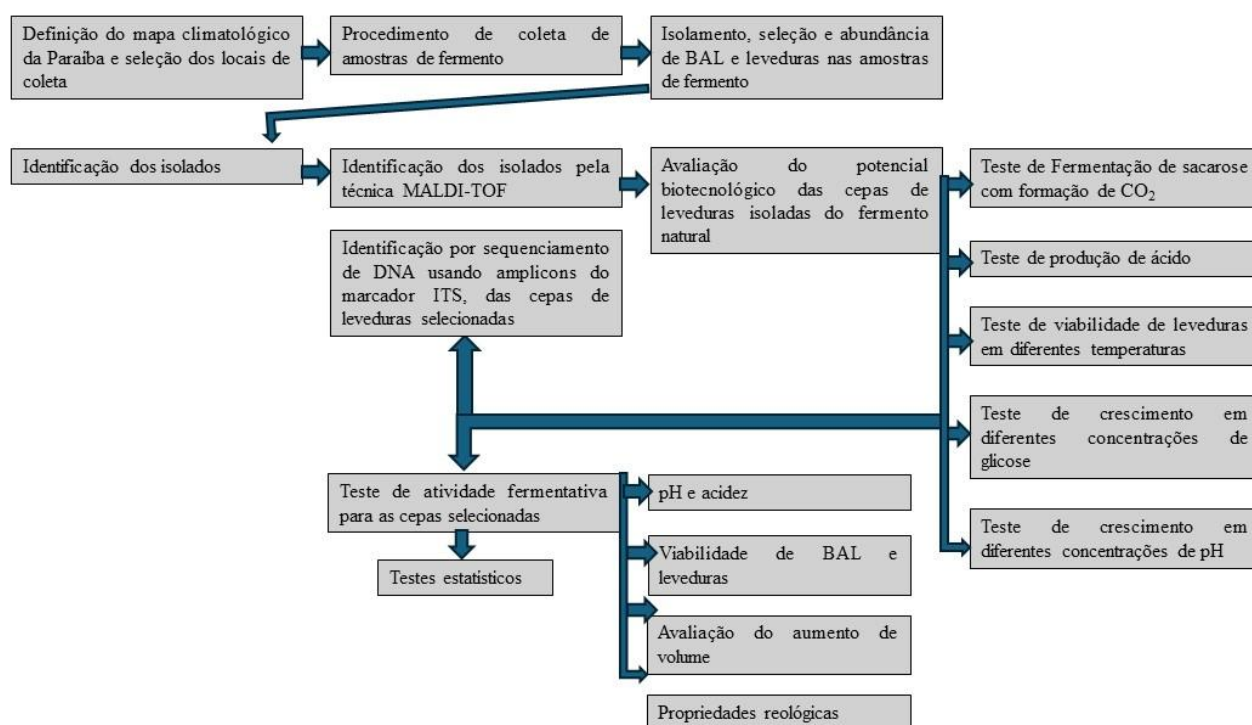
Nesse contexto, o interesse pelos alimentos tradicionais torna a população de *S. cerevisiae* um excelente modelo de estudo nos impactos das práticas artesanais e industriais na evolução da adaptação das leveduras ao processo fermentativo (Bigey *et al.*, 2021). Sendo assim, dentro dos microrganismos isolados dos fermentos naturais coletados em diferentes

regiões climáticas do estado da Paraíba, as cepas das leveduras tornaram-se o objeto de aprofundamento deste estudo, sendo submetidas a testes de viabilidade biotecnológica para seleção das cepas melhores adaptadas às condições inerentes ao fermento natural, as quais foram comparadas com uma cepa isolada a partir de fermento comercial biológico, possibilitando pesquisas futuras para aplicação destes isolados, tanto na panificação, como em outras matrizes alimentares com características fermentativas semelhantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse capítulo realizará o detalhamento dos procedimentos metodológicos e materiais utilizados nesta pesquisa. As etapas da pesquisa foram organizadas, conforme fluxograma apresentado a seguir (**figura 1**).

Figura 1: Fluxograma dos procedimentos metodológicos utilizados na pesquisa



Fonte: autoria própria (2024).

3.1. LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (análises microbiológicas, pré identificação dos isolados, testes biotecnológicos e testes fermentativos), vinculado ao Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional – CTDR, da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório Multiusuário (identificação por MALDI-TOF), vinculado ao Departamento de Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba; Neoprospecta Microbiome Technologies (identificação por sequenciamento de DNA das leveduras

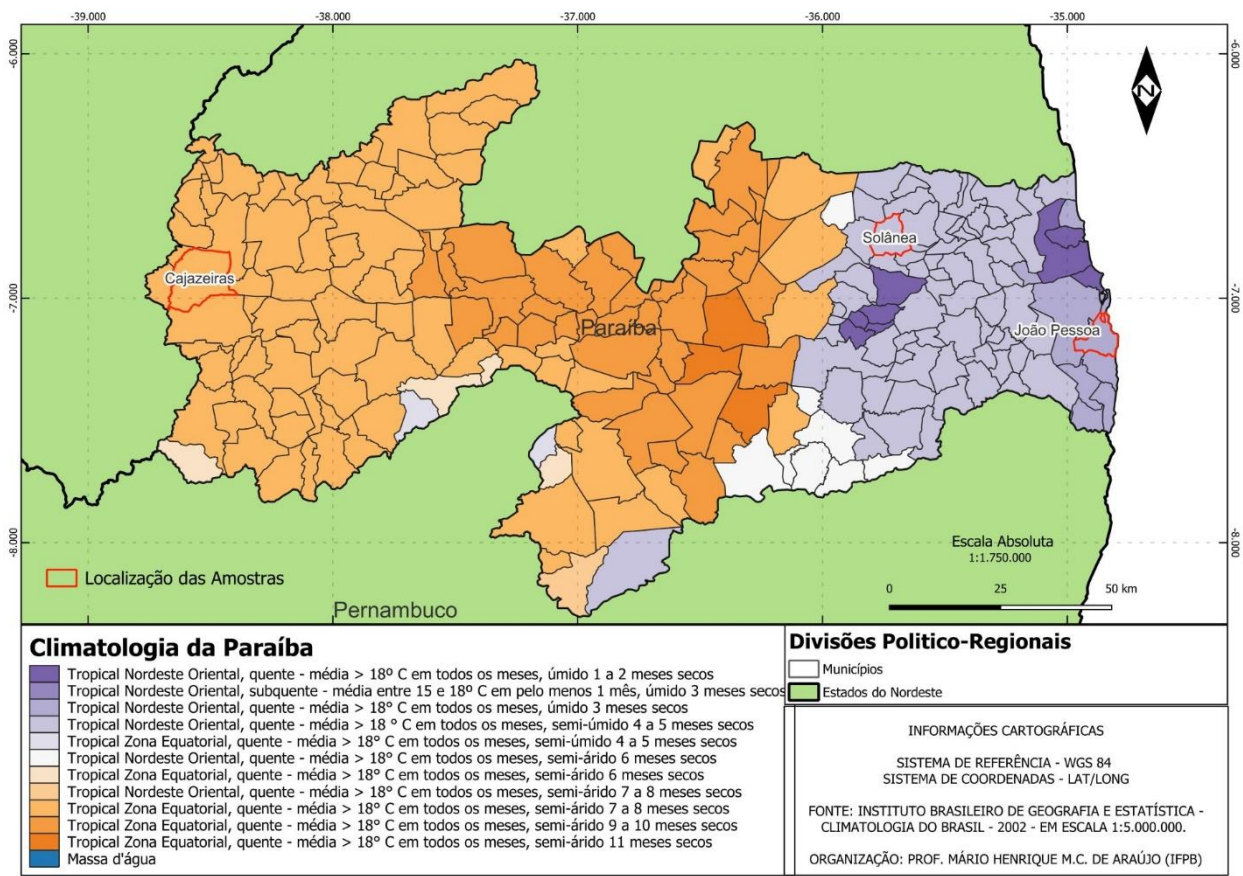
selecionadas).

3.2. DEFINIÇÃO DO MAPA CLIMATOLÓGICO DA PARAÍBA E SELEÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

Considerando o impacto da região geográfica na microbiota do fermento natural, fez-se necessário o levantamento das informações climatológicas do estado da Paraíba para melhor compreensão do comportamento climático nos diferentes municípios do Estado. Para isso, foram consultadas as bases cartográficas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que disponibiliza informações territoriais do nosso país em suas plataformas digitais, sendo confeccionado, a partir dessas informações, um mapa climatológico por município do estado da Paraíba. Para a confecção do mapa climatológico por município, foram tomados como base os vetores climatológicos do Mapa de Clima, em escala 1:5.000.000, que representam as diferentes zonas climáticas do território brasileiro agrupadas por temperatura e umidade. Utilizando o QGIS, um Sistema de Informações Geográficas livre e de código aberto, através do qual foi organizado, inicialmente, o mapa climatológico do estado da Paraíba.

Em seguida, os vetores dos municípios foram acrescentados ao mapa e por meio de ferramentas de intersecção espacial com herança de atributos, utilizando como critério a maior sobreposição do clima no município, cada município foi associado à característica climática predominante, resultando no mapa climatológico por município, como pode ser visto na **Figura 2**.

Figura 2 - Mapa Climatológico da Paraíba por Município



Fonte: autoria própria (2024).

Assim, foi possível estabelecer em cada município uma característica de clima que demonstrasse variabilidade ao longo do estado e possibilitasse uma melhor definição das localidades onde deram-se as coletas.

Para esse estudo, foram escolhidos municípios com características climatológicas diferentes. O primeiro município foi João Pessoa, localizado em uma região considerada como úmido, com média de temperatura superior a 18 °C em todos os meses, e 3 meses secos. O segundo município escolhido foi Solânea, inserido numa região de clima considerado como semi-úmido, com média de temperatura superior a 18 °C em todos os meses, e de 4 a 5 meses secos. Por fim, foi escolhido o município de Cajazeiras, inserido numa região de clima considerado quente semi-árido, com média de temperatura mensal superior 18 °C, e 7 a 8 meses secos.

Dentro dos municípios selecionados, foram selecionadas quatro padarias, duas delas localizadas na cidade de João Pessoa, região úmida da Paraíba; uma em Solânea, região semi-

úmida e a última em Cajazeiras, região semi-árida do estado. Segundo o IBGE, esses municípios fazem parte da mesorregião da Zona da Mata, Agreste e Sertão paraibano, respectivamente.

3.3. PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRA

Após contato com cada padaria, as amostras de fermento natural foram coletadas (em duplicata), armazenadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos – CTDR/UFPB para análise imediata. As coletas foram realizadas todas nos meses de novembro / dezembro, meses com clima seco no nordeste brasileiro

Foram coletadas cerca de 100 g da amostra de fermento natural, cerca de oito horas após a última propagação, em vidros esterilizados e bem fechados. Cada vidro foi identificado e rotulado com as características da coleta (data, hora, municípios, fornecedor e etc.).

3.4. ISOLAMENTO, SELEÇÃO E ABUNDÂNCIA DE BAL E LEVEDURAS NAS AMOSTRAS DE FERMENTO

Para cada amostra coletada, 25 g foram pesadas e diluídas em 225 mL de água peptonada esterelizada, seguido de diluição seriada ($1:9$, 10^{-1} a 10^{-5}). Alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Man, Rogosa and Shape (MRS) (HiMedia, Mumbai, India) para o isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL) e ágar YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) para as leveduras. Após o crescimento microbiológico, as placas foram avaliadas quanto às morfologias das colônias presentes e, em seguida, cinco colônias de cada morfologia (formato de coco, cocobacilos e/ou bacilos) foram coletadas e isoladas novamente no meio de cultura correspondente ao meio do plaqueamento de origem, conforme sugerido por Siragusa *et. al.* (2009), com adaptações.

Após o isolamento, as colônias de leveduras foram incubadas em 25 °C ($\pm$ 5 °C) e as de bactérias em 45 °C ($\pm$ 5 °C) e, posteriormente, foram submetidas aos testes fenotípicos de pré- identificação. Cada isolado foi submetido ao teste de coloração de gram e avaliação da atividade catalase. Foram selecionados os isolados de bactérias pré-identificados como gram-positivas, catalase negativas em formato de cocos, cocobacilos e/ou bacilos e as leveduras, totalizando 71 isolados, sendo 40 BAL e 31 leveduras.

3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

3.5.1. Identificação dos isolados pela técnica de MALDI-TOF – “MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT”

A partir dos testes fenotípicos de pré- identificação das bactérias e leveduras, os 71 isolados (40 bactérias e 31 leveduras) foram mantidos sob temperatura de congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em criotubos com caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) para leveduras e caldo MRS (HiMedia, Mumbai, India) para as bactérias, adicionados de 20% (v/v) de solução de glicerol (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), e devidamente identificados (Sevgili *et al.*, 2023). Os isolados foram submetidos à identificação por meio da técnica de MALDI-TOF, seguindo a metodologia adaptada por Freiwald e Sauer (2009).

A partir de cada criotubo de isolados das bactérias ou leveduras, uma alíquota de cerca de 10 μL foi coletada e inoculada em caldo MRS (HiMedia, Mumbai, India) ou caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose), respectivamente, incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C})$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C})$ (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil), respectivamente, por 48 horas e, posteriormente, 100 μL do caldo foi inoculado em placa contendo ágar MRS (HiMedia) ou ágar YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose), seguindo-se de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C})$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C})$ (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil), respectivamente, por 48 horas. Para o emprego da técnica, com o auxílio de um palito de dente, foi coletada uma pequena alíquota de biomassa de colônia isolada e, em seguida, a biomassa foi transferida para um poço da placa de aço inox do equipamento. Após transferência de cada amostra, foi adicionado em cada poço 1 μL de solução de ácido fórmico. Após a secagem das amostras na placa, adicionou-se em cada poço 1 μL de solução de ácido alfa-ciano-4- hidroxycinâmico em mistura de acetonitrila:água:ácido trifluoroacético (1:1:1) (TFA) (10 mg/mL; Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A análise das amostras foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF Bruker Biotyper 4.1. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão Bruker BTS (Bruker Bacterial Test Standard). Os espectros de massa obtidos após análise foram processados usando software MALDI Biotyper TM 4.1 (Bruker Biotyper 4.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os resultados foram expressos pela identificação de log BioTyper (pontuações), indicando a similaridade do perfil de espectro de massa MALDI-TOF desconhecido para as entradas do banco de dados disponíveis. Na análise dos resultados, valores de Log BioTyper (score) superior a 2,0 indicavam identificação de alta probabilidade de confirmação de espécies;

valores de Log BioTyper (score) entre 1,7 e 1,99 indicavam apenas em provável identificação de gênero. Valores de Log BioTyper (score) abaixo de 1,69 indicavam perfil não identificado quando comparado com as entradas do banco de dados.

Os espectros de identificação gerados foram automaticamente comparados com a biblioteca de referência do software MALDI Biotyper TM 4.1 (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics , Bremen, Alemanha).

3.5.2. Identificação por sequenciamento de DNA usando amplicons do marcador ITS, das cepas de leveduras selecionadas

As cepas selecionadas após as etapas de viabilidade biotecnológica que serão descritas após esse tópico, foram submetidas a identificação por sequenciamento de DNA usando amplicons do marcador ITS. A amplificação da região ITS1 rRNA foi realizada utilizando primers ITS1F 5'-GAACCGGCGGARGGATCA-3' e ITS2R 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3', conforme previamente descrito por White *et al.* (1990) e por Schmidt *et al.* (2013). As bibliotecas foram preparadas através de protocolo de PCR de duas etapas.

A primeira PCR (PCR1) emprega primers específicos para o alvo (ITS1F e ITS2R) contendo um adaptador Illumina parcial, baseado na estrutura TruSeq (Illumina, EUA) que permite uma segunda PCR de indexação (PCR2). A PCR de indexação adiciona índices duplos por amostra. As reações de PCR foram realizadas utilizando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C durante 2 min para o PCR1. Na PCR2 as condições foram 95 °C por 5 min, 15 ciclos de 95 °C por 45s, 66°C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata. As reações finais de PCR foram purificadas utilizando Neobeads (Neoprospecta®) e um volume equivalente de cada amostra foi adicionado ao pool de sequenciamento.

Em cada rodada de PCR, um Controle Negativo de Reação foi incluído (CNR). A concentração final de DNA do pool de bibliotecas foi estimada com ensaios Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA) e depois diluída para quantificação por qPCR utilizando o Kit de Quantificação de Biblioteca Collibri™ para plataformas Illumina (ThermoFisher Scientific, EUA). O pool de sequenciamento foi ajustado para uma concentração final de 11 pM (para kits V2) ou 17,5 pM (para kits V3) e sequenciado no sistema MiSeq (Illumina, EUA), empregando

os primers de sequenciamento Illumina, fornecidos com o kit do fabricante. As corridas paired-end foram realizadas utilizando kits de sequenciamento V2x500 ou V3x600 (Illumina, EUA) com (10 mil, 50 mil, ou 100 mil reads) de cobertura por amostra.

As sequências que tiveram 99% ou mais de identidade foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação com banco de dados de sequências acuradas de ITS rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies). A identificação foi considerada quando a sequência de consulta tinha >99% de similaridade com a sequência do gene ITS rRNA.

3.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS CEPAS DE LEVEDURAS ISOLDADAS DO FERMENTO NATURAL

Para a realização desse estudo, as leveduras isoladas e identificadas foram avaliadas quanto ao potencial biotecnológico para a seleção daquelas que apresentam características desejáveis para a panificação.

As cepas das leveduras foram mantidas em caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose), suplementado com 200 µL de solução de glicerol (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) a 80% (v/v), sob congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo reativadas, até a formação visível de biomassa, sempre que um novo teste fosse realizado, como observado na **Figura 3**.

Figura 3 – Formação de biomassa durante a reativação das cepas isoladas



Fonte: acervo do autor (2024).

Os testes realizados com as cepas de leveduras isoladas de fermento natural foram: fermentação de sacarose com formação de CO₂, teste de viabilidade de leveduras sob diferentes temperaturas, teste de produção de ácido, teste de crescimento em diferentes concentrações de glicose e teste de crescimento em diferentes valores de pH.

3.6.1. Teste de Fermentação de sacarose com formação de CO₂

O teste de fermentação de sacarose com formação de CO₂ foi realizado conforme descrito por Camargo *et al.* (2018). Cada cepa de levedura foi reativada em 5 mL de caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) e incubada em temperatura de 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) até a formação de biomassa ou turvação do meio. O caldo foi agitado em vórtex (Even VX – 38) por 15 segundos, seguido de leitura da OD₅₉₅ em espectrofotômetro (Eppenddorf BioSpectrometer basic) e ajustadas para 8 log.UFC/mL..

Foi inoculado 1 mL da cepa reativada em 10 mL de solução basal para o teste (0,5% (NH₄)₂SO₄ a 0,5%; NaH₂PO₄ a 0,1%, MgSO₄ a 0,05% e sacorose a 2%), em pH 5,0, com tubo de Durhan invertido. Os tubos foram agitados suavemente para mistura das células e incubados em temperatura de 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 120 horas. Foi preparado um tubo de solução sem fonte de carbono para controle negativo. Os testes foram feitos em triplicata.

Os tubos foram verificados em 24, 48 e 72 horas para observação de formação de gás nos tubos de Duhan invertidos, de forma que foi atribuído (+) para baixa produção de gás (1/4 do Durhan), (++) produção intermediária de gás (1/2 do Durhan) e (+++) alta produção de gás (todo o Durhan), como observado na **Figura 4**.

Figura 4 - Preenchimento do tubo de Durhan com CO₂



Fonte: acervo do autor (2024).

3.6.2. Teste de viabilidade de leveduras sob diferentes temperaturas

O teste de viabilidade de leveduras sob diferentes temperaturas foi realizado conforme descrito por Guimarães (2006), com adaptações. As cepas foram reativadas em 5 mL de caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) e incubadas em temperatura de 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 48 horas, até formação de biomassa ou turvação do meio. O caldo foi agitado em vórtex (Even VX – 38) por 15 segundos, seguido de leitura da OD₅₉₅ em espectrofotômetro (Eppenddorf BioSpectrometer basic) e ajustadas para 8 log.UFC/mL. Após, foram semeadas pela técnica de microgotas em placas de ágar YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) e incubadas nas seguintes temperaturas: 25 °C, 35 °C e 45 °C (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil). Após, foi realizada a verificação da multiplicação, através da contagem das unidades formadoras de colônia em cada placa e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.6.3. Teste de produção de ácido

O teste de produção de ácido foi realizado conforme descrito por Camargo *et al.* (2018), com adaptações. Foi preparado um meio de giz de Custer utilizando tubos inclinados (50 g de glicose, 5 g de carbonato de cálcio em pó fino, 5 g de extrato de levedura e 20 g de ágar-ágar, 1 litro de água desmineralizada), esterilizados em autoclave e colocados em local fresco para que o ágar gelificasse antes do giz assentar.

As cepas foram reativadas em 5 mL de caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose), conforme já descrito anteriormente, e semeadas em estrias nos tubos com o meio de giz de Custer. As placas foram inspecionadas por 02 semanas, a cada 72 horas, para observação da limpeza ao redor das estrias, uma vez que o consumo do giz indica a formação de ácido no meio, sendo atribuído, conforme essa observação do consumo do Giz de Custer, (+) para pouco ácido, (++) para uma produção de ácido intermediária e (+++) para muita formação de ácido, ou seja, consumo completo do Giz de Custer.

3.6.4. Teste de crescimento em diferentes concentrações de glicose

O teste de crescimento em diferentes concentrações de glicose foi realizado conforme descrito por Vrancken *et al.* (2010), com adaptações. As cepas foram reativadas conforme descrito anteriormente, incubadas em temperatura de 25 ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 24 – 48 horas e ajustadas para 8 log.UFC/mL. Alíquotas de 1% (v/v) foram colocadas nos caldos testes específicos, contendo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) com 10%, 20% e 30% de glicose, sendo incubados a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) . Após 12 horas de incubação das cepas em cada caldo teste específico foi realizada uma nova leitura da OD₅₉₅ em espectrofotômetro (Eppenddorf BioSpectrometer basic) para verificação do crescimento das cepas pelo aumento da turvação do meio. A diferença de OD final e inicial foi realizada para verificação do crescimento dos isolados nas condições estudadas.

3.6.5. Teste de crescimento em diferentes concentrações de pH

O teste de crescimento em diferentes concentrações de pH foi realizado conforme descrito por Vrancken *et al.* (2010), com adaptações. As cepas foram reativadas conforme descrito anteriormente, incubadas a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 48 horas e ajustadas para 8 log.UFC/mL. Alíquotas de 1% foram colocadas nos caldos testes específicos, contendo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) com pH 3,5 e pH 5,0, sendo incubado a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) . Após 12 horas de incubação nos caldos testes específicos foi realizada uma nova leitura da OD₅₉₅ em espectrofotômetro (Eppenddorf BioSpectrometer basic) para verificação do crescimento pelo aumento da turvação do meio. A diferença de OD final e inicial foi realizada para verificação do crescimento dos isolados nas condições estudadas.

3.7 TESTE DE ATIVIDADE FERMENTATIVA PARA AS CEPAS SELECIONADAS

Para a realização da atividade fermentativa das cepas selecionadas a partir dos testes biotecnológicos aplicados, foram preparadas massas fermentadas nas quais foram inoculadas as cepas *S. cerevisiae* 127, *S. cerevisiae* 57, isoladamente, conforme descrito por Palla *et al.* (2019), com adaptações. Uma massa controle foi preparada nas mesmas condições e inoculada com uma cepa de *S. cerevisiae* isolada de fermento biológico comercial (Fleischmann, São Paulo, Brasil).

Para a produção da massa, foi utilizada água destilada (75 ml) e farinha de trigo (126 g). As cepas utilizadas foram reativadas em caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) e incubadas a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 48 horas. Após esse período, o caldo foi agitado em vórtex (Even VX – 38) por 15 segundos, ajustado para 8 log.UFC/g, então, toda a biomassa foi coletada e inoculada na massa (Minervini *et al.*, 2012). Após inoculação, as massas foram homogeneizadas completamente e, em seguida, mantidas em frascos de vidro tampados, incubados em estufa a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) durante quatro horas, sendo coletadas alíquotas imediatamente após a homogeneização e após 6, 18 e 24 horas de incubação para realização dos testes de acidez, pH, aumento de volume e viabilidade de BAL e leveduras. A avaliação das propriedades reológicas foi realizada em zero e 24 horas de fermentação. Os testes citados serão descritos a seguir.

3.7.1 pH e acidez

O pH foi medido utilizando-se potenciômetro acoplado a um eletrodo de vidro em triplicata (Modelo Q400AS, Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil). A acidez titulável (g/100 g) foi medida por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenoftaleína como indicador (AOAC, 2016).

3.7.2 Viabilidade de BAL e leveduras

Amostras de fermento testadas foram avaliadas quanto à contagem de células viáveis de BAL. Para cada análise, 25 g da amostra foram diluídas em 225 mL de solução de água peptonada 0,1% (p/v) e diluídas serialmente (1:9, v/v) no mesmo diluente (10^{-2} - 10^{-6}). Alíquotas de 20 µL de cada diluição seriada foram inoculadas (usando o método de microgota) (Liu *et al.*, 2018) em placas contendo ágar MRS (HiMedia, Mumbai, India) e incubadas a 37 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 48 h. Após o período de incubação, as células viáveis de BAL foram enumeradas e os resultados foram expressos como log UFC/g (Gobbetti *et al.*, 2016). Para determinar a contagem de células viáveis de levedura, alíquotas de 100 µL de cada diluição em série foram inoculadas em placas contendo Ágar Dextrose de Batata (PDA) e incubadas a 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 72 – 96 h. Após o período de incubação, as células viáveis de levedura foram enumeradas e os resultados foram expressos como log UFC/g (Stefanello *et al.*, 2019).

3.7.3 Avaliação do aumento de volume

Para a análise de volume, as massas foram boleadas e acomodadas em proveta, sendo a abertura fechada com filme plástico para evitar formação de crosta por ressecamento da massa. As amostras foram incubadas à temperatura de 25 °C ($\pm$ 5 °C) (Estufa bacteriológica ACB labor, Americanas, Brasil) por 4 horas. A análise de volume foi realizada após: 0, 6, 18 e 24 horas de fermentação como sugerido por Aquino (2012).

3.7.4 Propriedades reológicas

A análise das propriedades reológicas foi realizada seguindo a metodologia descrita por Liu *et al.* (2024), com adaptações.

Para a avaliação a massa foi cortada em pedaços de 30 g e em seguida, cada pedaço foi transferido para o copo de acrílico do próprio do equipamento texturômetro TA-XT2 - Stable Micro Systems com probe back extrusion (Brookfield, Middleborough, U.S.A) (**Figura 5**),

completando aproximadamente 75% de amostra, sendo delicadamente agitado para acomodação da amostra e, em seguida, o teste era realizado, seguindo os seguintes parâmetros de análise: e os parâmetros da análise foram: probe back extrusion A/BE (copo acrílico 55x70 mm e disco com 40 mm de diâmetro), distância 25,0 mm, velocidade do teste 2,0 mm/s, distância de 25.0 mm e temperatura da amostra 28 °C.

Foram elaboradas duas amostras de massas e os testes realizados em quadriplicata. Foram analisados ponto de quebra, firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade.

Figura 5 - Teste de propriedades reológicas em texturômetro TA-XT2



Fonte: acervo do autor (2024).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Estatísticas descritivas foram efetuadas, incluindo média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo. Adotaram-se estratégias de análises inferenciais paramétricas. Para isso, utilizou-se os testes t independente para comparação de grupos independentes, ANOVA de um fator com comparação múltipla para avaliar a diferença de três grupos independentes, e teste t pareado para comparação de medidas repetidas das temperaturas. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Estes testes foram aplicados para analisar os resultados dos ensaios viabilidade

microbiana, testes de crescimento em diferentes temperaturas e para os resultados dos testes de atividade fermentativa.

Os resultados dos experimentos que avaliaram as propriedades biotecnológicas das leveduras, ou seja, formação de CO₂, formação de ácido, crescimento em diferentes temperaturas, crescimento em diferentes concentrações de glicose e crescimento em diferentes concentrações de pH foram classificados em quartis e convertidos em códigos qualitativos, permitindo padronizar os resultados de todas as análises expressas em diferentes unidades. A partir dessa classificação, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), sendo possível identificar as leveduras com as características mais promissoras para a panificação.

Os testes estatísticos foram realizados com o software RStudio (R CORE TEAM, 2019).

4. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo original, submetido na *ACS Food Science & Technology Journal* e apresentado no apêndice A. O artigo intitulado “Microbial diversity and biotechnological potential of sourdough from paraíba: selection of starter cultures for baking” e teve por objetivo caracterizar a diversidade da microbiota de fermentos naturais coletados em diferentes regiões climáticas do estado da Paraíba, assim como avaliar a viabilidade biotecnológica das leveduras isoladas, identificando aquelas com melhor qualidade biotecnológica e maior adaptação ao ambiente característico de um fermento natural maduro, possibilitando uso futuro destes isolados como culturas starters, tanto na panificação como em outros alimentos fermentados.

Foram isoladas 40 bactérias e 31 leveduras, sendo todas submetidas à identificação por MALDI-TOF. Todas as leveduras foram identificadas como *S. cerevisiae* e as Bactérias identificadas foram: *L. pantarum* (19 isolados), *Levilactobacillus brevis* (08 isolados), *Companilactobacillus paralimentarius* (07 isolados), *Lacticaseibacillus paracasei* (1 isolado) e *B. Cereus* (05 isolados). Dos isolados, as leveduras foram submetidas aos testes de viabilidade tecnologia (fermentação de sacarose com formação de CO₂, formação de ácido, crescimento em diferentes temperaturas, crescimento em diferentes concentrações de glicose e crescimento em diferentes concentrações de pH), de forma que foi observado que, embora todas as cepas tenham sido caracterizadas como sendo *S. cerevisiae*, duas delas apresentaram maior destaque quanto a adaptação ao ambiente da massa fermentada, sobretudo no crescimento em diferentes concentrações de pH, além de um destaque para a formação de CO₂, sendo elas a *S. cerevisiae* 127 (CJ - região semi-árida do estado da Paraíba) e a *S. cerevisiae* 57 (JPC - região úmida do estado da Paraíba).

As leveduras selecionadas (*S. cerevisiae* 127 e *S. cerevisiae* 57) foram submetidas ao teste de atividade fermentativa, exibindo influência positiva quando comparada com cepa de *S. cerevisiae* isolada de fermento biológico comercial, de forma que ao final da avaliação do teste fermentativo, ambas as cepas apresentaram maior viabilidade que a cepa isolada do fermento comercial, sendo sugestivas para o uso como cultura starter tanto na panificação, quanto em outras matrizes alimentares com processos fermentativos semelhantes, por estarem adaptadas às características inerentes a massa fermentada.

REFERÊNCIAS

AESA. Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. **Caracterização topográfica e da geomorfologia**, 2016.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; SADEK, Z. I.; AZAB, M. S.; DARWESH, O.L., HASSAN, M. S. Incorporation of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* into infant-foods inhibit proliferation of toxicogenic *Bacillus cereus* strains. **Bioc. Agric. Biotechnol.**, v. 18, p. 101-103, 2019

AQUINO, V.C. **Estudo de estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, 2012.

ARICI, M.; OZULKU, G.; YIULDIRIM, R. M.; SAGDIC, O., DURAK, M. Z. Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 499-508, 2017.

ARORA, K.; AMEUR, H.; POLO, A., DI CAGNO, R., RIZZELLO, C. G.; GOBETTI, M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 71–83, 2021.

ASLANKOOHI, E., HERRERAMALAYER, B., REZAEI, M. N., STEENSELS, J., COURTIN, C. M., VERSTREPEN, K. J. Non-conventional yeast strains increase the aroma complexity of bread. **PLoS One**, 11, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL -AOAC. **Official methods of analysis of Official Methods of Analysis of the Associations of Official Analytical Chemist**. Method. No. 932.12, Method, No 981.12, Method No. 942.12. 20th ed. AOAC Internacional, Washington, 2016.

BARTKIENE, E.; BARTKEVICS, V.; KRUNGLEVICIUTE, V.; PUGAJEVA, I.; ZADEIKE, D.; JUODEIKIENE, G. Lactic Acid Bacteria Combinations for Wheat Sourdough Preparation and Their Influence on Wheat Bread Quality and Acrylamide Formation: Sourdough starters for wheat bread production. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2371–2378, 2017.

BENITEZ, T., MARTINEZ, P., CODON, A. C. Genetic constitution of industrial yeast. **Microbiologia** v. 12, p. 371-84, 1996.

BEVILACQUA, A., CORBO, M.R., SINIGAGLIA, M. Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. **Frontiers in Microbiology** v. 3, 2012.

BIGEY, F. C.; SEGOND, D.; FRIEDRICH, A.; AGIER, N., NIDELET, T., Sicard, D. Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* Linked to Distinct Bread Making Processes. **Current Biology**, v. 31, p. 722-732, 2021.

BOUKID, F., FOLLONI, S., SFORZA, S., VITTADINI, E., PRANDI, B. Current trends in

ancient grains-based foodstuffs: Insights into nutritional aspects and technological applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17(1), 123–136, 2018.

BRANDT, M. J. Industrial production of sourdoughs for the baking branch - an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 3–7, 2019.

CALVERT, M. D.; MADDEN, A. A.; NICHOLS, L. M.; HADDAD, N. M.; LAHNE, J.; DUNN, R. R.; McKENNY, E. A. et al. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. **PeerJ**, v. 9, 2021.

CAMARGO, J. Z.; NASCIMENTO, V. M.; STEFANELLO, I.; SILVA, A. de A.; GONÇALVES, F. A.; PERDOMO, I. C.; VILELA, D. M.; SIMIONATTO, S.; PEREIRA, R. M.; PAZ, M. F. da; LEITE, R. S. R.; GELINSKI, J. M. L.N.; FONSECA, G. G. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mill with biotechnological potential for biofuel and food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 390-399, 2018.

CHAMPAGNE, C.P., MØLLGAARD, H. Handbook of fermented functional foods. In: Farnworth, E.R. (Ed.), *Production of Probiotic Cultures and Their Addition in Fermented Foods*, second ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008.

CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R. Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 169–182, 2011.

CONDESSA, B. M. B. **Potencial de leveduras saccharomyces e não saccharomyces autóctones do cerrado como culturas iniciadoras em processos de panificação**. Dissertação de mestrado. Palmas/TO, 2019.

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

DE VUYST, L.; HUYS, G.; SCHEIRLINCK, I.; MEULEN, R. V. der. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria intraditional Belgian sourdoughs and their production environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, 2009.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 43–56, 2005.

ERCOLINI, D.; PONTONIO, E.; FILIPPIS, F. de; MINERVINI, F.; STORIA, A. L.; GOBBETTI, M., DI CAGNO, R. Microbial Ecology Dynamics during Rye and Wheat Sourdough Preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7827–7836, 2013.

FRANCISCO, P. R. M.; MEDEIROS, R. M.; SANTOS, D., MATOS, R. M. de. Köppen's and Thornthwaite Climate Classification for Paraíba State. **Revista Brasileira de Geografia**

Física. v. 8, p. 1006–1016, 2015.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and indentificacion of bacteria by mass spectrometry. **Natural protocols**, United Kingdom, v. 4, p. 732-742, 2009.

GALLONE, B., STEENSELS, J., PRAHL, T., SORIAGA, L., SAELS, V., HERRERA-MALAYER, B., MERLEVEDE, A., RONCORONI, M., VOORDECKERS, K., MIRAGLIA, L., TEILING, C., STEFFY, B., TAYLOR, M., SCHWARTZ, A., RICHARDSON, T., WHITE, C., BAELE, G., MAERE, S., VERSTREPEN, K. J. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts, **Cell**, v. 166, p. 1397 – 1410, 2016.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **FoodMicrobiology**, v. 37, p. 2–10, 2014.

GANZLE, M. G. Sourdough bread. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 1, 2014.

GÄNZLE, M. G.; EHMANN, M.; HAMMES, W. P. Modeling of Growth of *Lactobacillussanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2616–2623, 1998.

GÄNZLE, M.; GOBBETTI, M. Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria. **Handbook on Sourdough Biotechnology**. Boston,MA: Springer US, 2013.

GÄNZLE, M.; RIPARI, V. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p.19–25, 2016.

GANZLE, M. G., ZHENG, J. Lifestyles of sourdough lactobacilli - Do they matter for microbial ecology and bread quality? **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 15–23, 2019

GANZLE, M. G.; QIAO, N. BECHTNER, J. The quest for the perfect loaf of sourdough bread continues: Novel developments for selection of sourdough starter cultures. **International Journal os Food Microbiology**. v. 407, 2023.

GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; ANGELIS, M. de.. How the sourdough may affect the functional features of leavenedbaked goods. **Food Microbiology**, v. 37, p. 30–40, 2014.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; PONTONIA, E.; DI CAGNO, R.; ANGELIS, M. de. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 3–18, 2016.

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

GUILLAMÓN, J. M.; BARRIO, E. Genetic polymorphism in wine yeasts: mechanismsand methods for its detection. **Front. Microbiol.** v. 8, p. 1-10, 2017.

GUIMARÃES, T. M.; MORIEL, D. G.; MACHADO, I. P.; PICHETH, C. M. T. F.; BONFIM, T. M. B. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 42, n. 1, 2006.

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

ILLUECA, F., MORENO, A., CALPE, J., NAZARETH, T. M., DOPAZO, V., MECA, G., QUILES, J. M., LUZ, C. Bread biopreservation through the addition of lactic acid bacteria in sourdough. **Foods**, v. 12, n. 4, p. 864, 2023.

KADITZKY, S.; VOGEL, R. F. Optimization of exopolysaccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 291–299, 2008.

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

KASELEHT, K., PAALME, T., MIHHALEVSKI, A., SARAND, I. Analysis of volatile compounds produced by different species of lactobacilli in rye sourdough using multiple headspace extraction. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 9, p. 1940–1946, 2011.

KHLESTKIN, V. K., LOCKACHUK, M. N., SAVKINA, O. A., KUZNETSOVA, L. I., PAVLOVSKAYA, E. N., & PARAKHINA, O. I. Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation. **Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii**, v. 26, n. 4, p. 385–393, 2022.

LATTANZI, A.; MINERVINI, F.; DI CAGNO, R.; DIVICCARO, A.; ANTONIELLI, L.; CARDINALI, G.; CAPPELE, S.; ANGELIS, M. de; GOBBETTI, M. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 71–79, 2013.

LE-BAIL, A.; BOUMALI, K.; JURY, V.; BEN-AISSA, F.; ZUNIGA, R. Impact of the baking kinetics on staling rate and mechanical properties of bread crumb and degassed bread crumb **Journal of Cereal Science**, v. 50, 2009.

LANDIS, E. A., OLIVERIO, A. M., MCKENNEY, E. A., NICHOLS, L. M., KFOURY, N., BIANODANIELS, M., SHELL, L. K., MADDEN, A. A., SHAPIRO, L., SAKUNALA, S., DRAKE, K., ROBBAT, A., BOOKER, M., DUNN, R. R., FIERER, N., WOLFE, B. E. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. **Elife**, 10, 2021.

LIU, A.; SU, S. SUN, Y.; LI, Q.; LI, J.; HU, K.; ZHAO, N.; HE, L.; CHEN, S.; LIU, S. Enhancing the highland barley-wheat dough network structure and bread quality using freeze-dried sourdough powder with inulin as a protectant. **LWT – Food Science and technology**, v. 191, 2024

LIU, T.; LI, Y.; CHEN, J.; SADIQ, F. A.; ZHANG, G.; YANG, L.; HE, G. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 242, p. 91-97, 2018.

LIU, T.; LI, Y.; CHEN, J. SADIQ, F. A.; ZHANG, G., LI, Y.; HE, G. Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 91-97, 2016.

MARULLO, P., BELY, M., MASNEUF-POMAREDE, I., AIGLE, M., DUBOURDIEU, D. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS Yeast Res.** v. 4, p. 711-719, 2004.

MENEZES, L. A. A.; MOLOGNONI, L., PLOÊNCIO, L. A. de S.; COSTA, F. B. M.; DAGUER, H., LINDNER, J. de D. Use of sourdough fermentation to reducing FODMAPs in breads. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 6, p. 1183–1195, 2019.

MENEZES, L. A. A; SARDARO, S. M. L.; DUARTE, R. T. D., MAZZON, R. R.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. **Food Microbiology**, v. 85, p. 103-302, 2020.

MINERVINI, F., DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., PINTO, D., SIRAGUSA, S., RIZZELLO, CG, GOBBETTI, M.. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. **Food Microbiol.** v. 27, p. 897-908, 2010.

MINERVINI, F.; ANGELIS, M. de.; DI CAGNO, R. GOBETTI, M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability traditional sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 136-146 , 2014.

MINERVINI, F.; DI CAGNO, R.; LATTANZI, A.; DE ANGELIS, M.; ANTONIELLI, L.; CARDINALI, G.; CAPPELLE, S.; GOBBETTI, M., 2012. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between in- gredients and microbial species diversity. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 78, p. 1251–1264, 2012.

MONDAL, A.; DATTA, A. K. Review Bread baking – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 86, 2008.

MORONI, A. V., ARENDT, E. K., MORRISSEY, J. P., DAL BELLO, F. Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. **Int. J. Food Microbiol.** v. 142, p. 142-148, 2010.

PALLAA, M., AGNOLUCCI, M., CALZONE, A.; GIOVANNETTI, M., DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M., RIZZELLO, C. G.; PONTONIO, E. Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. **International Journal of Food Microbiology**, 2019.

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

PETER, J., CHIARA, M., FRIEDRICH, A. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Nature**, v. 556, p. 339-344, 2018.

PONTONIO, E.; NIONELLI, L., CURIEL, J. A., SADEGHI, A., DI CAGNO, R., GOBETTI, M., RIZZELLO, C. G. Iranian wheat flours from rural and industrial mills: Exploitation of the chemical and technology features, and selection of autochthonous sourdough starters for making breads. **Food Microbiology**, v. 47, p. 99-110, 2015.

QUEROL, A., BELLOCH, C., FERNANDEZ-ESPINAR, M. T., BARRIO, E. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 201-205, 2023

SANCHEZ-ADRI, I. E.; SANMARTÍN, G.; PRIETO, J. A.; ESTRUCH, F.; FORTIS, E. RANDEZ-GIL, F. Technological and acid stress performance of yeast isolates from industrial sourdough. **Food Science and Technology**, v. 184, 2023.

SCHEIRLINCK, I; MEULEN, R. V. D.; SCHOOR, A. V.; VANCANNEYT, M., DE VUYST, L., VANDAMME, P., HUYS, G. Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, 2007.

SEVIGILI, A.; CAN, C.; CEYHAN, D. I.; ERKMEN, O. Molecular identification of LAB and yeasts from traditional sourdoughs and their impacts on the sourdough bread quality characteristics. **Current Research in Food Science**, v. 6, 2023.

SHEHZAD, A.; CHIRON, H.; DELLA VALLE, G.; LAMRINI, B.; LOURDIN, D. Energetical and rheological approaches of wheat flour dough mixing with a spiral mixer. **Journal of Food Engineering**, v. 110, 2012.

SCHMIDT, P. A.; BÁLINT M.; GRESHAKE B.; BANDOW C.; RÖMBKE J.; SCHMITT I.; Illumina Metabarcoding Of A Soil Fungal Community. **Soil biology and biochemistry**, v. 65, p. 128-132, 2013.

SIEPMANN, F. B.; ALMEIDA, B. S. de; WASZCZYNSKYYJ, N.; SPIER, M. R. Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. **LWT**, v. 108, p. 199–206, 2019.

SIRAGUSA, S., DI CAGNO, R., ERCOLINI, D., MINERVINI, F., GOBBETTI, M., DE ANGELIS, M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, p. 1099-1109, 2009.

STEFANELLO, R. F.; NABESHIMA, E. H.; IAMANAKA, B. T.; LUDWIG, A; FRIES, L. L.M.; BERNARDI, M. V. C. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilization with different cryoprotectant agents. **Food Research International**. v. 115, p. 90-94, 2019.

TOMIC, J. DAPĆEVIĆ-HADNAĐEV, T.; SCROBOT, D.; MARAVIĆ, N.; POPOVIĆ, N.; STEVANOVIĆ, D.; HADNAĐEV, M. Spontaneously fermented ancient wheat sourdoughs in breadmaking: Impact of flour quality on sourdough and bread physico-chemical Properties.

Food Science and Technology, v. 175, 2023.

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

VENTURI, M., GALLI, V., PINI, N., GUERRINI, S., SODI, C., GRANCHI, L. Influence of different leavening agents on technological and nutritional characteristics of whole grain breads obtained from ancient and modern flour varieties. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 7, p. 1701–1710, 2021.

VERA, A.; CHATAIN, M. H. L.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 369 – 377, 2012.

VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; WECKX, S.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, 2011.

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

WARRINGER, J.; ZORGO, E. CUBILLOS, F. A.; ZIA, A.; GJUVSLAND, A.; SIMPSON, J. T.; FORSMARK, A.; DURBIN, R.; OMHOLT, S. W.; LOUIS, E.J. Trait variation in yeast is defined by population history. **PLoS Genet.** v. 7, 2011.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes For Phylogenetics. **PCR Protocols.** p. 315-322, 1990.

ZHAO, C. J.; KINNER, M.; WISMER, W.; GANZLE, M. G. Effect of Glutamate Accumulation During Sourdough Fermentation with *Lactobacillus reuteri* on the Taste of Bread and Sodium-Reduced Bread. **Cereal Chemistry Journal**, v. 92, n. 2, 2015.

ZHOU, Y., SHE, X., ZHU, S., ZHOU, X. The study of microbial diversity and volatile compounds in Tartary buckwheat sourdoughs. **Food Chemistry: X.** v. 14, 2022.

APÊNDICE

MICROBIAL DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF SOURDOUGH
FROM PARAÍBA: SELECTION OF STARTER CULTURES FOR BAKING

Renata Duarte Moreira Cavalcante de Araújo^a, Marcus Vinicius de Souza Couto^a, Ana Luiza Mattos Braga^b, Gabriel Victor Pinheiro Barbosa^c, Ana Regina Simplício de Medeiros^d, Tatiana Zanella Rodrigues^a, Noádia Priscila Araújo Rodrigues^c, Eloiza Helena Campana^e, Estefânia Fernandes Garcia^c

^aGraduate Program in Nutrition Sciences - Federal University of Paraíba, Via Imbiribida - Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brazil, 58050-585; renataduartemca@gmail.com; ; marcussouza.inf@gmail.com; tatiana.zanella@academico.ufpb.br

^bDepartment of Food Technology - Federal University of Paraíba, R. dos Escoteiros, s/n - Mangabeira, João Pessoa, PB, Brazil, 58058-600; anabraga.ufpb@gmail.com

^cDepartment of Gastronomy - Federal University of Paraíba, R. dos Escoteiros, s/n - Mangabeira, João Pessoa, PB, Brazil, 58058-600; gabrielbrasil87@gmail.com; estefaniafgarcia@yahoo.com.br; ; noadia@ctdr.ufpb.br; estefania.fernandes@academico.ufpb.br

^dGraduate Program in Agro-Food Technology - Federal University of Paraíba, R. Santos Dumont, Solânea - PB, Brazil, 58225-000; anareginasimplicio@gmail.com

^eDepartment of Pharmaceutical Sciences - Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil, 58051-900; elocampana@gmail.com

Abstract

This study investigated the microbial diversity of sourdough collected from three climatic regions in Paraíba, Brazil—humid, sub-humid, and semi-arid—and assessed the technological potential of isolated yeasts. Thirty-one yeast strains, all identified as *Saccharomyces cerevisiae* via MALDI-TOF, were evaluated for CO₂ production, temperature tolerance, acid production, and growth under varying glucose concentrations and pH levels. Strains *S. cerevisiae* 127 and 57 exhibited superior CO₂ production and viability at pH 3.5, key traits for starter cultures, and were genetically confirmed using the ITS marker. When incorporated into dough and fermented for 24 hours, these strains positively influenced physicochemical parameters, including bread volume, texture, and sensory qualities. This research provides a comprehensive overview of yeast microbiota across different climatic zones in Paraíba and identifies strains with significant biotechnological potential for use as starter cultures in baking.

Keywords: sourdough; microbial ecology; biotechnological tests; yeast; starter culture

1 Introduction

The role of microbiota in the quality of sourdough bread is widely recognized. The use of sourdough has been studied not only for its ability to impart desirable sensory and physicochemical properties but also for its functional properties.^{1, 2, 3}

Sourdough fermentation begins with the mixture of flour and water, allowing the fermentative action of microorganisms, especially lactic acid bacteria (LAB), yeasts, and occasionally acetic acid bacteria, resulting in an ecosystem characterized by mutualistic relationships and variations in species composition over time.^{4, 5}

The sourdough microbiota is influenced by factors such as pH, temperature, and fermentation conditions, which determine its stability and sensory attributes.⁵ Temperature variations during propagation can alter the balance between yeast and bacteria, impacting the production of key flavor compounds, such as ethanol, alcohols, esters, and organic acids, that define bread quality.⁶⁻⁹ Among these microbial interactions, the symbiotic relationship between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* plays a crucial role in maintaining the sourdough ecology, enhancing both fermentative performance and the production of volatile compounds.^{3,10} However, the microbial composition of this ecosystem is highly dynamic, and varies according to flour type, fermentation parameters, and the presence of other microorganisms, which directly influence the dominance and adaptability of specific yeast strains.¹¹

Yeasts adapted to sourdough have demonstrated an ability to withstand stressful conditions during their growth phase, including nutrient scarcity and the effects of acidic, oxidative, thermal, and osmotic stresses.¹² These yeast strains have exhibited a remarkable capacity to persist and prevail in fermentative ecosystems, ensuring their dominance in these

environments. *Saccharomyces cerevisiae* frequently predominates in sourdough due to its tolerance to acidic pH, osmotic stress, and nutritional limitations, although this resilience varies among strains.¹² Repeated exposure to these stresses selects for more tolerant strains, whose adaptive responses are regulated through the activation or repression of specific genes.¹³

Despite its frequent association with commercial yeast contamination in bakeries,¹⁴ the recurrent presence of *S. cerevisiae* in spontaneously propagated sourdough suggests an autochthonous origin linked to flour microbiota.¹⁵ The selective pressure of fermentation favors strains capable of coexisting with LAB, tolerating organic acid accumulation, and maintaining metabolic activity under fluctuating environmental conditions, highlighting the strain-dependent nature of its applications.

The direct inoculation of pure cultures with desirable properties has been demonstrated to stabilize microbiota.¹⁶ The selection of these microorganisms necessitates a characterization of their technological properties, with a focus on their proliferation capacity and the optimal conditions for their performance in the desired food matrix.⁸ The utilization of yeasts adapted to the diverse physicochemical conditions of sourdough (acidic pH, LAB secondary metabolites) has been shown to optimize fermentation time and enhance the production of sourdough bread.

Recent studies have increasingly focused on the yeast profile in sourdough, with the aim of identifying and selecting strains that demonstrate greater adaptability for sourdough bread. Research highlights the influence of temperature, geographic origin, and fermentation conditions on yeast diversity across different regions of the world.^{8,17} Although several studies have characterized yeast populations in traditional sourdough ecosystems, further research is necessary to explore the specific technological properties of each strain, such as acid tolerance, CO₂ production, and metabolic efficiency, to optimize their application as starter cultures. Despite the country's climatic diversity, there is a lack of comprehensive studies on sourdough

yeast microbiota in Brazil.⁶ In this context, this study aimed to characterize the yeast microbiota of sourdough collected from different climatic regions (humid, semi-humid, and semi-arid) of the state of Paraíba, in northeastern Brazil, and to evaluate the biotechnological potential of the isolated strains, selecting the most promising ones for application in sourdough fermentation based on their fermentative activity.

2. Materials and methods

2.1 Determination of collection places, isolation and feasibility of yeasts in sourdough

A climatological map was constructed for the municipalities of the state of Paraíba based on cartographic data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). This map identifies three distinct climatic zones: humid, semi-humid, and semi-arid (see Supplementary Material). One municipality from each climatic zone was selected on the basis of the presence of establishments engaged in sourdough production for baking purposes. Consequently, two establishments were selected in João Pessoa (humid zone), one in Solânea (semi-humid zone), and one in Cajazeiras (semi-arid zone).

Samples of 100 grams of each sourdough were collected (in duplicate), approximately eight hours after the last propagation, and transported to the laboratory for an immediate analysis.

For each sample, 25 g were weighed and diluted in 225 mL of sterilized peptone water, followed by serial dilution (10^{-1} at 10^{-5}). Aliquots were inoculated into Petri dishes containing YPD agar for yeast (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% glucose). The plates were incubated in a bacteriological incubator (ACB Labor, Americana, Brazil) at 25 ± 0.5 °C.

Subsequently, five colonies of each morphology present on the plates were collected, re-isolated, and incubated at 25 ± 0.5 °C.

Each isolate was subjected to the Gram staining, and evaluation of the morphology. Yeasts isolates were selected according to characteristic morphological, totaling 31 isolates, which were kept at -18 °C, in cryovials with YPD broth for yeast, added with 20% (v/v) of glycerol solution (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) at 80% (v/v).

2.2 Preliminary identification of isolates using the MALDI-TOF technique – “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight”

The isolates were reactivated in YPD broth and incubated 25 ± 0.5 °C during 48 hours. After that, 20 µL of broth was collected and inoculated in a plate with YPD medium, followed by incubation at 25 ± 5 °C, for 48 hours.

A small aliquot of biomass from each colony was collected and transferred to a well of the stainless steel plate, to which 1 µL of formic acid solution was added. After drying the samples on the plate, 1 µL of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid solution in an acetonitrile:water:trifluoroacetic acid (1:1:1) (TFA) mixture (10 mg/mL; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was added, as described in Bruker protocol, and previous literature.¹⁸

Sample analysis was performed on a Bruker MALDI-TOF mass spectrometer Biotyper 4.1. The equipment was previously calibrated using Bruker BTS standard (Bruker Bacterial Test Standard). The mass spectra obtained after analysis were processed using MALDI Biotyper™ 4.1 software (Bruker Biotyper 4.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The results were expressed by BioTyper log identification (scores), indicating the similarity of the unknown MALDI-TOF mass spectral profile to the available database entries.

In the analysis of the results, Log BioTyper (score) values greater than 2.0 indicated identification with a high probability of species confirmation; Log BioTyper (score) values between 1.7 and 1.99 indicated probable genus identification only. Log BioTyper (score) values less than or equal to 1.69 indicated an unidentified profile when compared to the database entries. The identification spectra generated were automatically compared with the reference library of the MALDI BiotyperTM 4.1 software (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2.3 Assessment of biotechnological viability of yeasts isolated from sourdough

After identification by the MALDI-TOF technique, the isolated yeast strains were subjected to the sucrose fermentation with CO₂ formation, production test of acid, feasibility in different temperatures, feasibility in different values of pH and in different concentrations of glucose. To perform each test, a 100 µL aliquot of the isolate in a cryovial, kept frozen (described in section 2.1), was collected and inoculated in 5 mL of YPD broth and incubated at 25 ± 0.5 °C until reaching 8 log CFU / mL.

The sucrose fermentation test with CO₂ formation was performed as already described,¹⁹ 1 mL of the reactivated strain was inoculated in 10 mL of basal solution for the test (0,5% (NH₄)₂SO₄ at 0,5%; NaH₂PO₄ a 0,1%, MgSO₄ at 0,05% e sucrose at 2%), at pH 5.0 with an inverted Durhan tube (in triplicate) and incubated at 25 °C ± 5 °C. for 120 hours. A tube of solution without carbon source was prepared as a negative control. After 24, 48 and 72 hours of incubation, the results were evaluated and considered positive when gas production was observed in the tubes.

The acid production test was performed as described.²⁰ A Custer chalk medium was prepared using slant tubes (50 g glucose, 5 g finely powdered calcium carbonate, 5 g yeast

extract, and 20 g agar, 1 liter demineralized water), sterilized in an autoclave. An inoculum of each reactivated isolate was streaked in the tubes with the medium, with a loop of Henle. The results were checked for 2 weeks, every 72 hours, to observe the cleaning around the streaks by consumption of the medium, indicating the formation of acid.

Yeast viability test under different temperatures was performed as described previously²¹, with adaptations. The inoculum was seeded on YPD agar plates (by microdrops) and incubated at the following temperatures: 25 ± 5 °C, 35 ± 5 °C and 45 ± 5 °C. The results were expressed in log.CFU / mL .

For the viability test at different glucose concentrations, 1% (v/v) aliquots were placed in specific test broths containing YPD with 10%, 20% and 30% glucose, and incubated at 25 ± 5 °C. The OD₅₉₅ reading was taken on a spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer basic, Hamburg, Germany) at time zero and after 12 hours, to check the multiplication of strains by increasing the turbidity of the medium.²² For the growth test at different pH concentrations, 1% aliquots were placed in specific test broths, containing YPD at pH 3.5 and pH 5.0, and incubated at 25 ± 5 °C. The OD₅₉₅ reading was taken on a spectrophotometer at time zero and after 12 hours, to verify the multiplication of the strains by increasing the turbidity of the medium.²²

2.4 Selection of the most promising isolates for evaluation of fermentative activity

The results of the evaluation of the biotechnological properties of the yeasts were used to perform Principal Component Analysis (PCA), identifying the yeasts with the most promising characteristics for baking. From the PCA, the two best identified strains were selected and submitted to molecular confirmation of the preliminary identification performed (section 2.5), to later be evaluated for their fermentative activity (section 2.6).

2.5 Molecular identification of selected yeast strains

The selected strains (*S. cerevisiae* 127 and *S. cerevisiae* 57), were subjected to confirmation of identification DNA sequencing using ITS marker amplicons, which was carried out using primers ITS1F 5' -GAACCGGCGGARGGATCA-3' and ITS2R 5' -GCTGCGTTCTTCATCGATGC- 3', as previously described.^{23, 24} Libraries were prepared using two-step PCR protocol. The first PCR (PCR1) employed target-specific primers (ITS1F and ITS2R) containing a partial Illumina adapter, based on the TruSeq framework (Illumina, USA) that allows a second indexing PCR (PCR2). Indexing PCR adds double indexes per sample. PCR reactions were performed using Platinum Taq (Invitrogen, Waltham, MA, USA) with the conditions: 95 °C for 5 min, 25 cycles of 95 °C for 45s, 55 °C for 30s and 72 °C for 45s and a final extension of 72 °C for 2 min for PCR1. In PCR2 the conditions were 95 °C for 5 min, 15 cycles of 95 °C for 45s, 66°C for 30s and 72 °C for 45s and a final extension of 72 °C for 2 min. All PCR reactions were performed in triplicate. Final PCR reactions were purified using Neobeads (Neopropecta®, Santa Catarina, Brazil) and an equivalent volume of each sample was added to the sequencing pool. In each round of PCR, a Negative Reaction Control was included (CNR). Final library pool DNA concentration was estimated with Picogreen assays dsDNA (Invitrogen, USA) and then diluted for qPCR quantification using the Collibri™ Library Quantification Kit for Illumina platforms (ThermoFisher Scientific, MA, USA). The sequencing pool was adjusted to a final concentration of 11 pM (for V2 kits) or 17.5 pM (for V3 kits) and sequenced on the MiSeq system (Illumina Way, San Diego, CA, USA), using Illumina sequencing primers, provided with the kit. from the manufacturer. Paired-end runs were performed using V2x500 or V3x600 sequencing kits (Illumina, USA) with (10 thousand, 50 thousand, or 100 thousand reads) coverage per sample.

Sequences that had 100% identity were used for taxonomic identification by comparison with a database of accurate ITS rRNA sequences (NeoRef, Neoprosecta Microbiome Technologies). Identification was considered when the query sequence had >97% similarity to the ITS rRNA gene sequence. A portion of the sequence was compared with sequences in the public database GenBank, and the obtained sequences were deposited under the accession numbers (PQ679357.1, PQ679355.1).

2.6 Dough fermentation activity test for selected yeasts

Doughs were prepared using 75 mL of distilled water and 126 g of commercial refined wheat flour (Finna[®], Eusébio, Brazil), along with the selected strains: dough inoculated with *S. cerevisiae* 127 (DSC127); dough inoculated with *S. cerevisiae* 57 (DSC57); and a control sample prepared with *S. cerevisiae* isolated from commercial baker's yeast (Fleischmann[®], São Paulo, Brazil), all standardized to a concentration of 8 log CFU/g. The doughs were homogenized and incubated in a Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) incubator at 25 ± 5 °C for 24 hours. Aliquots were collected at 0, 6, 18, and 24 hours to assess titratable acidity, pH, volume increase, and the viability of yeasts. Rheological properties were evaluated at 0 and 24 hours of fermentation.

Dough samples were subjected to measurement of pH, in triplicate, using a potentiometer coupled with a glass electrode (Quimis, Model Q400AS, Diadema, Brazil). Titratable acidity (g/100 g) was determined by titration with 0.1 N NaOH using phenolphthalein as an indicator.²⁵ For yeast enumeration, a 25 g of sample was homogenized in 225 mL of 0.1% (w/v) peptone water solution and serially diluted (1:9, w/v) in the same diluent (10⁻² to 10⁻⁶). Aliquots of 20 µL from each dilution were plated using the microdrop method²⁶ on YPD

medium. Agar plates were incubated aerobically at 25 ± 0.5 °C for 24-48 hours. Results were expressed as log CFU/g (colony-forming units per gram of sample).⁴

The volume analysis of the doughs was performed²⁷, with adaptations. The doughs were shaped into rounds and placed in a test tube, with the opening closed with plastic film to prevent crust formation due to drying. The samples were incubated at 28 ± 0.5 °C for 24 hours. The volume analysis was read after 0; 6; 18, and 24 hours of fermentation.

After data analysis, a 18-hours of fermentation time was selected for dough preparation with *Saccharomyces cerevisiae* strains, which were used in bread production to evaluate their performance and quality (section 2.7).

2.7 Bread quality with selected yeasts

The production of bread was accomplished by utilizing 40% yeast relative to the total weight of the commercial refined wheat flour (Finna®, Eusébio, Brazil), 52 g/100g of distilled water, and 2 g /100g of salt (Miramar, Norsal, Areia Branca, Brazil). The dough underwent fermentation for 150 minutes in a Biochemical Oxygen Demand (Solab®, model SL-200, Piracicaba, Brazil) at 30 ± 0.1 °C, and 180 g portions were shaped into loaves: bread with dough + *S. cerevisiae* 127 (DSC127); bread with dough + *S. cerevisiae* 57 (DSC57) and Control Bread with *S. cerevisiae* isolated from commercial baker's yeast (Fleischmann®, São Paulo, Brazil). Bread doughs were baked in a gas-powered turbo oven (Venâncio, model FVT5D, Venâncio Aires, Brazil), preheated to 200 ± 1 °C for 20 minutes. After cooling at room temperature, the breads were subjected to analysis.

2.7.1 Determination of specific bread volume, textural properties and sensory evaluation

The specific volume was determined using the rapeseed displacement method,²⁸ adapted to use millet seeds (*Setaria italica*).²⁹ The test was performed in triplicate and the samples were weighed on an electronic scale with a resolution of 0.5 g (Even, model B-15-110y, Araucária, Brazil), with the parameter calculated as the ratio of the volume (cm³) to the dough (g) of the bread, with the result expressed in cm³ g⁻¹, according to the equation below:

$$\text{Specific volume: } \frac{\text{breadvolume}(\text{cm}^3)}{\text{breaddough}(\text{g})}$$

The texture was performed following the methodology described with adaptations,³⁰ in five replicates. The test was performed by cutting the dough into pieces of approximately 30 g. The tests were performed on a TA-XT2 texture analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) with probe back extrusion, and the following parameters were: pre-test speed (5 mm/s), test speed (1 mm/s), and post-test speed (5 mm/s), 30% of compression and time between the two compressions of 5 s. Hardness, chewiness, gumminess, cohesiveness and elasticity parameters were analyzed.

The sensory evaluation was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Paraíba. All participants provided consent for the utilization of their data. One hundred untrained participants, including men and women (selected based on the habit of consuming bread and the absence of any allergies or intolerances to the ingredients added to the formulation), were asked to evaluate their sensory perception. The sensory acceptance analysis evaluated attributes such as appearance, color, aroma, flavor, texture, and overall acceptance using a 9-point hedonic scale (1 = disliked extremely; 5 = neither liked nor disliked; 9 = liked extremely). Examined samples were considered accepted when obtaining an average ≥ 5.0 (equivalent to the hedonic term “I moderately liked it”).^{31,32} Purchase intention was

evaluated using a structured hedonic scale with five points (1 = would never buy; 3 = maybe would buy/maybe not buy; 5 = would buy).^{31, 32}

2.7 Statistical analysis

The analysis of biotechnological properties and fermentative activity was carried out in triplicate independent experiments, and the results are the mean $\pm$ standard deviation of different replicates at a significance level of $p\text{-value} < 0.05$. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate cell viability and fermentation parameters of the doughs (pH, titratable acidity, specific bread volume, and yeast count), as well as textural profile and sensory attributes. Tukey's post-hoc test was used to identify statistically significant differences among means. The biotechnological viability of the isolated yeasts was assessed using Student's t-test. According to the biotechnological properties of the yeasts (section 2.3), the results were divided into quartiles and transformed into qualitative codes. This standardization of the previously expressed analysis, which had been expressed in different units, was necessary. Principal component analysis (PCA) was performed in each case. All statistical analysis were conducted using R Statistical software (v. 4.1; R Core Team, 2021).³³

3 Results and Discussion

3.1 Identification of yeasts of sourdoughs collected in different regions climate do state from the Paraíba and diversity microbial

A total of 31 yeast isolates were obtained, and their identities were previously confirmed by MALDI-TOF analysis. The results of the microbial enumeration and the preliminary identification are presented in Table 1.

Table 1 – Identification and number of viable cells (mean $\pm$ standard deviation) of yeasts isolated from sourdough from different climatic regions of Paraíba - Brazil.

Yeasts	Nº. of isolates	MALDI-TOF ID
--------	-----------------	--------------

Location	Mean $\pm$ SD		
JPA	7.2 $\pm$ 0.20 ^{Aa}	6	<i>S. cerevisiae</i> (6);
JPB	7.3 $\pm$ 0.36 ^{Aa}	12	<i>S. cerevisiae</i> (12);
SL	7.4 $\pm$ 0.52 ^{Aa}	9	<i>S. cerevisiae</i> (9);
CJ	7.2 $\pm$ 0.35 ^{Aa}	4	<i>S. cerevisiae</i> (4);

Abbreviation: JPA = Bakery A in João Pessoa; JPB = Bakery B in João Pessoa; SL: Bakery in Solânea; CJ: Bakery in Cajazeiras. Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) in the counts of each microorganism, based on the t-test for independent samples. Different superscript lowercase letters in the same column indicate the differences ($p < 0.05$) in counts in the different regions, based on Tukey's post-hoc test.

A comparison of the number of isolates per type of microorganism in each location showed that there was no statistically significant difference in yeast counts among different bakeries in the humid region (João Pessoa A and João Pessoa B regions) ($p < 0.05$). A mature sourdough is identified by a predominance of bacteria over yeast (bacteria population 1-2 log higher than the yeast population).⁴ Initially, the microbiota of a yeast is characterized by the microbiota of the flour, whose bacterial concentration generally does not exceed 5 log CFU/g. Throughout the fermentation process, the pH decreases due to the production of lactic and acetic acid by the LAB. The environment becomes more selective, allowing the bacteria and yeasts to adapt to the new conditions and dominate the mature yeast with concentrations of 6 to 9 log CFU/g and 5 to 8 log CFU/g, respectively,⁴ also identified in the yeasts collected in this study.

The most common yeasts found in sourdough are *C. humilis*, *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae*. It has been documented that certain stable doughs may consist of only one or two species.³⁴ Two hundred yeast isolates examined from six different sourdough samples, the majority were identified as *S. cerevisiae* species (91 isolates), *K. humilis* (92 isolates), *Torulaspora delbrueckii* (9 isolates), and others (8 isolates).²³ These findings corroborate our study, in which of the 33 yeast strains isolated, all were identified as *S. cerevisiae*. Species can colonize a sourdough from the bakery environment or from the baker's hands.¹⁴

Although all isolates were identified as *Saccharomyces cerevisiae*, it is known that in the industrial process, even when using the same species of yeast, there can be significant differences in the fermentation process, due to adaptation to the process conditions.³⁵ Therefore, biotechnological viability tests are important to identify those isolates that are better adapted to

the characteristic environment of a mature sourdough, making them suitable for future use as starter cultures.

Due to the limited in-depth characterization of the biotechnological properties of yeasts in the current literature³, the present study aimed to characterize the yeasts isolated from the collected ferments. The evaluation included sucrose fermentation with CO₂ production, growth at different temperatures, acid production, and growth at different glucose concentrations and pH levels.

Following the biotechnological assays, strains 127 (Cajazeiras) and 57 (João Pessoa), which showed remarkable sucrose fermentation with CO₂ production and viability at pH 3 and 5, were further subjected to identification by DNA sequencing using ITS marker amplicons. Both strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae*, confirming the initial results obtained by MALDI-TOF analysis.

3.2 Evaluation of biotechnological viability of isolated yeasts

The results of sucrose fermentation with CO₂ production, acid production, and growth at different temperatures are presented in Table 2.

Table 2 – Sucrose fermentation capacity with CO₂ formation, acid production and growth at different temperatures by yeasts isolated from sourdoughs from different climatic regions of Paraíba-Brazil.

Location	Isolated	CO ₂ *	Acid**	Growth at 25° C	Growth at 35° C
João Pessoa A	<i>S. cerevisiae</i> 28	+	+	7.30 ± 0.00 ^{AA}	7.51 ± 0.03 ^{Ba}
João Pessoa A	<i>S. cerevisiae</i> 29	+	+	7.30 ± 0.00 ^{AA}	7.62 ± 0.06 ^{Ba}
João Pessoa A	<i>S. cerevisiae</i> 30	+	+	< 1.00 ± 0.00 ^{Ad}	< 1.00 ± 0.00 ^{Ba}
João Pessoa A	<i>S. cerevisiae</i> 31	+	+	7.72 ± 0.08 ^{Aa}	7.87 ± 0.07 ^{Ba}
João Pessoa A	<i>S. cerevisiae</i> 43	+	+	7.35 ± 0.06 ^{Aa}	7.39 ± 0.10 ^{Aa}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 56	+	+	7.89 ± 0.05 ^{Aa}	8.11 ± 0.06 ^{Ab}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 57	+	+	7.54 ± 0.07 ^{Ab}	7.85 ± 0.00 ^{Ac}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 58	+	+	8.18 ± 0.02 ^{Ab}	8.20 ± 0.005 ^{Ab}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 59	+	+	8.24 ± 0.02 ^{Ab}	8.35 ± 0.07 ^{Ad}

João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 60	+	+	7.70 ± 0.34^{Aa}	8.34 ± 0.01^{Bd}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 61	+	+	7.98 ± 0.11^{Aa}	8.09 ± 0.06^{Ab}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 62	+	+	$< 1.00 \pm 0.00^{Ad}$	$< 1.00 \pm 0.00^{Ba}$
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 64	+	+	8.22 ± 0.07^{Ab}	8.21 ± 0.01^{Ab}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 72	+	+	7.96 ± 0.04^{Aa}	8.07 ± 0.01^{Bb}
João Pessoa B	<i>S. cerevisiae</i> 73	+	+	7.95 ± 0.00^{Aa}	8.19 ± 0.01^{Bb}
Solânea	<i>S. cerevisiae</i> 94	+	+	7.65 ± 0.00^{Aa}	7.60 ± 0.00^{Aa}
Solânea	<i>S. cerevisiae</i> 104	-	+	$< 1.00 \pm 0.00^{Ad}$	$< 1.00 \pm 0.00^{Ba}$
Solânea	<i>S. cerevisiae</i> 107	+	+	7.39 ± 0.10^{Ab}	7.15 ± 0.17^{Aa}
Solânea	<i>S. cerevisiae</i> 109	+	+	7.48 ± 0.00^{Aa}	7.20 ± 0.23^{Aa}
Solânea	<i>S. cerevisiae</i> 111	-	+	7.65 ± 0.05^{Ab}	7.29 ± 0.13^{Ba}
Cajazeiras	<i>S. cerevisiae</i> 126	+	+	7.59 ± 0.33^{Aa}	7.30 ± 0.00^{Aa}
Cajazeiras	<i>S. cerevisiae</i> 127	+	+	7.68 ± 0.23^{Aa}	7.54 ± 0.07^{Ba}
Cajazeiras	<i>S. cerevisiae</i> 128	+	+	8.07 ± 0.03^{Ab}	$< 1.00 \pm 0.00^{Ba}$
Cajazeiras	<i>S. cerevisiae</i> 129	+	+	7.95 ± 0.02^{Ac}	$< 1.00 \pm 0.00^{Ba}$

Note: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) obtained in the counts of each temperature based on paired t-test. Different superscript lowercase letters in the same column indicate the differences ($p < 0.05$) between the different samples, based on Tukey's post-hoc test.

CO₂ formation: - for no gas production; + for positive for gas formation

**Acid production: - for no acid production; + for positive for acid formation

All strains collected from the humid region (João Pessoa A and B) showed gas formation. The four strains isolated from sourdough collected in the semi-arid region (Cajazeiras) demonstrated high levels of gas production within the first 24 hours of observation. In contrast, two of the five yeast strains isolated from the semi-humid region (Solânea) showed no sucrose fermentation, even after 72 hours of monitoring.

Fermentation capacity is a highly desirable trait in baking and plays a key role in the classification of yeasts¹⁹ and in their selection as starter cultures.⁸ *Saccharomyces cerevisiae* is considered to be the most efficient CO₂ producer among yeast species²¹, allowing it to dominate fermentative processes, which are commonly found in bakery yeasts.²

Regarding acid production, all yeast strains exhibited acid production after nine days of observation. Temperature is an important factor influencing the dynamics of the microbial community and the kinetics of metabolite production during the fermentation process. It accounts for approximately 44% of the physical, chemical, and volatile properties of fermented bread.⁷ At lower fermentation temperatures, lactic acid bacteria reduce their acidification rate,

which favors CO₂ production by yeasts³⁶, and thus affects the final volume of the bread. In contrast, higher temperatures lead to greater intracellular accumulation of ethanol, which alters membrane structure and functionality, ultimately reducing cell viability due to ethanol toxicity.³⁷

The number of viable cells at temperatures above 25 °C is an important biotechnological property, since microorganisms used in dry yeast and starter cultures are often exposed to temperatures higher than ambient conditions.³⁸ In this study, a higher number of viable cells was observed at 35 °C in João Pessoa A (samples 28, 29, and 31) and João Pessoa B (samples 60, 72, and 73). In contrast, Solânea (sample 111) and Cajazeiras (samples 127, 128, and 129) showed a significantly higher cell multiplication at 25 °C.

Each yeast sample was propagated under different temperature conditions. The strain from João Pessoa A was propagated in an oven room, with an average temperature of 30-35 °C, while the strain from João Pessoa B was propagated at 25-30 °C. The yeast collected in Cajazeiras, a semi-arid region of the state, was propagated at room temperature (30-37 °C), but immediately after reactivation, it was stored under refrigeration at 10 °C. In Solânea, a semi-humid region, propagation was carried out at 20-25 °C. Despite regional differences in propagation temperatures, the temperature at which the yeasts were maintained appears to be a determining factor in strain behavior, as yeasts stored at higher temperatures exhibited a significantly greater number of viable cells at 35 °C ($p < 0.05$).

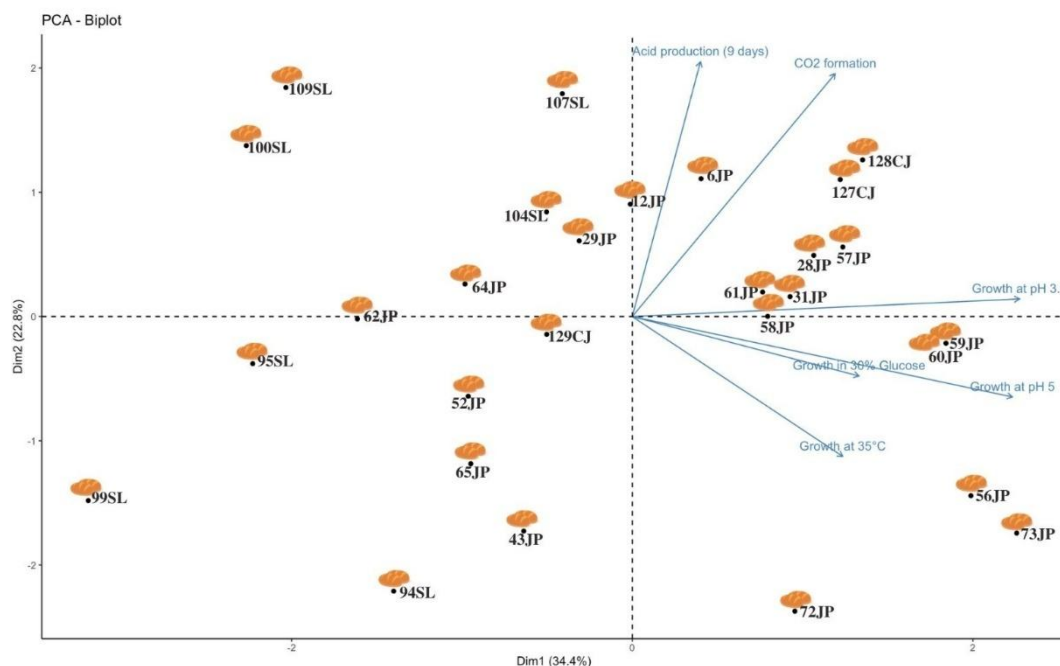
Glucose is the primary energy source used by *S. cerevisiae*. However, at high concentrations, it induces osmotic stress by promoting the passive diffusion of water from the cell into the environment, which can lead to cell death. This process requires cellular mechanisms to counteract the stress.³⁹ Microorganisms with greater osmotolerance have a survival advantage in such environments.⁴⁰ In this study, all strains were able to multiply when exposed to glucose concentrations of 10%, 20%, and 30% after 12 hours of fermentation.

During fermentation, organic acids such as lactic, acetic, and succinic acids are produced, increasing the acidity of the mass and lowering the pH⁷. This acidification can damage the yeast membrane, impairing its viability and metabolism, leading to toxicity and subsequent cell death.³ The ability of strains to adapt to these adverse conditions appears to improve their resilience. Yeasts that are more resistant to low pH levels show greater competitiveness within the complex microbiota during fermentation.⁴¹, making pH tolerance an important trait in the selection of starter cultures.¹⁷ In this study, no strain showed growth inhibition at pH 5 or pH 3.5.

3.3 Multivariate statistical analysis and selection of strains with enhanced biotechnological suitability

As shown in Figure 1, principal components 1 and 2 of the PCA plot accounted for 57.2% of the total variability, offering a comprehensive overview of the relationships between the analyzed samples.

Figure 1 - PCA of the yeast strains based on different technological characteristics.



The *S. cerevisiae* isolates 129, 43, 29, 64, 109, 107, and 94 were not significantly associated with any of the biotechnological properties simultaneously. Among these, three were collected from sourdough in Solânea, a semi-humid region of the state of Paraíba; three from João Pessoa, a humid region; and one from Cajazeiras, a semi-arid region of the state.

In the lower right quadrant of the graph, the isolates that showed growth at 35 °C, in 30% glucose and at pH 5.0 were *S. cerevisiae* isolates 72, 56, 73, 59, 60 and 58, all collected from João Pessoa. Notably, in the upper right quadrant of the graph, we identified samples that simultaneously exhibit CO₂ formation, acid production, and growth at different pH 3.5 concentrations: strains *S. cerevisiae* 128, 127, 57, 28, 31, and 61. In addition, among these isolates, samples *S. cerevisiae* 127 and *S. cerevisiae* 57, obtained from sourdoughs collected in Cajazeiras (semi-arid region) and João Pessoa (humid region), respectively, stand out for their remarkable performance in CO₂ production and growth simultaneously at pH 3.5. Such observations indicate substantial correlations between the parameters evaluated, contributing to

a deeper understanding of the potential of the isolated yeasts regarding fermentation processes in the specific context of sourdough from Paraíba, thus indicating potential strains to be used as starter cultures, since they are adapted to the stressful conditions inherent to a sourdough, so that both strains were selected to carry out tests to evaluate fermentation activity in sourdough.

3.4 Analysis of fermentation activity

Physicochemical parameters and number of viable yeast cells in sourdough inoculated with *S. cerevisiae* 57 or *S. cerevisiae* 127 or control are presented below in Table 3.

Table 3 – Cell viability and fermentation parameters of doughs (mean $\pm$ standard deviation) inoculated with different strains of *S. cerevisiae* during 24 h of fermentation at 28 ± 0.5 °C.

Variables	Fermentation time (hours)	Control	SC57	SC127
pH	0 h	5.56 $\pm$ 0.00 ^{Aa}	5.58 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	5.60 $\pm$ 0.01 ^{Aa}
	6 h	5.26 $\pm$ 0.03 ^{Ba}	5.12 $\pm$ 0.02 ^{Ba}	5.20 $\pm$ 0.07 ^{Ba}
	18 h	4.21 $\pm$ 0.05 ^{Ca}	4.13 $\pm$ 0.05 ^{Ca}	4.31 $\pm$ 0.11 ^{Ca}
	24 h	4.17 $\pm$ 0.11 ^{Ca}	4.11 $\pm$ 0.03 ^{Ca}	4.23 $\pm$ 0.10 ^{Ca}
Acidity (g/100g)	0 h	1.55 $\pm$ 0.19 ^{Da}	1.55 $\pm$ 0.19 ^{Da}	1.55 $\pm$ 0.19 ^{Ca}
	6 h	2.55 $\pm$ 0.19 ^{Cc}	3.44 $\pm$ 0.19 ^{Ca}	2.99 $\pm$ 0.01 ^{Bb}
	18 h	6.43 $\pm$ 0.50 ^{Ba}	6.65 $\pm$ 0.57 ^{Ba}	6.54 $\pm$ 0.50 ^{Aa}
	24 h	7.76 $\pm$ 0.19 ^{Aa}	7.65 $\pm$ 0.33 ^{Aab}	6.32 $\pm$ 0.01 ^{Ab}
Volume (mL)	0 h	19.3 $\pm$ 0.57 ^{Ca}	19.7 $\pm$ 0.57 ^{Ca}	19.3 $\pm$ 0.57 ^{Ca}
	6 h	32.0 $\pm$ 3.61 ^{Ba}	36.0 $\pm$ 1.73 ^{Ba}	32.3 $\pm$ 5.51 ^{Ba}
	18 h	47.0 $\pm$ 4.36 ^{Aa}	48.3 $\pm$ 1.53 ^{Aa}	50.7 $\pm$ 2.31 ^{Aa}
	24 h	37.3 $\pm$ 3.06 ^{Ba}	32.3 $\pm$ 1.53 ^{Ba}	35.3 $\pm$ 5.13 ^{Ba}
Yeast viability (log ₁₀ CFU/g)	0 h	5.24 $\pm$ 0.01 ^{Cb}	5.81 $\pm$ 0.01 ^{Ca}	5.27 $\pm$ 0.01 ^{Cb}
	6 h	6.52 $\pm$ 0.01 ^{Bb}	6.63 $\pm$ 0.13 ^{Ba}	6.63 $\pm$ 0.13 ^{Ba}
	18 h	6.57 $\pm$ 0.19 ^{Bb}	7.53 $\pm$ 0.24 ^{Aa}	7.26 $\pm$ 0.17 ^{Aa}
	24 h	7.25 $\pm$ 0.14 ^{Ab}	7.36 $\pm$ 0.15 ^{Aa}	7.37 $\pm$ 0.14 ^{Aa}

Control: dough inoculated with commercial *S. cerevisiae*; ^{A–D}: different capital letters superscripted in the same column for the same dough denote differences ($p < 0.05$) between fermentation times, based on Tukey's test; ^{a–b}: different lowercase letters superscripted on the same line for the same dough denote difference ($p < 0.05$) between fermented doughs, based on Tukey's test.

The pH of the samples ranged from 4.11 ± 0.03 to 5.60 ± 0.01 . At time 0 h, there were no significant differences in pH among the fermented doughs; however, a decrease in pH was observed in all samples at 6, 18, and 24 hours ($p < 0.05$). Yeasts are microorganisms that utilize carbon sources, primarily producing ethanol and CO₂ as secondary metabolites. At low concentrations, organic acids such as succinic acid can also be produced, contributing to a slight decrease in the pH of the fermented dough.^{34,42} Immediately after inoculation, the acidity was

1.55 ± 0.19, with no significant differences ($p > 0.05$) observed between the samples. However, after 6 and 24 hours, higher acidity was recorded for SC57 compared to SC127.

Regarding the increase in volume, the three samples were found to behave similarly over 24 hours ($p > 0.05$). A progressive increase in volume was observed up to 18 hours. However, after 24 hours, the dough appeared collapsed, with a reduction in volume due to the weakening of the gluten network.⁴³ Nevertheless, the volume remained greater than at time 0. The fermentation time tested in this study was longer than the typical fermentation times used in baking, which average four hours, with a range of 1 to 8 hours.²

Yeast viability in the sourdoughs analyzed ranged from 5.24 ± 0.01 to 7.53 ± 0.24 log CFU/g. All strains showed an increase in yeast viability of approximately two logarithmic cycles after 24 hours of fermentation ($p < 0.05$), confirming the fermentative activity of the inoculated microorganisms. In particular, *S. cerevisiae* strains 57 and 127 showed a significantly ($p < 0.05$) higher number of viable cells at the end of the fermentation process compared to the control sample. This suggests that these strains were better adapted to the acidified fermentation medium typical of sourdough production. This adaptability is a key factor in evaluating the potential of the tested strains (SC57 and SC127) for use in combination with lactic acid bacteria in sourdough, as the ability to persist at higher concentrations in an acidic environment is a crucial property for effective fermentative activity in sourdough.

In the fermentation process, the concomitant growth of lactic acid bacteria contributes significantly to the production of acids and the resulting decrease in pH.^{44, 45} This acidification promotes the diffusion of undissociated acids across the cell membrane of microorganisms present in the medium, impairing cell proliferation and metabolism. However, it appears that *S. cerevisiae* strains grown under stress conditions, characterized by low pH and high acidity, tend to exhibit naturally evolved adaptations, that allow them to continue producing CO₂.³ The results observed in this study suggest that the use of autochthonous *S. cerevisiae* strains 57 and

127 may represent a promising biotechnological alternative, as these selected mature yeast strains appear to be better adapted to the stress conditions typically encountered in sourdough environments.³⁴

The specific bread volume analysis and the texture profile (hardness, chewiness, gumminess, cohesiveness and elasticity) are presented in Table 4.

Table 04. Texture profile and specific volume of breads produced using commercial yeast and sourdough inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* strain 57 and 127.

	Samples		
	FC	SC57	SC127
Hardness (N)	2.73 ± 0.08 ^a	3.69 ± 0.03 ^b	3.24 ± 0.13 ^c
Chewiness	10.57 ± 0.47 ^a	14.33 ± 0.25 ^b	12.9 ± 0.78 ^c
Gumminess (N)	2,59 ± 0,07 ^a	3,44 ± 0,04 ^b	3,02 ± 0,11 ^c
Cohesiveness	0,94 ± 0,00 ^a	0,92 ± 0,03 ^a	0,93 ± 0,01 ^a
Springiness (mm)	4,09 ± 0,07 ^a	4,17 ± 0,03 ^a	4,27 ± 0,10 ^a
Volume	2,66 ± 0,09 ^a	2,49 ± 0,15 ^a	2,16 ± 0,50 ^a

^{a-b}Different lowercase letters superscripted on the same line denote difference ($p < 0.05$) between yeast.

FC : Commercial yeast; SC57: *Saccharomyces cerevisiae* 57; SC127: *Saccharomyces cerevisiae* 127.

The specific volume of bread reflects the dough's capacity to expand during the leavening and baking processes.⁴⁶ This expansion is facilitated by the gluten network, a complex formed of glutenin and gliadin proteins, that allows gas to be retained within the dough structure.⁴⁷ Although *S. cerevisiae* can utilize several endogenous sources of fermentable sugars in the fermentation process⁴⁸, no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the specific were observed volume among the bread samples. The addition of *Saccharomyces cerevisiae* strains SC57 and SC127 strains enhanced gas production during fermentation, contributing to increased bread volume compared to dough fermented with commercial yeast.⁴⁹ In addition, a higher concentration of free thiol groups, which influence the formation and stability of disulfide bonds, has been associated with improved bread volume in doughs fermented by *S. cerevisiae*.^{21,50} As observed in this study, the viability of SC57 and SC127 strains in fermented dough was statistically higher after 18 hours compared to that of commercial yeast. There may be a significant decline in commercial yeast viability throughout the fermentation process.⁵¹

The results indicate the resilience of these strains to the stress conditions inherent to fermentation and suggest their potential application in the production of dry sourdough capable of promoting volume increase in sourdough bread without the addition of commercial baker's yeast - a product type that remains limited in the market.⁵²

Texture analysis revealed that bread produced with *S. cerevisiae* strain SC57 exhibited higher values for hardness, chewiness, and gumminess. The higher hardness, a parameter which is measured from the peak force during the first compression cycle,⁵³ could be related to the lower volume. A degradation of the gliadin and glutenin fractions may affect the structure and gas retention capacity, which is reflected in the volume and texture.⁴⁹ Bread with the lowest pH also had greater hardness, which can be explained by the proteolysis of gluten due to the increase in acidity, resulting in a dough with greater extensibility and less elasticity, so the authors suggest a slower fermentation or a shorter fermentation time to improve this parameter.⁷ In contrast, no statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed among the three bread samples in terms of texture profiles such as springiness (the ratio of the distance traveled by the probe during the second bite to the distance traveled during the first bite; relates to how long it takes for the bread to return to its original shape after compression) and cohesiveness (the ratio of the area of the second peak to the area of the first peak and describes how well the bread holds together when crushed).⁵⁴ The springy texture indicates a uniform crumb, a less dense structure and a cohesive texture, desirable characteristics in baked goods.⁵⁵

The table 5 represents the results of sensory attributes of the bread produced.

Table 5. Sensory parameter profile of breads produced using commercial yeast and sourdough inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* 57 and 127.

	FC	SC57	SC127
Appearance	7.84 ± 1.27 ^a	7.70 ± 1.24 ^a	7.86 ± 1.27 ^a
Color	7.66 ± 1.36 ^a	7.32 ± 1.43 ^a	7.60 ± 1.20 ^a
Odor	7.15 ± 1.69 ^a	6.93 ± 1.60 ^a	7.04 ± 1.65 ^a
Aroma	7.32 ± 1.47 ^a	6.97 ± 1.60 ^a	7.08 ± 1.38 ^a

Taste	7.49 ± 1.26 ^a	7.32 ± 1.34 ^a	7.57 ± 1.24 ^a
Texture	6.76 ± 1.39 ^a	6.68 ± 1.68 ^a	6.74 ± 1.80 ^a

Lowercase letters superscripted on the same line denote no difference ($p < 0.05$) between yeast.

Fc : Commercial yeast; Sc57: *Saccharomyces cerevisiae* 57; Sc127: *Saccharomyces cerevisiae* 127.

There was no statistical difference ($p > 0.05$) in sensory parameters evaluated. However, when questioned about purchase intention, the SC127 sample showed a higher score.

The effect of yeast on bread textural properties, sensory attributes and shelf life is closely related to the production of bioactive compounds, or the release of bioactives from the substrates used, as well as modified enzymatic activities and the generation of taste precursor compounds.⁵⁶ During fermentation, acidification and the reduction of disulfide bonds between gliadins and glutenins result in the release of polypeptides that can be hydrolyzed to release free amino acids. These amino acids may further contribute to microbial activity, alongside the development of flavor and aroma.⁵⁷ Specifically, fermentation processes driven by *S. cerevisiae* lead to the formation of CO₂, enhancing the dough's elasticity and adhesiveness as fermentation progresses. This results in a more extensible dough, which, in turn, contributes to the lightness and increased acceptability of baked products.⁵⁸

The present research is the first one to characterize the microbiota of sourdough collected from different climatic regions of Paraíba, Brazil, thereby opening an investigative horizon regarding the influence of climate on natural fermentation processes. The results concluded that the microbiota of sourdoughs collected from different climatic regions of Paraíba, Brazil, is predominantly composed of yeasts, with a widespread presence of the species *S. cerevisiae*. When subjected to biotechnological viability tests, these yeasts exhibited viability under the conditions tested, with particular emphasis on the strains *S. cerevisiae* 127 (Cajazeiras) and *S. cerevisiae* 57 (João Pessoa B), which showed remarkable CO₂ production and growth viability, including biomass formation, at pH 3.5, characteristics that are essential for the selection of suitable starter cultures.

When evaluated for their fermentative activity in dough, the selected strains demonstrated a positive influence on reducing pH and increasing acidity, significantly increasing volume over 18 hours of fermentation, and promoting textural characteristics indicative of increased softness. *S. cerevisiae* strain SC57 showed greater viability after 24 hours of fermentation, highlighting its potential for application in sourdough bread production. This strain not only accelerates the production process but also shows its resistance to environmental conditions. Although there were no significant differences in specific volume or sensory attributes between the bread produced with the different strains, a higher purchase intention was observed for the bread produced with the *S. cerevisiae* strain SC127.

Our results suggest that the application of *S. cerevisiae* strains 57 and 127 as starter cultures in the production of sourdough and sourdough bread represents a promising biotechnological alternative in terms of viability and final bread quality. Furthermore, future studies investigating the synergistic interactions between these yeast strains and lactic acid bacteria, also isolated from sourdoughs collected in the same region and with high biotechnological potential, may support the development of dry sourdough formulations, contributing to the industrial process of bread production through natural fermentation.

Author Contributions

Conceptualization: E.F.G; Methodology: E.F.G.; R.D.M.C. de A. Validation: E.F.G.; Formal analysis: ALL; Data curation: ALL; Preparation of the original draft: R.D.M.C. de A. Writing-review and editing: E.F.G.; R.D.M.C. de A.; T.Z.R. Supervision: E.F.G.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ABBREVIATIONS

CFU, colony-forming unit; BOD, Biochemical Oxygen Demand; CO₂, carbon dioxide; LAB, lactic acid bacteria; DNA, deoxyribonucleic acid; PCA, principal component analysis; PCR,

polymerase chain reaction; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; OD, optical density; YPD, yeast peptone dextrose.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the team at the Laboratory of Food Microbiology, associated to the Center for Technology and Development Regional – CTDR, of the Federal University of Paraíba; Multi-user Laboratory, associated to the Department of Pharmacy, from the Federal University of Paraíba, and Neoprospect Microbiome Technologies.

Funding

The Article Processing Charge for the publication of this research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES. This study was funded by the Foundation for Research Support of the State of Paraíba - FAPESQ-PB, including all reagents, laboratory material, culture medium and equipment used in this research.

REFERENCES

- (1) Arici, M.; Ozulku, G.; Yiuldirim, R.M.; Sagdic, O.; Durak, M.Z. Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *27*, 499–508. DOI: 10.1007/s10068-017-0282-0.
- (2) Arora, K.; Ameer, H.; Polo, A.; Di Cagno, R.; Rizzello, C.G.; Gobetti, M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *108*, 71–83. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.008.
- (3) Sanchez-Adri, I.E.; Sanmartín, G.; Prieto, J.A.; Estruch, F.; Fortis, E.; Randez-Gil, F. Technological and acid stress performance of yeast isolates from industrial sourdough. *Food Sci. Technol.* **2023**, *184*. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114957.
- (4) Gobetti, M.; Minervini, F.; Pontoni, E.; Di Cagno, R.; Angelis, M.D. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *239*, 3–18. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022.
- (5) Zhang, G.; Tu, J.; Sadiq, F.A.; Zhang, W.; Wang, W. Prevalence, genetic diversity, and technological functions of the *Lactobacillus sanfranciscensis* in sourdough: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*. DOI: 10.1111/1541-4337.12459.
- (6) Menezes, L.A.A.; Sardaro, S.M.L.; Duarte, R.T.D.; Mazzon, R.R.; Neviani, E.; Gatti, M.; Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. *Food Microbiol.* **2020**, *85*, 103302. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103302.
- (7) Siepmann, F.B.; Almeida, B.S. de; Waszczyński, N.; Spier, M.R.. Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. *LWT–Food Sci. Technol.* **2019**, *108*, 199–206. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.065.

- (8) Calvert, M.D.; Madden, A.A.; Nichols, L.M.; Haddad, N.M.; Lahne, J.; Dunn, R.R.; McKenney, E.A. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ* **2021**, *9*, 11389. DOI: 10.7717/peerj.11389.
- (9) Gänzle, M.G.; Ripari, V. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *239*, 19–25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004.
- (10) Sevgili, A.; Can, C.; Ceyhan, D.I.; Erkmén, O. Molecular identification of LAB and yeasts from traditional sourdoughs and their impacts on the sourdough bread quality characteristics. *Curr. Res. Food Sci.* **2023**, *6*, 100479. DOI: 10.1016/j.crfs.2023.100479.
- (11) García-Béjar, B.; Fernández-Pacheco, P.; Carreño-Domínguez, J.; Briones, A.; Arévalo-Villena, M. Identification and biotechnological characterisation of yeast microbiota involved in spontaneous fermented whole grain sourdoughs. *J. Sci. Food Agric.* **2023**, *103*, 7683–7693. DOI: 10.1002/jsfa.12864.
- (12) De Vuyst, L.; Van Kerrebroeck, S.; Leroy, F. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. In: Sourdough fermentation, 100, *Adv. Appl. Microbiol.* **2017**, 49–160 pp. DOI: 10.1016/bs.aambs.2017.02.003.
- (13) Ribeiro, R.A.; Vitorino, M.V.; Godinho, C.P.; Bourbon-Melo, N.; Robalo, T.T.; Fernandes, F.; Rodrigues, M.S.; Sá-Correia, I. Yeast adaptive response to acetic acid stress involves structural alterations and increased stiffness of the cell wall. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12652. DOI: 10.1038/s41598-021-92069-3.
- (14) Bigey, F.; Segond, D.; Friedrich, A.; Guezenec, S.; Bourgeois, A.; Huyghe, L.; Agier, N.; Nidelette, T.; Sicard, D. Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes. *Current Biology* **2021**, *31*. DOI: 10.1016/j.cub.2020.11.016.
- (15) Berjar Bermejo, B.G.; Pacheco, P.F.; Domingues, J.C.; Briones, A. Identification and biotechnological characterisation of yeast microbiota involved in spontaneous fermented whole grain sourdoughs. *J. Sci. Food Agric.* **2023**, *103*. DOI: 10.1002/jsfa.12864.
- (16) Landis E.A.; Oliverio, A.M.; McKenney E.A.; Nichols L.M.; Kfoury N.; Biango-Daniels M.; Shell LK, Madden A.A.; Shapiro L.; Sakunala S.; Drake K.; Robbat A.; Booker M.; Dunn R.R.; Fierer N.; Wolfe B.E. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *eLife* **2021**, *10*, e61644. DOI: 10.7554/eLife.61644.
- (17) Pontonio, E.; Nionelli, L.; Curiel, J.A.; Sadeghi, A.; Di Cagno, R.; Gobetti, M.; Rizzello, C.G. Iranian wheat flours from rural and industrial mills: Exploitation of the chemical and technology features, and selection of autochthonous sourdough starters for making breads. *Food Microbiol.* **2015**, *47*, 99–110. DOI: 10.1016/j.fm.2014.10.011.
- (18) Garcia, E.F.; Luciano, W.A.; Xavier, D.E.; Costa, W.C.A.; Oliveira, K.D.S.; Franco, O.L.; Júnior, M.A.D.M.; Lucena, B.T.L.; Picão, R.C.; Magnani, M.; Saarela, M.; Souza, E.L. Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential

Probiotic Properties of Selected Lactobacillus Strains *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 1371. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01371.

(19) Camargo, J.Z.; Nascimento, V.M.; Stefanello, I.; Silva, A.D.A.; Gonçalves, F.A.; Perdomo, I.C.; Vilela, D.M.; Simionatto, S.; Pereira, R.M.; Paz, M.F.D.A.; Leite, R.S.R.; Gelinski, J.M.L.N.; Fonseca, G.G. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mill with biotechnological potential for biofuel and food industries. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, 16, 390–399. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.006.

(20) Kurtzman, C. P; Fell, J. W., Boekhout, T. Chapter 7 - Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In *The Yeasts*, 5th ed.; Kurtzman, C. P; Fell, J. W., Boekhout, .T, Robert, V. Ed.; Elsevier Science: San Diego, USA, 2011; 1st ed.; pp 87–110. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.

(21) Xu, D.; Zhang, Y.; Tang, K.; Hu, Y.; Xu, X.; Gänzle, M. Effect of mixed cultures of yeast and lactobacilli on the quality of wheat sourdough bread. *Front. Microbiol.* **2019**, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02113.

(22) Robles-Iglesias, R.; Nicaud, J.M.; Veiga, M.C.; Kennes, C. Integrated fermentative process for lipid and β -carotene production from acetogenic syngas fermentation using an engineered oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast. *Bioresource Technol.* **2023**, 389, 129815. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129815.

(23) White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. A Guide to Methods and Applications, In: PCR Protocols, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. Academic Press, New York, USA, 1990. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

(24) Schmidt, P.A.; Bálint, M.; Greshake, B.; Bandow, C.; Römbke, J.; Schmitt, I. Illumina Metabarcoding of a Soil Fungal Community. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, 128, 128–132. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014.

(25) AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th, Salt Lake City, USA, 2016.

(26) Liu, T.; Li, Y.; Chen, J.; Sadiq, F.A.; Zhang, G.; Yang, L.; He, G. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. *Food Chem.* **2018**, 242, 91–97. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.081.

(27) Cera, S.; Tuccillo, F.; Knaapila, A.; Sim, F.; Manngard, J.; Niklander, K.; Verni, M.; Rizzello, C.G.; Katina, K.; Coda, R. Role of tailored sourdough fermentation in the flavor of wholegrain-oatbread *Curr. Res. Food Sci.* **2024**, 8, 100697. DOI: 10.1016/j.crfs.2024.100697.

(28) AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed., Method 10–05.01, *Guidelines for measurement of volume by rapeseed displacement*, 2001. Cereals & Grains Association, São Paulo. DOI: 10.1094/AACCIntMethod-10-05.01.

- (29) Mantzourani, I.; Plessas, S.; Odatzidou, M.; Alexopoulos, A.; Galanis, A.; Bezirtzoglou, E.; Bekatorou, A. Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chem.* **2019**, *271*, 259–265. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.183.
- (30) Liu, A.; Su, S.; Sun, Y.; Li, Q.; Li, J.; Hu, K.; Zhao, N.; He, L.; Chen, S.; Liu, S. Enhancing the highland barley-wheat dough network structure and bread quality using freeze-dried sourdough powder with inulin as a protectant. *LWT–Food Sci. Technol.* **2024**, *191*. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115599.
- (31) Meilgaard, M., Moya, E. *Technical Quarterly Master Brewers Association*. Am. 8(2), XVII, 1971.
- (32) Stone, H.; Sidel, J.L. Affective Testing. Sensory Evaluation Practices, 243–270p, 1993. DOI: 10.1016/B978-0-12-672482-0.50014-9.
- (33) R Core Team. R: A Language and environment for statistical computing, Ver: 4.1, 2021, <https://cran.r-project.org>.
- (34) De Vuyst, L.; Harth, H.; Van Kerrebroeck, S.; Leroy, F. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *239*, 26–34. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018.
- (35) Guillamón, J.M.; Barrio, E. Genetic Polymorphism in Wine Yeasts: Mechanisms and Methods for its detection *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 806. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00806.
- (36) Xu, D.; Zhang, H.; Xi, J.; Jin, Y.; Chen, Y.; Guo, L.; Jin, Z.; Xu, X. Improving bread aroma using low-temperature sourdough fermentation. *Food Biosci.* **2020**, *37*, 100704. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100704.
- (37) Junior, A.C.; Sant’ana, A.S. Advances in yeast preservation: physiological aspects for cell perpetuation *Curr. Opin. Food Sci.* **2020**, *38*, 62–70. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.10.019.
- (38) Brandt, M.J. Industrial production of sourdoughs for the baking branch – An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *302*, 3–7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.008.
- (39) Shen D.; He, X.; Weng, P.; Liu, Y.; Wu, Z. A review of yeast: High cell-density culture, molecular mechanisms of stress response and tolerance during fermentation. *FEMS Yeast Research.* **2022**, *22*, 1-16, DOI: 10.1093/femsyr/foac050.
- (40) Betlej, G.; Bartor, E.; Oklejewicz, B.; Potocki, L.; Gorka, A.; Slowik-Borowiec, M.; Czarny, W.; Domka, W.; Kwiatkowska, A. Long-Term adaption to high osmotic stress as a tool for improving enological characteristics in industrial wine yeast. *Genes* **2020**, *11*. DOI: 10.3390/genes11050576.
- (41) Navarrete, S.P.C.; Santiago, R.P.; Rodríguez, R.S.; Martínez, R.; Caspeta, L. Adaptive responses of yeast strains tolerant to acidic pH, acetate, and supraoptimal temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *107*, 4051–4068. DOI: 10.1007/s00253-023-12556-7.

- (42) Schmidt, M.; Wagner, R.; Schmidt, S. Mapping of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites in fermenting wheat straight-dough reveals succinic acid as pH-determining factor. *Food Chemistry*, 2013, 138, 2–3, 2029–2036. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.08.039
- (43) Meerts, M.; Ramirez, A.; Struyf, N.; Cardinales, R.; Courtin, C.M.; Moldenaers, P., *J. Cereal Sci.* **2018**, 82, 183–189. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.06.006.
- (44) Sander, S.; Bron, P.A.; Smid, E.J. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT–Food Sci. Technol.* **2018**, 90, 201–206. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.022.
- (45) Sieuwerts, S.; Bron, P.A.; Smid, E.J. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT–Food Sci. Technol.* **2018**, 90, 201–206. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.022.
- (46) Caglar, N.; Ermis, E.; Durak, M.Z. Spray-Dried and Freeze-Dried Sourdough Powders: Properties and Evaluation of Their Use in Breadmaking. *J. Food Eng.* **2021**, 292, 110355. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110355.
- (47) Srivastava, S.; Kollemparembil, A. M.; Zettel, V.; Claßen, T.; Mobarak, M.; Gattermig, B.; Delgado, A.; Jekle, M.; Hitzmann, B. An innovative approach in the baking of bread with CO₂ gas hydrates as leavening agents. *Foods* **2022**, 11, 3570. DOI: 10.3390/foods11223570.
- (48) Struyf, N.; Maelen, E.; Hemdane, S.; Verspreet, J.; Verstrepen, K.J.; Courtin, C.M. Bread dough and baker's yeast: An uplifting synergy. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, 16, 850–867. DOI: 10.1111/1541-4337.12282.
- (49) Tomić, J.; Dapčević-Hadnađev, T.; Škrobot, D.; Maravić, N.; Popović, N.; Stevanović, D.; Hadnađev, M. Spontaneously fermented ancient wheat sourdoughs in breadmaking: Impact of flour quality on sourdough and bread physico-chemical properties. *LWT–Food Sci. Technol.* **2023**, 175, 114482. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114482.
- (50) Tang, K.X.; Zhao, C.J.; Gänzle, M.G. Effect of glutathione on the taste and texture of type I sourdough bread. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 4321–4328. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00897.
- (51) Reale, A.; Di Renzo, T.; Preziuso, M.; Panfili, G.; Cipriano, L.; Messina, M.C. Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *LWT–Food Sci. Technol.* **2019**, 99, 468– 475. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.016.
- (52) Santos, J.G.; de Souza, E.L.; de Souza Couto, M.V.; Rodrigues, T.Z.; de Medeiros, A.R.S.; de Magalhães Cordeiro, A.M.T.; Lima, M.D.S.; de Oliveira, M.E.G.; da Costa Lima, M.; de Araújo, N.P.R.; Gonçalves, I.C.D.; Garcia, E.F. Exploring the Effects of Freeze-Derived Ice Creams with *Lactiplantibacillus pentosus* 129 and *Limosilactobacillus fermentum* 139 on the Quality of Long Fermented Bread. *Microorganisms* **2024**, 12, 1199. DOI: 10.3390/microorganisms12061199.
- (53) Akyüz, G.; Mazı, B.G. Physicochemical and sensory characterization of bread produced from different dough formulations by *Kluyveromyces lactis*. *J. Food Process. Preserv.* **2020**, 44, e14498. DOI: 10.1111/jfpp.14498.

- (54) Temkov, M.; Rocha, J.M.; Rannou, C.; Ducasse, M.; Prost, C. Influence of baking time and formulation of part-baked wheat sourdough bread on the physical characteristics, sensory quality, glycaemic index and appetite sensations. *Front. Nutr.* **2024**, *11*, 1370086. DOI: 10.3389/fnut.2024.1370086.
- (55) Terrazas-Avila, P.; Palma-Rodríguez, H.M.; Navarro-Cortez, R.O.; Hernández-Uribe, J.P.; Piloni-Martini, J.; Vargas-Torres, A. The effects of fermentation time on sourdough bread: An analysis of texture profile, starch digestion rate, and protein hydrolysis rate. *J. Texture Stud.* **2024**, *55*, e12831. DOI: 10.1111/jtxs.12831.
- (56) Sadeghi, A.; Ebrahimi, M.; Hajinia, F.; Kharazmi, M.S.; Jafari, S.M. FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; back to the future. *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *136*. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.03.026.
- (57) Dunaevsky, Y.E.; Tereshchenkova, V.F.; Belozersky, M.A.; Filippova, I.Y.; Oppert, B.; Elpidina, E.N. Effective degradation of gluten and its fragments by gluten-specific peptidases: a review on application for the treatment of patients with gluten sensitivity. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1603. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101603.
- (58) Zahra, P.; Farooq, U.; Saeed, M.T.; Quddoos, M.Y.; Hameed, A.; Iftikhar, M.; Noreen, A.; Zahra, S.M.; Hussain, A.; Bukhari, S.R.; Rafique, A.; Naqvi, S.N.; Chaudhry, F. Enhancement of sensory attributes and mineral content of sourdough bread by means of microbial culture and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Chem. Adv.* **2022**, *1*. DOI: 10.1016/j.focha.2022.100094.