



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AGROALIMENTAR

APLICAÇÃO DE CEPAS DE *Lactobacillus* spp. COMO
CULTURA INICIADORA NA PRODUÇÃO DE FERMENTO
NATURAL FRESCO E LIOFILIZADO E SEUS IMPACTOS NA
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE PÃES DE LONGA
FERMENTAÇÃO

Joanderson Gama Santos

Bacharel em Gastronomia

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AGROALIMENTAR**

**APLICAÇÃO DE NOVAS CEPAS DE *Lactobacillus* spp.
COMO CULTURA INICIADORA NA PRODUÇÃO DE
FERMENTO NATURAL FRESCO E LIOFILIZADO E SEUS
IMPACTOS NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE PÃES DE
LONGA FERMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar, do Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias, Campus III da UFPB, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Agroalimentar.

Joanderson Gama Santos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a **Ingrid Conceição Dantas Gonçalves**

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a **Estefânia Fernandes Garcia**

Bananeiras
2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237a Santos, Joanderson Gama.

Aplicação de cepas de *Lactobacillus* spp. como cultura iniciadora na produção de fermento natural fresco e liofilizado e seus impactos na produção e qualidade de pães de longa fermentação / Joanderson Gama Santos. - Bananeiras, 2023.

99 f. : il.

Orientação: Ingrid Conceição Dantas Gonçalves.

Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHSA.

1. Fermento natural. 2. Bactéria ácido-lática. 3. Liofilização. 4. Panificação. I. Gonçalves, Ingrid Conceição Dantas. II. Garcia, Estefânia Fernandes. III. Título.

UFPB/CCHSA

CDU 658 (043)




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO


TÍTULO: Aplicação de cepas de (*Lactobacillus* spp.) como cultura iniciadora na produção de fermento natural fresco e liofilizado e seus impactos na produção e qualidade de pães de longa fermentação

AUTOR: Joanderson Gama Santos

JULGAMENTO

Examinadores	Conceito	Assinatura
Prof. ^a Dr. ^a Ingrid Conceição Dantas Gonçalves Presidente	Aprovado	 Documento assinado digitalmente INGRID CONCEICAO DANTAS GONCALVES Data: 23/08/2023 17:05:28-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. ^a Dr. ^a Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro Examinadora	Aprovado	 Documento assinado digitalmente ANGELA MARIA TRIBUZY DE MAGALHAES CORD Data: 24/08/2023 17:04:45-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. Dr. Evandro Leite de Souza Examinador	Aprovado	 Documento assinado digitalmente EVANDRO LEITE DE SOUZA Data: 24/08/2023 15:04:37-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

Bananeiras, 21 de agosto de 2023

Documento assinado digitalmente
 INGRID CONCEICAO DANTAS GONCALVES
Data: 23/08/2023 17:05:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Prof.^a Dr.^a Ingrid Conceição Dantas Gonçalves
Orientadora

INFORMAÇÕES CURRICULARES DO AUTOR

Eu, Joanderson Gama Santos, solteiro, baiano da cidade Acajutiba, filho de Joivan José dos Santos e Marleide Conceição da Gama. Prestes a completar 29 anos, saí da casa dos meus pais em 2010 aos 15 anos de idade para estudar em outro estado e ingressar no curso técnico integrado em Manutenção e Suporte em Informática e fazer parte da primeira turma nessa área em um local de ensino que até então era caracterizado por oferecer cursos de Agropecuária e Agroindústria. Durante pouco mais de três anos, em meio a greves, paralisações, falta de estrutura e de professores concluí os meus estudos no Instituto Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão, antiga Escola Agrotécnica Federal de São Cristóvão. No Campus São Cristóvão o ensino era integral e durante o turno da noite exercia a função de monitor voluntário na modalidade de Ensino para Jovens e Adultos do mesmo curso. Esse primeiro contato com o ensino me fez perceber o quão gratificante é o processo de ensino-aprendizagem a partir da visão de quem instrui. Após a conclusão do ensino tive algumas experiências profissionais em instituições privadas no estado de Sergipe ao qual fixei residência por pouco mais de seis anos. Em 2016 dei início a minha graduação em Gastronomia pela Universidade Federal da Paraíba, no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional. Em 2018 participei do projeto de extensão carinhosamente intitulado “Pães de Maria”, após a minha participação durante dois anos neste projeto de extensão, inicialmente como bolsista por alguns meses continuei como voluntário após dar início como Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) durante os anos de 2018-2019 executando planos de trabalho na temática de produção de fermento natural e sua aplicação na elaboração de pães de longa fermentação. A minha formação em Bacharel em Gastronomia deu-se em meio a pandemia da Covid-19 e toda minha base de conhecimento, em constante formação, me possibilitaram a aprovação no Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA) em 2021 e a minha conclusão no corrente ano.

“Uma vida e várias existências... enquanto espíritos, somos individualidades”.

(ESE)

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus guias espirituais por toda proteção durante esses anos e por todos os livramentos durante as minhas viagens.

À minha família, que assim como outras ficaram mais fortes e unidas após a pandemia. Amo vocês.

As minhas orientadoras Prof.^a Dr.^a Ingrid Conceição Dantas Guerra e Prof.^a Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia por toda dedicação durante a minha vida acadêmica no curso de gastronomia e durante a minha orientação no PPGTA. À professora Estefânia meu muito obrigado por toda paciência e empenho em minha evolução pessoal, profissional e principalmente, por confiar em mim enquanto pesquisador durante todos esses anos.

À Prof.^a Dr.^a Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro e ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza por aceitarem compor a minha banca de defesa. Ao professor Evandro Leite por toda contribuição dada durante a minha qualificação, nos ajustes do meu estudo, e na concepção e construção dos artigos.

Aos docentes, técnicos administrativos, funcionários terceirizados e as amigadas que construí no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR).

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar, os docentes, técnicos administrativos e colegas de curso que me ajudaram durante o mestrado.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB), pelo aporte financeiro com a concessão da minha bolsa de estudos.

Gratidão à todas as pessoas que de algum modo contribuíram na execução e finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 FERMENTO NATURAL NA PANIFICAÇÃO	15
3.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO FERMENTO NATURAL	18
3.3 IMPACTO DOS INGREDIENTES NA QUALIDADE DOS PÃES	20
3.4 TECNOLOGIAS EMPREGADAS NA SECAGEM DO FERMENTO NATURAL E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DE PÃES	22
4. REFERÊNCIAS	25
CAPITULO II – ARTIGO 1	30
RESUMO	30
EXPLORANDO OS IMPACTOS DE CEPAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. COMO CULTURA INICIADORA NA QUALIDADE DE PÃES DE LONGA FERMENTAÇÃO	31
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1. MICRORGANISMOS, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FERMENTO NATURAL.....	35
2.2 CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DAS BAL.....	35
2.2.1 <i>Atividade de acidificação</i>	35
2.2.2 <i>Atividade proteolítica</i>	36
2.2.3 <i>Produção e extração de exopolissacarídeo (EPS)</i>	36
2.2.4 <i>Preparação de inóculo e produção de massa fermentada</i>	36
2.3 PRODUÇÃO DE PÃES DE LONGA FERMENTAÇÃO	38
2.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO FERMENTO NATURAL E DOS PÃES ELABORADOS	39
2.4.1 <i>Análise microbiológica</i>	39
2.4.2 <i>Análise físico-química de fermento natural e pão de fermento natural preparado</i>	40
2.5 CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DO PÃO FERMENTADO	41
2.5.1 <i>Volume específico</i>	41
2.5.2 <i>Análise de cor</i>	41
2.5.3 <i>Análise de textura</i>	41
2.6 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA (ADQ).....	42
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 ACIDIFICAÇÃO	43
3.2 PRODUÇÃO DE EPS E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	44
3.3 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS, PH E ANÁLISE DE ACIDEZ TITULÁVEL EM MASSA FERMENTADA	44
3.3.1 <i>Enumeração de contagens de células viáveis de BAL e leveduras em massa fermentada</i>	45
3.3.2 <i>pH e ATT durante a propagação de fermento natural</i>	46
3.4 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BAL E LEVEDURA E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM PÃO DE FERMENTO NATURAL.....	47
3.5 PH, ATT, UMIDADE E VOLUME ESPECÍFICO EM PÃO DE FERMENTO NATURAL.....	48
3.6 ANÁLISE DE COR E TEXTURA.....	49
3.7 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA (ADQ) DO PÃO DE FERMENTO NATURAL	51
REFERÊNCIAS.....	55
CAPITULO III – ARTIGO 2	59

RESUMO.....	59
EFEITO DE FERMENTOS NATURAIS LIOFILIZADOS COM LACTIPLANTIBACILLUS PENTOSUS 129 E LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM 139 NA QUALIDADE DO PÃO DE LONGA FERMENTAÇÃO.....	60
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1 MATERIAIS	65
2.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E DOS FERMENTOS NATURAIS	65
2.3 LIOFILIZAÇÃO DE FERMENTO NATURAL	66
2.4 ANÁLISE DOS FERMENTOS NATURAIS LIOFILIZADOS.....	66
2.4.1 Enumeração de células viáveis de BAL e leveduras e determinação de parâmetros físico-químicos durante o armazenamento	66
2.4.2 Quantificação de EPS	67
2.4.3 Determinação do estado fisiológico da microbiota do fermento natural	67
2.4.4 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos	68
2.5 PRODUÇÃO DOS PÃES.....	69
2.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DOS PÃES	70
2.7 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE TEXTURA DO PÃO.....	70
2.8 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO DO PÃO	70
2.8.1 DSC	70
2.8.1 DIVP (%).....	71
2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) EM PÃO.....	71
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BAL E LEVEDURAS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	73
3.2 ESTADO FISIOLÓGICO DA MICROBIOTA DE FERMENTO NATURAL	76
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE EPS E CONTEÚDO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO.....	77
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE DOS PÃES DE LONGA FERMENTAÇÃO	80
3.5.1 pH, ATT, umidade (%) e volume específico.....	80
3.5.2 Cor do miolo	82
3.6 PROPRIEDADES DA TEXTURA DO PÃO.....	83
3.7 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL E DIGESTIBILIDADE DA PROTEÍNA IN VITRO NOS PÃES	84
3.7.1 DSC	84
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) EM PÃO.....	86
4. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE	98

RESUMO

Fermento natural maduro compõe uma microbiota rica e diversa, principalmente por bactérias ácidos lácticas (BAL) e leveduras que produzem metabólitos secundários responsáveis por conferir propriedades tecnológicas no fermento natural e em pães de longa fermentação. As transformações bioquímicas que ocorrem em todas as etapas, desde a sua elaboração, passando pela propagação e, por fim, através da sua utilização na produção de pães de longa fermentação, repercutem na produção de produtos com características sensoriais e de qualidade que o diferenciam do pão de fermentação rápida e com leveduras de padaria. O fermento natural desidratado proposto neste estudo visa minimizar os custos com a produção, estocagem e logística em larga escala, além de desenvolver um produto que associe aumento de volume no pão ao sabor e melhores características funcionais e de vida de prateleira. Na primeira etapa foram avaliadas cinco cepas de *Lactobacillus* spp. como culturas iniciadoras na produção e propagação de fermento natural, utilizando farinha de trigo e água como substratos. Para a produção dos fermentos naturais, foram selecionadas três cepas que apresentaram os melhores resultados de acordo com os protocolos aplicados (*Limosilactobacillus fermentum* 56, *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139). Os fermentos naturais apresentaram microbiota estável e pH característico após 10 dias de propagação. Imediatamente após a sua maturação, os pães foram elaborados com os seus respectivos fermentos frescos e apresentaram durante o armazenamento satisfatória caracterização tecnológica e de qualidade principalmente nos pães produzidos a partir da inoculação das cepas de *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 como culturas iniciadoras de fermento natural. A liofilização dos fermentos naturais fez parte da segunda etapa deste estudo e teve por objetivo produzir fermentos com as cepas *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 isoladamente ou em co-cultura, avaliar sua estabilidade durante o armazenamento de 60 dias e produzir pães de longa fermentação como produto final obtido (fermento natural desidratado). Durante o armazenamento, os fermentos liofilizados apresentaram estabilidade (microbiológica e físico-química) e contagens de células viáveis entre 6 – 8 log UFC/g, que foi confirmada através da citometria de fluxo (> 70% de células viáveis). Dentre as amostras de fermentos liofilizados e seus respectivos pães, o pão produzido com o fermento liofilizado com a cepa *L. fermentum* 139 apresentou os melhores resultados nos parâmetros avaliados (textura, volume específico e digestibilidade da proteína *in vitro*). Um pedido de propriedade intelectual foi solicitado para o fermento natural liofilizado inoculado com a cepa *L. fermentum* 139. Por fim, com base nos resultados obtidos, foi possível produzir fermentos liofilizados a partir de cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 com características tecnológicas semelhantes ao fermento fresco e com atividade de levedação que dispensa a utilização de leveduras comerciais que atuem na rápida fermentação e produção de gases necessários para o aumento do volume do pão.

Palavras-chave: Fermento natural. Bactéria ácido-láctica. Liofilização. Panificação

APPLICATION OF *Lactobacillus* spp. STRAINS AS A STARTER CULTURE IN THE PRODUCTION OF FRESH AND FREEZE DRIED SOURDOUGH AND THEIR IMPACTS ON THE PRODUCTION AND QUALITY OF BREAD AND LONG FERMENTATION.

ABSTRACT

Mature sourdough composes a rich and diverse microbiota, mainly of lactic acid bacteria (LAB) and yeast. Its secondary metabolites are responsible for conferring technological properties on sourdough and long-fermentation breads. The biochemical transformations that occur at all stages, from its preparation, passing through propagation, and, finally, through its use in the production of long-fermentation breads, have an impact on the production of breads with sensory and quality characteristics that differentiate it from traditional bread. Dehydrated sourdough aims to minimize production, storage and logistics costs on a large scale, actions that are difficult when sourdough is used in its fresh form and enable the production of long-fermentation breads. Therefore, the study was divided into two stages. In the first stage, five strains of *Lactobacillus* spp. as starter cultures in the production and propagation of sourdough, using wheat flour and water as substrates. For the production of sourdough, three strains were selected that showed the best results according to the applied protocols (*Limosilactobacillus fermentum* 56, *Lactiplantibacillus pentosus* 129 and *Limosilactobacillus fermentum* 139). The sourdoughs showed stable microbiota and characteristic pH after 10 days of propagation. Immediately after maturation, the breads were prepared with their respective fresh sourdoughs and presented satisfactory technological and quality characteristics during storage, mainly in the breads produced from the inoculation of strains of *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 139 as starter cultures of sourdough. The freeze-dried of sourdoughs were part of the second stage of this study and aimed to produce sourdough with *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 139 strains in a single culture or co-culture, evaluate their stability during 60-day storage and produce long-fermentation breads as the final product obtained (dehydrated sourdough). During storage, the freeze-dried sourdoughs showed excellent stability (microbiological and physical-chemical) and high viable cell counts (between 6 – 8 log CFU/g) which was confirmed by flow cytometry (> 70%). Among the samples of freeze-dried sourdough and their respective breads, the bread produced with freeze-dried sourdough with the strain *L. fermentum* 139 showed the best results in the evaluated parameters (texture, specific volume, and protein digestibility in vitro). An intellectual property request was made for the freeze-dried sourdough inoculated with the *L. fermentum* 139 strain. Finally, based on the results obtained it was possible to produce freeze-dried sourdoughs from *Lactiplantibacillus pentosus* 129 and *Limosilactobacillus fermentum* 139 strains with technological characteristics similar to fresh sourdough and with leavening activity that eliminates the use of baker's yeast that act in the rapid fermentation and production of gases necessary for the increase in bread volume.

Keywords: Sourdough. Lactic acid bacteria. Freeze-drying. Baking.

CAPÍTULO I – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Na produção em escala industrial, assim como em padarias, a elaboração de pães se dá principalmente a partir da utilização de fermento biológico, fresco ou seco, sendo a espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais comumente empregada e facilmente disponível (Minervini *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2019). Nesse tipo de processo existe geralmente rápida fermentação, com a elaboração de produtos com padrão de sabor, aroma e textura, necessitando também do emprego de aditivos e adjuvantes de tecnologia para garantir a maior vida de prateleira dos pães.

Por outro lado, vem se tornado crescente nas últimas décadas o resgate, utilização e produção de massas de longa fermentação adicionadas de fermento natural em substituição parcial ou total do fermento comum, sejam em escala industrial, nas padarias e/ou a nível artesanal, por pessoas que possuem afinidade com a fermentação natural (Minervini *et al.*, 2016; Gobetti *et al.*, 2016; de Vuyst *et al.*, 2021 e Martín-García *et al.*, 2021). Historicamente, a produção de pães se deu a partir da fermentação espontânea, onde a presença de uma microbiota selvagem composta por bactérias e leveduras naturalmente presentes nos cereais com algum líquido, permite a produção de pães (Minervini *et al.*, 2016).

Carboidratos presentes nas farinhas são facilmente fermentáveis quando incorporado algum líquido a sua composição. A fermentação que ocorre nesse tipo de fermento é gerada pela ação de microrganismos autóctones que degradam principalmente, os açúcares das farinhas, com a produção de metabólitos que atuam diretamente nas características do fermento natural. O amadurecimento do fermento é marcado pela predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, sendo heterofermentativas ou homofermentativas, e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhammyces*, *Torulaspora* e *Pichia*. Estes grupos de microrganismos coabitam a microbiota e participam ativamente do processo de fermentação (De Vuyst *et al.*, 2014; Lhomme *et al.*, 2015; Ventimiglia *et al.*, 2015; Lhomme *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016; Van Kerrebroeck *et al.*, 2017; Carbonetto *et al.*, 2020).

No fermento natural, a ação das bactérias lácticas confere benefícios à qualidade da microbiota da massa fermentada. Na indústria de cereais, a deterioração e a contaminação, principalmente fúngica, atrelada ao armazenamento de produtos de panificação ainda é um grande problema que muitas vezes só é solucionado com a utilização de aditivos químicos alimentares (Quattrini *et al.*, 2018).

A procura do consumidor por alimentos que gerem saudabilidade são fatores que atualmente movimentam o crescimento de pesquisas no desenvolvimento de novos produtos que utilizam fermento natural desidratado. Esse tipo de fermento pode promover vantagens em relação ao fermento fresco, que possui menor padronização e vida de prateleira, além de maior custo de armazenamento, manutenção e transporte (Albagli *et al.*, 2021; Caglar *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de fermento natural desidratado com cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 possibilita a melhoria das características físico-químicas, sensoriais e tecnológicas do produto, tendo em vista um maior controle na produção e propagação do fermento utilizado na produção de pães de longa fermentação. Sendo assim, esse trabalho investigou: i) selecionar cepas de *Lactobacillus* spp. como cultura iniciadora na produção de fermento natural fresco e avaliar seus efeitos na qualidade de pães de longa fermentação; ii) avaliar a características de qualidade e os impactos dos fermentos naturais liofilizados com cepas de *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 individualmente e em co-cultura na produção de pães de longa fermentação.

Por fim, com base nos resultados obtidos, foi possível produzir fermento natural liofilizados inoculado com cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 com atividade de levedação que dispensa a utilização de leveduras comerciais para o aumento do volume do pão, e que melhoraram as características microbiológicas, sensoriais e funcionais dos pães elaborados..

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Selecionar cepas de *Lactobacillus* spp. para desenvolvimento de fermento natural e avaliar sua aplicação quando frescos e liofilizados em pães de longa fermentação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar cepas de *Lactobacillus* spp. com base nas características tecnológicas apresentadas para produtos de panificação;
- Elaborar fermento natural inoculado com *Lactobacillus* spp.;
- Avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do fermento natural fresco durante o período de propagação até maturação;
- Elaborar e avaliar a qualidade de pães com fermento natural fresco inoculado com cepas selecionadas de *Lactobacillus* spp.;
- Liofilizar fermentos naturais inoculados com cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 (Lpe129), *Limosilactobacillus fermentum* 139 (Lf139), Mix (Lpe129 + Lf139) e Controle;
- Avaliar a viabilidade de bactérias lácticas e leveduras nos fermentos naturais liofilizados, durante o armazenamento e produção de exopolissacarídeos (EPS);
- Avaliar as características físico-químicas dos fermentos naturais liofilizados durante o armazenamento;
- Desenvolver pães adicionados de fermentos naturais liofilizados e avaliar as características de qualidade durante o armazenamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FERMENTO NATURAL NA PANIFICAÇÃO

O pão baseado na fermentação natural é um dos mais antigos exemplos da fermentação espontânea em alimentos que remonta milhares de anos e um dos produtos mais consumidos em todo o mundo. A massa fermentada é obtida ao se misturar farinhas de cereais com algum líquido, geralmente água (Lattanzi *et al.*, 2013; Gobetti *et al.*, 2019 e De Vuyst *et al.*, 2021). A produção do fermento natural é classificada com base na tecnologia empregada para a sua obtenção. Na literatura, a massa fermentada pode ser iniciada a partir de três tipos de preparo (tipo I, tipo II e tipo III) (Chavan e Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2017; Reale *et al.*, 2019; De Vuyst *et al.*, 2021).

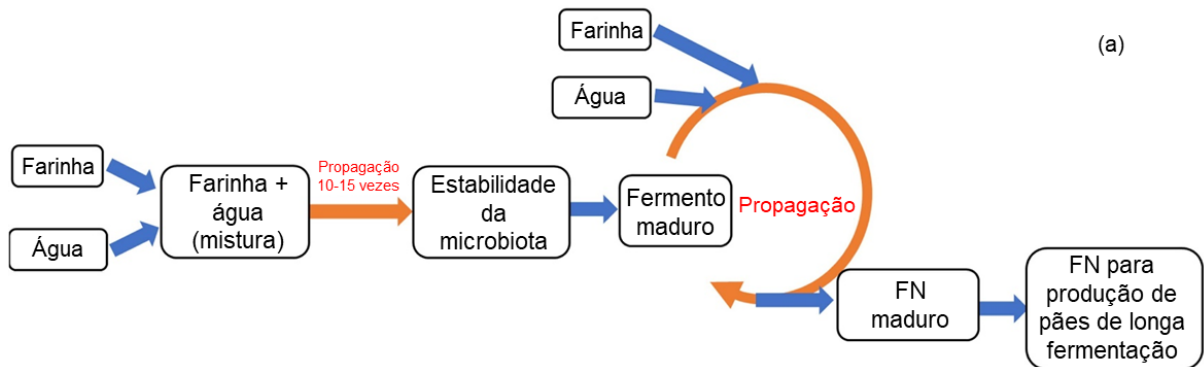
“Back-slopping” é o termo em inglês que se refere à retroalimentação ou propagação, etapa na qual o fermento deve ser frequentemente “alimentado” até o completo desenvolvimento da massa fermentada. Nos primeiros dias, essa retroalimentação pode ser a cada 12 horas, passando após o terceiro dia a ser a cada 24 horas. Após o décimo dia, o fermento natural pode ser armazenado sob condições de refrigeração com a finalidade de manter a composição microbiana que foi formada, sendo necessário sua reativação antes do emprego na produção de pães (Minervini *et al.*, 2010; Venturi *et al.*, 2012; De Vuyst *et al.*, 2021). A propagação no fermento exerce grande importância para o incremento e amadurecimento da sua microbiota, de modo que a adição regular de substrato, comumente água e farinha, em tempos determinados confere para a massa fermentada estabilidade, sinergia e tolerância microbiana entre BAL (bactérias ácido lácticas) e leveduras (Minervini *et al.*, 2010; Ganzle e Zheng, 2019).

O fermento tipo I (Figura 1) se baseia no fermento natural fresco que teve início a partir da sua própria microbiota. Conforme a massa é propagada e retroalimentada (adição diária de água e farinha, e descarte de uma parte do fermento natural), a microbiota selvagem presente nesse tipo de fermento é facilmente modificada de acordo com o manejo (condições de higiene do manipulador e do ambiente), preservação (armazenamento e temperatura) e ingredientes adicionados (Lattanzi *et al.*, 2014). A produção de massa fermentada do tipo I é lenta, onerosa e instável,

sendo o fermento natural mais utilizado por padarias artesanais e em nível doméstico na produção de pães tradicionais (De Vuyst *et al.*, 2014; Ganzle e Zheng, 2019).

Figura 1. Esquema de elaboração de fermento natural (FN) tipo I

TIPO I



Fonte: Vuyst *et al.*, 2017; Vuyst *et al.*, 2021 (adaptado)

O fermento natural tipo II (Figura 2) se caracteriza como uma massa fermentada que foi iniciada a partir da adição de microrganismos previamente selecionados, geralmente BAL e leveduras combinadas ou não, até a caracterização do seu amadurecimento, ou seja, são metabolicamente ativos e possuem uma microbiota estável. Esse tipo de fermento é geralmente resultado de processos industriais e visam, na fermentação de pães, contribuir como coadjuvante de acidificação, formação de sabor e/ou estabilizante durante o armazenamento em padarias industriais. Por se tratar de formulações semilíquidas ou secas por pulverização, esse tipo de fermento possui menor ação fermentativa, principalmente quando se leva em consideração a produção de gás carbônico, que faz parte do metabolismo das leveduras (De Vuyst *et al.*, 2021).

Figura 2. Esquema de elaboração de fermento natural (FN) tipo II

TIPO II

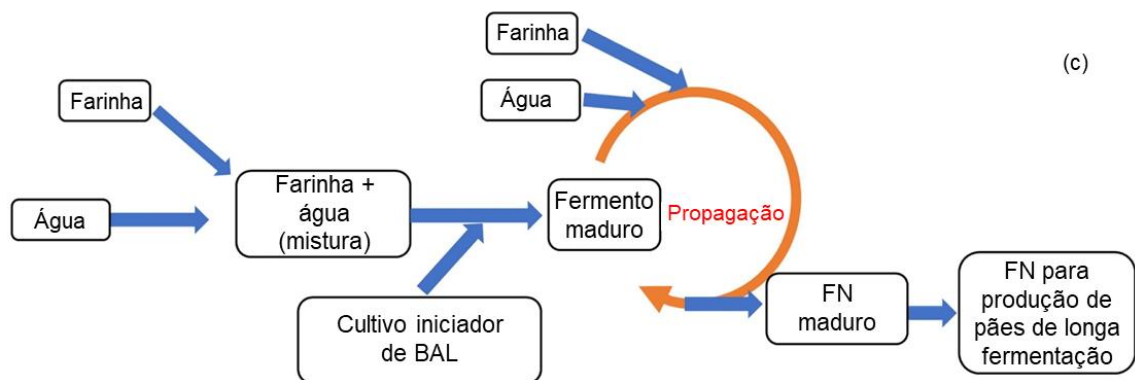


Fonte: Vuyst *et al.*, 2017; Vuyst *et al.*, 2021 (adaptado)

O fermento natural tipo III (Figura 3) representa a junção dos processos de produção dos fermentos naturais tipo I e II. Trata-se de um fermento natural que foi iniciado por uma cultura iniciadora, seguida de etapas de “back-slopping” (De Vuyst *et al.*, 2014; Stefanello *et al.*, 2019; De Vuyst *et al.*, 2021). A opção tipo III é preferida para a panificação industrial, já que o uso de cultura iniciadora (*starter*) representa uma menor variação microbiana e maior padronização, bem como possui o amadurecimento necessário (10 a 15) de propagação, que o caracteriza como fermento com microbiota estabilizada entre BAL e leveduras, que são microrganismos necessários na produção de pães de fermentação natural (Minervini *et al.*, 2010; De Vuyst *et al.*, 2021).

Figura 3. Esquema de elaboração de fermento natural (FN) tipo III.

TIPO III



Fonte: Vuyst *et al.*, 2017; Vuyst *et al.*, 2021 (adaptado)

Ao final dos seus respectivos processos, todos os tipos de fermento produzem massas fermentadas; entretanto, devido à secagem que ocorre, principalmente nos fermentos tipo II e III, seja por liofilização, pulverização e/ou secagem em estufa, a utilização de levedura *Saccaromyces cerevisiae* poderá ser considerada, uma vez que esses microrganismos são os maiores prejudicados durante os processos de desidratação, o que influi diretamente na sua capacidade de levedação, produção de gases e compostos necessários para a massa que será fermentada (De Vuyst et al, 2021).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO FERMENTO NATURAL

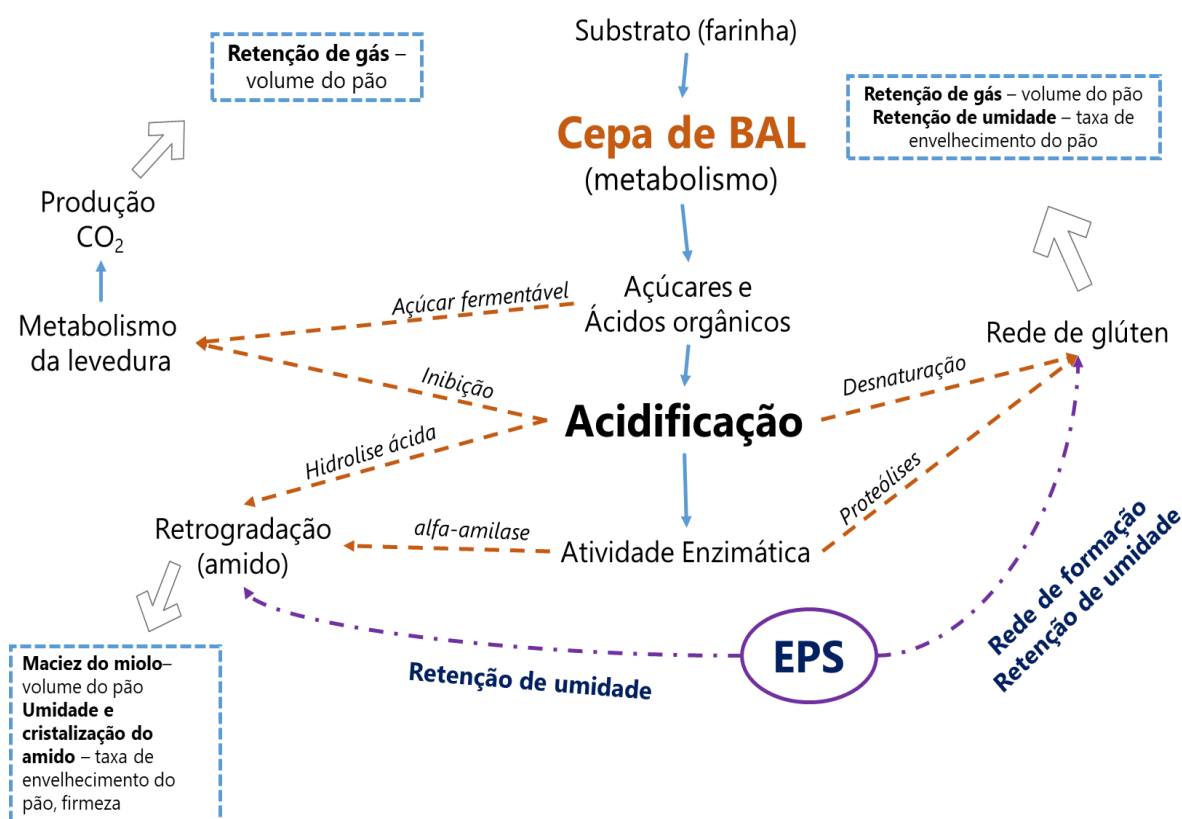
Os microrganismos presentes na farinha de trigo são diversos e sua microbiota selvagem é inicialmente composta por bactérias autóctones presentes na farinha, como: Gram-negativas (ex., proteobacterias, estafilococos e enterococos) e Gram-positivas (ex., lactococos e estreptococos). A medida que ocorre a retroalimentação do fermento natural, leveduras e BAL heterofermentativas e/ou homofermentativas pertencentes a várias espécies de Lactobacillaceae (ex., *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*) (Zheng *et al.*, 2020) dominam esse ecossistema estressante, caracterizado por baixo pH, altas concentrações de carboidratos, baixa oxigenação e maior população de BAL ($>10^8$ UFC/g) em comparação com leveduras ($<10^7$ UFC/g) (De Vuyst *et al.*, 2014; Ripari *et al.*, 2016; Stefanelo *et al.*, 2019; De Vuyst *et al.*, 2021).

Uma grande variedade de BAL são empregadas na fermentação natural, sendo as espécies *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. casei* alguns dos exemplos que se adaptam mais facilmente a microbiota peculiar, heterogênea, competitiva e diversa, característica de um fermento natural. Até o momento, cerca de 60 espécies de BAL foram isoladas e estão presentes em massas fermentadas, sendo a maioria heterofermentativa obrigatória, como *Levilactobacillus brevis* (antes *Lactobacillus brevis*), *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (antes *L. sanfranciscensis*), *L. citreum*, *Limosilactobacillus reuteri* (antes *L. reuteri*) e *Weissella confusa*; heterofermentativas facultativas, como *Companilactobacillus alimentarius* (antes *L. alimentarius*), *Lacticaseibacillus casei* (antes *L. casei*) e *Lactiplantibacillus plantarum* (antes *L. plantarum*); e homofermentativas obrigatórias, como *L.*

acidophilus, *L. delbrueckii* e *Lactococcus lactis* (Huys *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2020; Albagli *et al.*, 2021).

A atividade metabólica de BAL no fermento produz compostos secundários (ácidos orgânicos, principalmente lático e acético) que promovem a acidificação rápida do fermento, e que resulta em valores de pH abaixo de quatro. A rápida acidificação do fermento natural dá início a uma série de modificações (hidrolises ácidas, proteólises, síntese de compostos voláteis e antimicrobianos) tanto na massa quanto em seu produto final, conferindo ao pão características desejáveis quanto aos seus atributos tecnológicos como maior expansão da massa, digestibilidade e vida de prateleira (Siepmann *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2019; Raimondi *et al.*, 2017; Ripari *et al.*, 2016; Fujimoto *et al.*, 2019; Albagli *et al.*, 2021; Martín-Garcia *et al.*, 2021).

Figura 4. Atividade metabólica de BAL e leveduras em sourdough



Fonte: LYNCH *et al.* (2018) adaptado.

As leveduras também participam da fermentação com a produção de metabólitos, principalmente ao promover a produção de gás carbônico (CO₂) e etanol, bem como compostos de aroma e sabor (glicerol, cetonas e aldeídos, entre outras substâncias) (Clément *et al.*; Zhang *et al.*, 2018; Martín-Garcia *et al.*, 2021). A figura 4

descreve as atividades metabólicas que ocorrem no fermento natural e seus efeitos em pães de longa fermentação.

Algumas cepas de BAL são produtoras de EPS, um biopolímero natural que atua de forma benéfica na viscosidade, gelatinização, retrogradação do amido e na rede de glúten tanto do fermento quanto do pão (Torrieri *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2018). Todos os metabólitos secundários produzidos pelas BAL e leveduras que estão em simbiose no fermento natural atuam nas características sensoriais e nutricionais do pão ao aumentar a estabilidade microbiológica, reduzindo a ação de microrganismos patogênicos e deterioradores (Martín-García *et al.*, 2021).

3.3 IMPACTO DOS INGREDIENTES NA QUALIDADE DOS PÃES

O amido é o principal constituinte da farinha de trigo (70 – 75%) e responsável por grande parte da absorção de água e retenção do gás. Já os açúcares da farinha atuam também como fonte de energia primária, sendo imediatamente consumida, principalmente, por leveduras que os metabolizam, resultando na produção de compostos alcoólicos e gás carbônico (CO₂) durante a fermentação e atuando de forma significativa no volume do pão. Os açúcares (glicose, frutose maltose) presentes na farinha são convertidos em ácidos orgânicos (principalmente láctico e acético) que reduzem o pH da massa e atuam diretamente na consistência e em ações bioquímicas que melhoram a estabilidade do fermento natural e contribuem no pão para uma melhor formação da estrutura de glúten resistente. As bactérias lácticas também são responsáveis por contribuírem com o sabor característico do pão de fermentação natural. A sinergia de atuação das BAL e leveduras conferem características únicas de aroma, sabor, estrutura da casca e do miolo que os diferenciam do pão comum de uma padaria tradicional (De Vuyst *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2018; De Vuyst *et al.*, 2021).

Gliadinas e gluteninas são as principais proteínas que compõem a estrutura proteica da farinha de trigo, com cerca de 8 – 15%, sendo responsáveis pela formação da rede de glúten durante o amassamento e incorporação dos ingredientes, conferindo a capacidade de retenção de gás a massa através de ligações de pontes de hidrogênio, dissulfeto e de Van der Waals (De Vuyst *et al.*, 2021; Koehler e Wieser, 2013). As bactérias lácticas atuam na estrutura proteica das farinhas a partir da sua

ação proteolítica e durante a degradação enzimática com a quebra parcial das proteínas em moléculas menores como peptídeos e aminoácidos e contribuir na formação da rede de glúten interferindo também numa melhor elasticidade e extensibilidade da massa (Lynch *et al.*, 2018).

As fibras compõem até 3% da composição das farinhas de trigo, principalmente na farinha integral, e sua hidrólise contribui na síntese de arabinosilanos que exercem atividade enzimática, proteolítica e de oxirredução na massa frente à ação das BAL e que tendem a fragilizar a estrutura de glúten ao produzir seus metabólitos e baixo pH na massa fermentada. A acidificação promovida pela fermentação desses compostos também é positiva, pois permite a maior solubilidade do glúten em meio ácido, logo, proporciona aumento no volume e maciez do pão, bem como maior inchamento dos grânulos de amido, retardando o seu envelhecimento devido à maior gelatinização e menor retrogradação do amido. A fermentação pelas BAL poderá atuar na solubilização de determinadas fibras presentes na farinha, impactando o trato digestivo de quem consumir esse produto. Ademais, lipídios (1 – 2%), vitaminas, minerais e enzimas (alfa e beta amilase, proteases e oxidases) fazem parte da composição química da farinha de trigo e influenciam, em menor escala, na qualidade nutricional e sensorial do pão (De Vuyst *et al.*, 2021).

As diversas atividades metabólicas executadas pelas bactérias lácticas na fermentação exercem efeitos positivos tanto no fermento quanto em seu produto final – o pão. As propriedades sensoriais, tecnológicas, menor envelhecimento e deterioração do pão durante o armazenamento são resultantes de ações como a acidificação e hidrólise no amido, bem como atividade proteolítica por enzimas endógenas dos cereais que atuam na conversão dos aminoácidos durante a fermentação (Gänzle, 2015; Lynch *et al.*, 2018; De Vuyst *et al.*, 2021).

As BAL são ainda responsáveis pela formação de certos compostos aromatizantes (Gänzle, 2014, 2015; De Vuyst *et al.*, 2017), tal qual ácidos fenólicos e flavonoides presentes na farinha podem ser convertidos em diversos precursores de aroma por enzimas provenientes, por exemplo, da cepa *L. plantarum* ou outras espécies de BAL e/ou leveduras (Gänzle, 2014; De Vuyst *et al.*, 2017; Ripari, Yunpeng, & Gänzle, 2019; Boudaoud *et al.*, 2021).

Os efeitos e impactos gerados pelas bactérias lácticas são percebidos pelas modificações bioquímicas que ocorrem nos macronutrientes da farinha de trigo. Estas

ações ajudam a prolongar a vida útil do pão de longa fermentação sem que se utilize aditivos coadjuvantes, ao mesmo tempo que inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e deterioradores como bolores e fungos filamentosos.

3.4 TECNOLOGIAS EMPREGADAS NA SECAGEM DO FERMENTO NATURAL E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DE PÃES

Os processos de secagem vêm sendo utilizados como alternativas que garantam a preservação e viabilidade de BAL e leveduras em fermentos naturais (Ertop *et al.*, 2018; Reale *et al.*, 2019; Stefanello *et al.*, 2019; Gul *et al.*, 2020; Caglar *et al.*, 2021). Um entrave para a produção industrial de pães adicionados de fermento natural tem sido a estabilidade microbiana dos fermentos e sua manutenção em larga escala (Lattanzi *et al.*, 2014). Atualmente, o emprego de tecnologias de imobilização e manutenção das culturas vivas no fermento associadas a processos de secagem tem recebido maior espaço na oferta de fermento natural industrial com estabilidade superior ao fermento na forma líquida ou pastosa, de menor equilíbrio e tempo de vida de prateleira.

O impacto positivo da seleção e utilização de culturas iniciadoras na fermentação natural já é reconhecido pela literatura científica, tanto pela qualidade nutricional quanto pela maior vida de prateleira que esse tipo de fermentação confere aos pães. No entanto, ainda são escassas as alternativas que garantam a manutenção dessa microbiota com alta viabilidade, após a aplicação dos processos de secagem (Siepmann *et al.*, 2018; Blaiotta *et al.*, 2022). A microbiota que compõe o fermento natural deve possuir alta viabilidade celular após a secagem e garantir ao pão que foi produzido a partir do fermento natural desidratado atributos sensoriais e tecnológicos desejados e que se assemelham à produção do pão comum, porém sem a utilização de levedura comercial (*Saccharomyces Cerevisiae*) e aditivos alimentares para produtos de panificação que promovem uma maior vida de prateleira.

A secagem em estufa é uma das alternativas mais comumente empregadas na produção de fermento em pó. Este tipo de secagem tem menor custo quando comparado aos demais métodos. A temperatura e o tempo utilizado na desidratação são fatores que podem comprometer a viabilidade celular e conseqüentemente reduzir a atividade das bactérias lácticas e leveduras na propagação, fermentação e levedação do fermento natural. Assim como ocorre na liofilização e na pulverização, é necessário

que a qualidade inicial do fermento possua elevadas populações de células ativas de BAL e leveduras (De Vuyst *et al.*, 2017; Gänzle e Zheng, 2019; De Vuyst *et al.*, 2021).

A pulverização é mais uma alternativa de secagem que ocorre a partir do processo de atomização da amostra em conjunto com o calor. Nesse método de secagem, a amostra inicialmente líquida é pulverizada no equipamento, onde formam-se gotículas que, em contato com correntes de circulação de ar quente evaporam a água, ocorrendo a remoção da umidade da gotícula, transformando-a em partícula sólida. Todo esse processo se dá em poucos segundos, caracterizando-se como método rápido e eficiente (Caglar *et al.*, 2021; Reale *et al.*, 2019).

Uma das alternativas para produção de fermento seco que preserve os microrganismos presentes no produto é o processo de liofilização (Stefanello *et al.*, 2019), método que tem sido tradicionalmente utilizado como forma de preservar células e permitir alta taxa de recuperação ao longo do armazenamento. Entretanto, o congelamento que antecede a liofilização é reconhecido como um processo que degrada boa parte das células viáveis ao formar cristais extracelulares que geram vazamentos de água e podem prejudicar a viabilidade celular da microbiota do fermento durante o congelamento. Em contrapartida, o uso de crioprotetores exerce importância ao prevenir ou diminuir a incidência de danos causados pela secagem, a exemplo de glicerol, soro de leite, sacarose, trealose e frutooligossacarídeos (FOS) (Jiang *et al.*, 2023; Reale *et al.*, 2019; Stefanello *et al.*, 2019).

Todas as técnicas de secagem possuem vantagens e desvantagens. A liofilização e pulverização permitem ao produto seco uma maior estabilidade quando comparado a outros métodos convencionais de secagem. Esses dois exemplos são reconhecidos como excelentes alternativas de secagem que reduzem a umidade e diminuem atividade enzimática do fermento, e, conseqüentemente, aumentam a sua vida de prateleira. As condições extremas as quais são submetidos os microrganismos tendem a reduzir a sua capacidade e aplicabilidade na levedação durante a fermentação (Siepmann *et al.*, 2019; Calasso *et al.*, 2023).

As técnicas de secagem e a utilização de crioprotetores visam preservar ao máximo os microrganismos presentes na microbiota do fermento. A utilização correta do método escolhido para a secagem possibilita a preservação da sua viabilidade celular quando reinserido na fermentação e produção de fermento natural. Em geral, todos os processos de secagem visam uma melhor e eficiente alternativa de

armazenamento em larga escala do que foi produzido, sem a necessidade da utilização de refrigeração e/ou congelamento (Mantzourani *et al.*, 2019; Romano *et al.*, 2019).

4. REFERÊNCIAS

Albagli, G., do Monte Schwartz, I., Amaral, P. F., Ferreira, T. F., & Finotelli, P. V. (2021). How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. *LWT*, *149*, 111888.

Blaiotta, G., Romano, R., Trifuoggi, M., Aponte, M., & Miro, A. (2022). Development of a Wet-Granulated Sourdough Multiple Starter for Direct Use. *Foods*, *11*(9), 1278.

Boudaoud, S., Aouf, C., Devillers, H., Sicard, D., & Segond, D. (2021). Sourdough yeast-bacteria interactions can change ferulic acid metabolism during fermentation. *Food Microbiology*, *98*, 103790.

Caglar, N., Ermis, E., & Durak, M. Z. (2021). Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking. *Journal of Food Engineering*, *292*, 110355.

Calasso, M., Marzano, M., Caponio, G. R., Celano, G., Fosso, B., Calabrese, F. M., ... & De Leo, F. (2023). Shelf-life extension of leavened bakery products by using bio-protective cultures and type-III sourdough. *LWT*, *177*, 114587.

Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenec, S., Perez, M., Segond, D., & Sicard, D. (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough. *Microorganisms*, *8*(2), 240.

Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(3), 169-182.

Clément, H., Prost, C., Chiron, H., Ducasse, M. B., Della Valle, G., Courcoux, P., & Onno, B. (2018). The effect of organic wheat flour by-products on sourdough performances assessed by a multi-criteria approach. *Food Research International*, *106*, 974-981.

De Vuyst, L., Comasio, A., & Kerrebroeck, S. V. (2021). Sourdough production: Fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-33.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2017). Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Advances in applied microbiology*, *100*, 49-160.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food microbiology*, *37*, 11-29.

Ertop, M. H., ŞM, İ., Yilmaz, F., Baltacı, C., & Gündoğdu, A. (2018). Quality properties of wheat breads incorporated with dried sourdoughs produced with different fermentation and drying methods. *Food Science and Technology Research*, *24*(6), 971-980.

Fujimoto, A., Ito, K., Narushima, N., & Miyamoto, T. (2019). Identification of lactic acid bacteria and yeasts, and characterization of food components of sourdoughs used in Japanese bakeries. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(5), 575-581.

Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 37, 2-10.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.

Gänzle, M. G., & Zheng, J. (2019). Lifestyles of sourdough lactobacilli—Do they matter for microbial ecology and bread quality? *International Journal of Food Microbiology*, 302, 15-23.

Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Luciano, W. A., de Albuquerque, T. M. R., de Oliveira Arcanjo, N. M., Madruga, M. S., ... & de Souza, E. L. (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5000-5010.

Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., ... & de Souza, E. L. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Frontiers in microbiology*, 7, 1371.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., & Rizzello, C. G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International journal of food microbiology*, 302, 103-113.

Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International journal of food microbiology*, 239, 3-18.

Gul, L. B., Con, A. H., & Gul, O. (2020). Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. *Cryobiology*, 96, 122-129.

Huys, G., Daniel, H. M., & Vuyst, L. D. (2013). Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 105-154). Springer, Boston, MA.

Jiang, H., Wang, Y., Xu, X., Deng, L., Feng, L., Han, J., & Liu, W. (2023). Effect of oligosaccharides as lyoprotectants on the stability of curcumin-loaded nanoliposomes during lyophilization. *Food Chemistry*, 410, 135436.

Koehler, P., & Wieser, H. (2013). Chemistry of cereal grains. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 11-45). Springer, Boston, MA.

Lattanzi, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2014). Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 948-955.

- Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., ... & Gobbetti, M. (2013). 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*, 163(2-3), 71-79.
- Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., ... & Gobbetti, M. (2015). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 161-170.
- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., & Sicard, D. (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*, 53, 41-50.
- Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food research international*, 110, 52-61.
- Mantzourani, I., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., & Plessas, S. (2019). Assessment of ready-to-use freeze-dried immobilized biocatalysts as innovative starter cultures in sourdough bread making. *Foods*, 8(1), 40.
- Martín-García, A., Riu-Aumatell, M., & López-Tamames, E. (2021). Influence of process parameters on sourdough microbiota, physical properties and sensory profile. *Food Reviews International*, 1-15.
- Michel, E., Monfort, C., Deffrasnes, M., Guezenec, S., Lhomme, E., Barret, M., ... & Onno, B. (2016). Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods. *International journal of food microbiology*, 239, 35-43.
- Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Added ingredients affect the microbiota and biochemical characteristics of durum wheat type-I sourdough. *Food Microbiology*, 60, 112-123.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27(7), 897-908.
- Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M. G., Xiang, S., Curtis, J. M., & Gänzle, M. (2019). Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International journal of food microbiology*, 302, 8-14.
- Raimondi, S., Amaretti, A., Rossi, M., Fall, P. A., Tabanelli, G., Gardini, F., & Montanari, C. (2017). Evolution of microbial community and chemical properties of a sourdough during the production of Colomba, an Italian sweet leavened baked product. *LWT*, 86, 31-39.
- Reale, A., Di Renzo, T., Preziuso, M., Panfili, G., Cipriano, L., & Messia, M. C. (2019). Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *LWT*, 99, 468-475.

Ripari, V., Bai, Y., & Gänzle, M. G. (2019). Metabolism of phenolic acids in whole wheat and rye malt sourdoughs. *Food microbiology*, 77, 43-51.

Ripari, V., Gänzle, M. G., & Berardi, E. (2016). Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 35-42.

Romano, N., Sciammaro, L., Mobili, P., Puppo, M. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Flour from mature *Prosopis nigra* pods as suitable substrate for the synthesis of prebiotic fructo-oligosaccharides and stabilization of dehydrated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 121, 561-567.

Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., & Spier, M. R. (2018). Overview of sourdough technology: From production to marketing. *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), 242-270.

Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94.

Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 508-516.

Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2007). Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4741-4750.

Van Kerrebroeck, S., Maes, D., & De Vuyst, L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 152-159.

Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., ... & Settanni, L. (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 51, 57-68.

Venturi, M., Guerrini, S., & Vincenzini, M. (2012). Stable and non-competitive association of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida milleri* and *Lactobacillus sanfranciscensis* during manufacture of two traditional sourdough baked goods. *Food microbiology*, 31(1), 107-115.

Yan, B., Sadiq, F. A., Cai, Y., Fan, D., Chen, W., Zhang, H., & Zhao, J. (2019). Microbial diversity in traditional type I sourdough and jiaozi and its influence on volatiles in Chinese steamed bread. *LWT*, 101, 764-773.

Zhang, G., Sun, Y., Sadiq, F. A., Sakandar, H. A., & He, G. (2018). Evaluation of the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation characteristics and volatile compounds of sourdough. *Journal of food science and technology*, 55(6), 2079-2086.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.

CAPITULO II – ARTIGO 1

RESUMO

Os resultados presentes no capítulo II, intitulado “Explorando os impactos de cepas de *Lactobacillus* spp. como cultura iniciadora na qualidade de pães de longa fermentação”, será submetido em periódico internacional relacionado com a temática da pesquisa. O estudo investigou o impacto de cepas isoladas de frutas e resíduos de frutas como cultura iniciadora na fermentação, propagação e produção de fermento natural e sua qualidade na produção de pães de longa fermentação. Três cepas (*Limosilactobacillus fermentum* 56, *Lactiplantibacillus pentosus* 129, and *Limosilactobacillus fermentum* 139) foram selecionadas de acordo com os protocolos de seleção aplicados em fermentação baseados em cereais. Os fermentos apresentaram maturação após 10 dias de propagação, atrelado a características de pH ácido e microbiota estável (bactérias lácticas e leveduras), o que possibilitou a produção de pães com excelentes características de qualidade, vida de prateleira e sensorial, em especial para os pães produzidos com as cepas *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139. O estudo permitiu o aperfeiçoamento de protocolos de elaboração de fermento natural já existentes, e os resultados obtidos neste estudo deram continuidade a produção de fermentos naturais liofilizados adicionados de cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 e em co-cultura na produção de pães de longa fermentação.

Explorando os impactos de cepas de *Lactobacillus* spp. como cultura iniciadora na qualidade de pães de longa fermentação

Resumo

Este estudo investigou cinco cepas de *Lactobacillus* spp. (*Limosilactobacillus fermentum* 56, *Lacticaseibacillus paracasei* 106, *Lactiplantibacillus pentosus* 129, *Limosilactobacillus fermentum* 139 e *Limosilactobacillus fermentum* 141) como culturas iniciadoras na produção de fermento natural. As cepas foram avaliadas quanto à acidificação, proteólise e produção de exopolissacarídeos, sendo selecionadas as com melhor desempenho nos testes: *L. fermentum* 56 (Lf56), *L. pentosus* 129 (Lpe129) e *L. fermentum* 139 (Lf139). Três tipos de fermento natural fresco (FN) Lf56, Lpe129, Lf139 e um Controle foram produzidos e caracterizados quanto aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante dez dias. A adição das cepas selecionadas aos fermentos naturais levou a uma rápida queda no pH durante a propagação e a maiores contagens de bactérias lácticas (BAL) nos dois primeiros dias, estabilizando após o período de maturação de dez dias. Quando incorporado ao pão, os fermentos inoculados com *Lactobacillus* spp. melhoraram significativamente a qualidade microbiológica do pão, especialmente Lpe129 e Lf139, resultando em pH, umidade e dureza mais baixos em comparação ao Controle. Na avaliação sensorial, o Lf56 obteve maior pontuação em estrutura alveolar, enquanto o Lpe129 se destacou em resiliência, aroma amanteigado e maciez. Os resultados deste estudo demonstraram que o uso de cultura iniciadora de bactérias lácticas permitiu amadurecimento e condições de estabilização após dez dias de propagação contínuas, e possibilitou aplicação dos fermentos naturais na produção de pães de longa fermentação, com melhorias significativas nas amostras com os fermentos inoculados.

Palavras-chave: Culturas iniciadoras. Bactérias ácido-lácticas. Fermento natural. Panificação.

Abstract

This study investigated five strains of *Lactobacillus* spp. (*Limosilactobacillus fermentum* 56, *Lacticaseibacillus paracasei* 106, *Lactiplantibacillus pentosus* 129, *Limosilactobacillus fermentum* 139, and *Limosilactobacillus fermentum* 141) as starter cultures for sourdough production. The strains were evaluated for acidification, proteolysis, and exopolysaccharide production. The strains *L. fermentum* 56 (Lf56), *L. pentosus* 129 (Lpe129), and *L. fermentum* 139 (Lf139) were selected for significant fermentation potential were characterized in terms of microbiological and physicochemical parameters. Three types of sourdough (SD) Lf56, Lpe129, Lf139, and a Control were produced and characterized in terms of microbiological and physical-chemical parameters during ten days. The addition of the selected strains to the sourdough led to a rapid drop in pH during back-slopping and higher lactic acid bacteria (LAB) counts in the initial two days, stabilizing after the ten-day maturation period. When incorporated into bread, the sourdough with *Lactobacillus* spp. significantly improved the microbiological quality of the bread, especially Lpe129 and Lf139, resulting in lower pH, moisture, and hardness compared to the Control. In sensory evaluation, Lf56 scored higher in alveolar structure, while Lpe129 stood out in resilience, buttery aroma, and softness. The results of this study demonstrated that the use of starter culture of lactic acid bacteria was positive and that the sourdoughs obtained maturity after ten days of continuous propagation, and allowed the satisfactory application of sourdoughs to produce long-fermented breads.

Keywords: Starter cultures. Lactic acid bacteria. Sourdough. Bread-making.

1. Introdução

O pão de fermentação natural remonta a 3.000 a.C. (Cauvain, 2016; Minervini, Celano, Lattanzi, De Angelis, & Gobbetti, 2016), com sua produção historicamente dependente da fermentação espontânea da massa que naturalmente contém bactérias e leveduras selvagens endógenas (Arora *et al.*, 2021). O processo de fermentação espontânea envolve uma gama diversificada de microrganismos, que dependem dos ingredientes e das condições de fermentação adequadas para a sua manutenção (Gobbetti, Minervini, Pontonio, Di Cagno, & De Angelis, 2016; Minervini *et al.*, 2011).

O aumento do uso da fermentação natural, também conhecida como “Levain” ou “Sourdough” na produção de pão é motivado pelas características únicas introduzidas pelos microrganismos naturais, diferenciando-o do pão tradicional comumente produzido a partir de cepas industrializadas de *Saccharomyces cerevisiae* (Minervini *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2019).

Sourdough consiste em uma mistura de farinha de cereal e água que fornece um ambiente rico para uma população diversificada de bactérias, principalmente as bactérias lácticas (BAL) e leveduras. Esses microrganismos contribuem para a fermentação e produção de aroma, sabor, textura e volume do pão, bem como para a formação de uma rede tridimensional de glúten. A acidificação resultante deste processo de fermentação também serve como controle microbiano, aumentando assim a vida útil do pão (Coda, Cagno, Gobbetti, & Rizzello 2014; Minervini *et al.*, 2010; Ventimiglia *et al.*, 2015).

Em produtos de panificação, a introdução de microrganismos isolados tem sido amplamente explorada. Vários estudos (Lynch, Coffey, & Arendt, 2018; Moroni, Dal Belo, & Arendt, 2009; Ventimiglia *et al.*, 2015) relatam que o uso de culturas iniciadoras, principalmente por BAL, na produção de massa fermentada é tecnologicamente viável, seja pelo emprego de uma única cepa ou uma combinação de cepas e/ou leveduras. Esses microrganismos, principalmente da família Lactobacillaceae são importantes para a fermentação devido à produção de compostos antimicrobianos que inibem a deterioração e/ou microrganismos patogênicos (Coda *et al.*, 2014; Hadaegh, Seyyedain Ardabili, Tajabadi Ebrahimi, Chamani, & Azizi Nezhad, 2017; Martinbianco, Martins, Rech, Flôres, & Ayub 2013; Reale *et al.*, 2016; Todorov & Franco, 2010; Zheng *et al.*, 2020).

No contexto do uso de *bactérias lácticas* como culturas iniciadoras, algumas espécies, como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus pentosus* e *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, foram identificadas como particularmente adequadas devido à sua capacidade de adaptação à microbiota de massa fermentada (Randazzo, Heilig, Restuccia, Giudici, & Caggia, 2005; Ventimiglia *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2020). Estas espécies são alguns exemplos de BAL que podem ser incorporadas como culturas iniciadoras na produção de fermento natural.

Culturas iniciadoras de bactérias lácticas e leveduras têm sido empregadas para melhorar as características do fermento natural na produção de produtos de panificação. Esses microrganismos exercem impacto benéfico nas características tecnológicas de toda uma cadeia de produção que perpassa a fermentação da massa e influencia a qualidade sensorial e nutricional do pão. Esses microrganismos atuam na massa produzindo enzimas, ácidos orgânicos, exopolissacarídeos (EPS) e compostos antimicrobianos, melhorando assim a textura, o aroma, o sabor, a composição nutricional e maior vida de prateleira do produto (Blaiotta, Romano, Trifuoggi, Aponte, & Miro; Fraberger, Unger, Kummer, & Doming, 2020; Gänzle & Zheng, 2019). Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar e selecionar espécies de bactérias lácticas como cultura iniciadora na produção de fermento natural fresco e avaliar os seus efeitos na qualidade de pães de longa fermentação.

2. Materiais e métodos

2.1. Microrganismos, condições de crescimento e produção de fermento natural

Cinco cepas de *Lactobacillus* spp., isoladas e previamente identificadas por Garcia *et al.*, (2016) foram utilizadas neste estudo (Tabela 1). Os ingredientes utilizados para o preparo da massa fermentada e dos pães foram: Farinha de trigo (tipo 1, 10 g de proteína, 74 g de carboidratos, 1,4 g de gordura total e 2,8 g de fibra; Dona Benta, Moinho J. Macêdo, Salvador, BA, Brasil); sal refinado (Veneza, Reprasal, Mossoró, RN, Brasil), açúcar branco granulado (Petribu, Usina Petribu, Lagoa de Itaenga, PE, Brasil), manteiga (Camponesa, Lagoa da Prata, MG, Brasil) e água. Para o pão “tradicional” foi utilizado fermento seco de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fleischmann, Pederneiras, SP, Brasil).

Tabela 1. Descrição das espécies de bactérias lácticas com potencial uso como cultura iniciadora na produção de fermento natural

Espécie	Código	Origem	Referência
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> 56	Lf56	Subproduto da acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.)	
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> 106	Lpc106	Subproduto da Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> 129	Lpe129	Subproduto da manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	(Garcia <i>et al.</i> , 2016; 2018)
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> 139	Lf139	Subproduto da manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> 141	Lf141	Subproduto da manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	

2.2 Caracterização e seleção das BAL

2.2.1 Atividade de acidificação

A acidificação das cepas foi avaliada *in vitro*, usando um caldo de farinha estéril (CFE) preparado conforme descrito por Alfonzo *et al.* (2013). As cepas foram inoculadas em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (SIGMA Aldrich, Alemanha) até fase estacionária (22 a 24 horas) e em seguida coletadas por centrifugação a 5000 rpm/ 5 min, com posterior lavagem do pellet em tampão salina-fosfato 1X (PBS) pH 7,2 (Composição para 1L: 8,06g NaCl; 0,22g de KCl; 1,15g Na₂HPO₄; 0,20g KH₂HPO₄) duas vezes, após padronização do inóculo bacteriano a OD_{625nm} = 1,0. As amostras selecionadas foram inoculadas uma a uma, separadamente (1%, v/v) em 20 mL de CFE e incubados durante 24 h/30°C. O pH foi medido em intervalos de 2 h, 4h, 6h e

8 h, 24h, 48h e 72h de incubação após a inoculação inicial. As amostras foram mantidas a temperatura constante de 30°C em estufa, até última leitura (72h). Os resultados foram expressos avaliando a variação dos valores de pH de cada cepa ao longo do período de incubação (Ventimiglia *et al.*, 2015).

2.2.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das cepas de BAL foi determinada em placas de ágar utilizando método previamente descrito (Ventimiglia *et al.*, 2015). Gelatina (Sigma-Aldrich) foi empregada como substrato de protease e incorporada em cada meio a uma concentração de 1% (p/v). A atividade proteolítica foi considerada positiva quando foi identificado halo ≥ 1 mm.

2.2.3 Produção e extração de exopolissacarídeo (EPS)

As cepas de BAL foram cultivadas em caldo MRS suplementado com 2% (p/v) de glicose durante 3 dias a 37 °C sob condições anaeróbicas (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). As células foram centrifugadas (6000 rpm, 20 min, 20 °C), misturadas na proporção de 1:2 com etanol 95% (v/v) frio (Fmaia, Minas Gerais, Brasil) e armazenadas a 4 °C por 24 h para induzir a precipitação de EPS. O EPS precipitado foi recuperado por centrifugação (4000 rpm, 15 min, 4 °C), lavado com água destilada estéril e seco a 55 °C até atingir peso constante. A concentração de peso seco (mg/L) foi medida para determinar a quantidade de EPS produzida (de Albuquerque *et al.*, 2017).

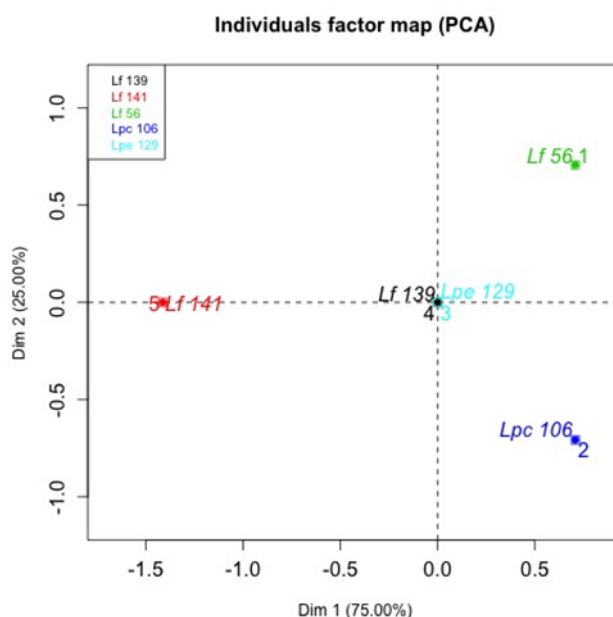
2.2.4 Preparação de inóculo e produção de massa fermentada

Com base na avaliação da acidificação, proteólise e produção de EPS, uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para determinar as cepas de *Lactobacillus* spp. para produção de massa fermentada, sendo selecionadas as cepas *L. fermentum* 56, *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (Figura 1). O desenvolvimento e propagação da massa fermentada seguiram o protocolo descrito por Minervini *et al.*, 2010, com algumas modificações. As cepas selecionadas foram inoculadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e incubadas a 37 °C até atingir a fase exponencial

(24 ± 1 h). Posteriormente, as células foram centrifugadas (6000 rpm, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes com tampão salina-fosfato PBS (pH 7,2) e ressuspensas em água destilada estéril (10 - 11 log UFC/ml) para posterior inoculação em seus respectivos fermentos naturais [FN + cepa (Lf56 - *L. fermentum* 56; Lpe129 - *L. pentosus* 129; Lf139 - *L. fermentum* 139)]. O fermento natural controle (microbiota selvagem) foi preparado com as mesmas quantidades de água e farinha, mas sem adição da cepa de BAL.

Após a preparação dos fermentos naturais (Controle, Lf56, Lp129 e Lf139), as amostras foram incubadas a 30 °C por 24 h em uma estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). Após esse período, se iniciou a primeira etapa de *propagação* pegando uma porção do fermento natural incubado 24 horas e misturando-a com água e farinha (tipo 1, Dona Benta, Moinho J. Macêdo, Salvador, BA, Brasil). Este processo de *propagação* foi conduzido uniformemente para todas as amostras de fermento natural, seguido por uma incubação adicional a 30 °C durante 24 h. A sequência de *propagação* e incubação foi repetida a cada 24 horas até um período máximo de 10 dias. Durante esse período, foram coletadas alíquotas diárias do fermento natural (do dia 2 ao dia 10) para análises físico-químicas e microbiológicas.

Figura 1. Análise de Componentes Principais (PCA) para seleção de bactérias lácticas na produção de fermento natural e pães de longa fermentação.



2.3 Produção de pães de longa fermentação

Após o período de propagação de 10 dias, porções de cada amostra de fermento natural (Controle, Lf56, Lpe129 e Lf139) foram utilizadas para produzir pães seguindo a formulação descrita na Tabela 2. Todos os ingredientes foram pesados de acordo com as proporções delineadas neste estudo, conforme apresentado na Tabela 3. Os ingredientes secos, incluindo farinha de trigo e açúcar foram adicionados de água e fermento natural. No entanto, 1,5% de fermento biológico seco foi utilizado para a produção do pão tradicional em vez de fermento natural.

Tabela 2. Formulações de pães com massa fermentada inoculada com cepas de *Lactobacillus* spp. e controles.

Amostra (Pão)	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tradicional	Não	Sim
Controle	Não	Não
Lf56	<i>L. fermentum</i> 56	Não
Lp129	<i>L. pentosus</i> 129	Não
Lf139	<i>L. fermentum</i> 139	Não

A mistura dos ingredientes foi sovada em máquina de pão (Britânia Multi Pane, Joinville, SC, Brasil) por 5 minutos. A manteiga foi adicionada à massa após 3 min, uma vez que a rede de glúten estava parcialmente desenvolvida. Após a sova, a massa passou pela primeira fermentação por 20 minutos com dobras a cada 10 minutos para desenvolver uma massa macia, elástica e extensível. Após a fermentação inicial, a massa foi pesada, dividida em porções de 100 g, boleada e moldada em filão e imediatamente colocada em assadeiras polvilhadas com farinha de trigo para a segunda fermentação. O “pão tradicional” com fermento biológico seco teve tempo de fermentação reduzido (45 min – 1 h). Após a segunda fermentação, os pães foram transferidos para formas e assados em forno de lastro a 200°C por 30 min. Após o forneamento, os pães foram resfriados à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), acondicionados em sacos de polietileno, etiquetados e armazenados na mesma temperatura por 7 dias para análises microbiológicas e físico-químicas.

Tabela 3. Ingredientes utilizados na produção de pães com fermento natural inoculado com cepas de *Lactobacillus* spp., controle e tradicional

Ingredientes	Formulação %	
	Pães (Controle, Lf56, Lpe129 e Lf139)	Pão tradicional
Farinha de trigo branca (**)	100g	100g
Água	55 mL/100 g de **	55 mL/100 g de **
Açúcar	4g /100g de **	4g /100g de **
Sal	1,5 g/100 g de **	1,5 g/100 g de **
Manteiga	2g /100g de **	2g /100g de **
Fermento natural fresco	40 g/100 g de **	-
Fermento biológico seco (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-	1,5 g/100 g de **

Fonte: Stefanello *et al.* (2019) com modificações.

2.4 Caracterização microbiológica e físico-química do fermento natural e dos pães elaborados

Alíquotas dos fermentos naturais foram analisados em triplicata imediatamente após o preparo (tempo 0) e diariamente durante todo o período de propagação (do dia 1 ao dia 10). Os pães também foram analisados em triplicata nos tempos 0, 1, 3 e 7 dias para determinar contagens de BAL e leveduras, contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva*, *Escherichia coli* e presença/ausência de *Salmonella* spp.

2.4.1 Análise microbiológica

- *Enumeração de contagens de células viáveis de BAL e leveduras:*

Amostras de fermento natural e pão 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 μ L de cada diluição seriada foram inoculadas (usando o método de microgota) (Liu *et al.*, 2018) em placas contendo ágar MRS e incubadas a 37 °C 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 μ L de cada diluição em série foram inoculadas em placas contendo Ágar Dextrose de Batata (PDA) e incubadas a 28 °C 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).

- *Enumeração de Staphylococcus coagulase positiva e Escherichia coli com:*

25 g de cada amostra de pão foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e posteriormente diluídas até 10^{-6} . A confirmação para *Staphylococcus* coagulase positiva foi enumerada usando a técnica de tubos múltiplos realizada usando o meio ágar Baird-Parker [suplementado com emulsão de gema de ovo com telurito] (Food and Drug Administration, 2001), enquanto *E. coli* foi detectada através de crescimento em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) com incubação a 37 °C por 24-48 horas (APHA, 2001; Silva *et al.*, 2017).

- *Determinação da presença/ausência de Salmonella spp.:*

25g de cada amostra de pão foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e depois incubadas a 35 °C por 24 horas para pré-enriquecimento. Após o pré-enriquecimento, 1 mL da amostra foi inoculada em 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e em 10 mL de caldo Selenita Cistina e incubada a 35 °C por 24 h. Alíquotas desses caldos foram inoculadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), ágar Bismuto Sulfito (BS) e ágar Salmonella/Shigella (SS) (Silva *et al.*, 2017). Amostras com colônias características de *Salmonella* spp. foram submetidas a exames bioquímicos confirmatórios.

2.4.2 Análise físico-química de fermento natural e pão de fermento natural preparado

- *pH*: 10 g da amostra foram homogeneizadas em 90 mL de água destilada. O pH da suspensão resultante foi medido por meio de um potenciômetro (modelo PHS-3E, Even, São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado e operado conforme instruções do fabricante (AOAC, 2016).

- *Acidez total titulável (ATT)*: 10 g do fermento natural e do pão foram homogeneizada em 90 mL de água destilada. Duas gotas de solução de fenolftaleína foram adicionadas à suspensão e tituladas com solução de hidróxido de sódio (NaOH, 0,1N).

A ATT foi expressa em ml de NaOH 0,1N consumido por 10 g de amostra (Aoac, 2016).

- *Umidade*: O teor de umidade do pão foi determinado secando 2 g de cada amostra em estufa de circulação de ar (ACB Labor, São Paulo, SP, Brasil) a 105 °C até atingir peso constante (Aoac, 2016).

2.5 Caracterização tecnológica do pão fermentado

2.5.1 Volume específico

O volume específico dos pães foi determinado pelo método de deslocamento das sementes de milheto (*Panicum miliaceum* L.) e os resultados foram expressos em g/cm³ (Mantozourani *et al.*, 2019).

2.5.2 Análise de cor

A cor do miolo do pão fatiado foi avaliada em três pontos de fatias centrais medindo 3x3 cm. As medidas foram realizadas utilizando um colorímetro CR-300 (Minolta, Osaka, Japão) e parâmetros de cor, nomeadamente L*, variando de zero (preto) a 100 (branco); a*, indicando uma faixa de vermelho (positivo) a verde (negativo); e b*, indicando um espectro de amarelo (positivo) a azul (negativo). Esses parâmetros foram analisados conforme método CIELab (Stefanello *et al.*, 2019).

2.5.3 Análise de textura

Os parâmetros de textura foram determinados com cinco repetições utilizando o teste de compressão dupla com um texturômetro CT3 Texture Analyzer (Brookfield, Middleborough, EUA) equipado com uma sonda de compressão cilíndrica de 25 mm de diâmetro. O pão foi cortado em fatias de 1,5 cm de espessura, 3 cm de altura e 3 cm de largura e submetido à análise de textura no pão fatiado nas seguintes condições: velocidade pré-teste 5 mm/s, velocidade teste 1,0 mm/s e velocidade pós-teste 5 mm/s, compressão de 30% e tempo entre as duas compressões de 5 seg. Os parâmetros medidos foram dureza, mastigabilidade e elasticidade (Yildirim & Arici, 2019).

2.6 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) foi realizada seguindo metodologia descrita anteriormente (Sidel & Stone, 1993). Este estudo foi submetido à revisão ética pelo Comitê de Pesquisa com Seres Humanos (Hospital Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba – Brasil) e aprovado sob o número de protocolo 56337916.2.0000.5188. A análise sensorial compreendeu cinco etapas: recrutamento, seleção dos provadores, desenvolvimento da terminologia descritiva, treinamento e avaliação da amostra. As avaliações foram realizadas por nove provadores treinados (consumidores de pão de fermento natural), que avaliaram atributos como aparência (estrutura alveolar), cor (casca e miolo), aroma (amanteigado e frutado), sabor (ácido e fermentado) e textura (dureza, resiliência e maciez). Cada atributo foi medido em uma escala de intensidade não estruturada que varia de zero (baixo) a nove (forte). As amostras de pão de fermentação natural foram servidas em pratos descartáveis, com bolachas e água mineral para limpeza do paladar, e analisadas em cabines individuais sob condições controladas de iluminação, temperatura e ruído.

2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados. Diferenças significativas foram determinadas ($p < 0,05$) por meio da ANOVA seguida de teste de Tukey. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para identificar as cepas mais promissoras com base nas características medidas (acidificação, produção de EPS e atividade proteolítica). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa XLSTAT versão 2019.2.2.5964 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3. Resultados e discussão

3.1 Acidificação

A avaliação da acidificação em CFE para as cepas de *Lactobacillus* spp. resultaram em valores de pH que variaram de $5,58 \pm 0,12$ a $6,67 \pm 0,04$ no tempo zero, que diminuíram para uma faixa de $3,42 \pm 0,11$ a $3,60 \pm 0,01$ às 72 h (Tabela 4). Todas as amostras não tiveram redução significativa de pH, exceto aquelas inoculadas com Lpe129 e Lf139. Após 8 h, tanto as amostras Controle e Lpc106 quanto a amostra Lf56 não tiveram variação significativa de pH, mantendo os maiores valores de pH. Às 24 h, todas as amostras apresentaram queda significativa de pH, exceto o Controle. Lpe129, Lf139 e Lf141 apresentaram os menores valores de pH. Todas as amostras apresentaram valores de pH semelhantes após 72 h e todas as cepas apresentaram valores de pH abaixo de 3,60.

Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão para determinação de acidificação em caldo de farinha estéril (SFE) com *L. fermentum* (Lf56), *L. paracasei* 106 (Lpc106), *L. pentosus* (Lpe129), *L. fermentum* 139 (Lf139), *L. fermentum* 141 (Lf141) e controle (não inoculado) durante 72 h (30 ± 1 °C), exopolissacarídeo (EPS) e avaliação qualitativa da atividade proteolítica

Tempo (horas)	Bactérias lácticas					
	Controle	Lf56	Lpc106	Lpe129	Lf139	Lf141
0	5.65 ^{Ba} ± 0.07	6.41 ^{Aa} ± 0.01	6.67 ^{Aa} ± 0.04	5.58 ^{Ba} ± 0.12	5.78 ^{Ba} ± 0.03	5.80 ^{Ba} ± 0.13
2	5.75 ^{Ba} ± 0.07	6.46 ^{Aa} ± 0.08	6.66 ^{Aa} ± 0.09	5.65 ^{Ba} ± 0.07	5.75 ^{Ba} ± 0.07	5.88 ^{Ba} ± 0.11
4	5.79 ^{Ba} ± 0.13	6.59 ^{Aa} ± 0.13	6.59 ^{Aa} ± 0.13	5.06 ^{Cb} ± 0.06	5.26 ^{BCb} ± 0.06	5.55 ^{Ba} ± 0.07
6	5.78 ^{Ba} ± 0.11	6.48 ^{Aa} ± 0.12	6.55 ^{Aa} ± 0.07	4.58 ^{Cc} ± 0.03	4.67 ^{Cc} ± 0.10	4.78 ^{Cb} ± 0.11
8	5.75 ^{Ba} ± 0.07	6.56 ^{Aa} ± 0.08	5.98 ^{Bb} ± 0.03	4.47 ^{Cc} ± 0.04	4.45 ^{Cc} ± 0.08	4.54 ^{Cb} ± 0.08
24	5.44 ^{Aa} ± 0.08	4.08 ^{Bb} ± 0.02	3.76 ^{Cc} ± 0.09	3.59 ^{Cd} ± 0.01	3.55 ^{Cd} ± 0.07	3.76 ^{Cc} ± 0.06
48	4.35 ^{Ab} ± 0.07	4.03 ^{Bb} ± 0.10	3.47 ^{Cc} ± 0.03	3.57 ^{Cd} ± 0.04	3.59 ^{Cd} ± 0.01	3.69 ^{Cc} ± 0.01
72	3.60 ^{Ac} ± 0.01	3.48 ^{Ac} ± 0.02	3.42 ^{Ad} ± 0.11	3.48 ^{Ad} ± 0.03	3.48 ^{Ad} ± 0.03	3.58 ^{Ac} ± 0.03
EPS (mg/L)	***	0.33 \pm 0.03 ^A	0.16 \pm 0.03 ^B	0.20 \pm 0.01 ^B	0.20 \pm 0.06 ^B	0.13 \pm 0.01 ^B
Proteólise*	-	-	-	-	-	-

^{a-d} Na coluna, médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Na linha, as médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Controle: CFE não inoculado; Lf56: *Limosilactobacillus fermentum* 56; Lpc106: *Lacticaseibacillus paracasei* 106; Lpe129: *Lactiplantibacillus pentosus* 129; Lf139: *Lactobacillus fermentum* 139; Lf141: *Lactobacillus fermentum* 141. *Atividade proteolítica considerada (+) quando detectado halo \geq 1mm. *** não realizada

Os microrganismos utilizados na fermentação natural devem possuir certas características para se adaptarem tanto às condições de fermentação como à matriz onde são incorporados. A capacidade de produzir ácidos orgânicos e tolerar flutuações de pH ao longo do processo de fermentação são atributos fundamentais para a seleção de cepas (Alfonso *et al.*, 2013). Os resultados deste estudo corroboram com os encontrados por Alfonso *et al.* (2013) sobre a capacidade de acidificação por cepas de BAL em farinha de trigo.

3.2 Produção de EPS e atividade proteolítica

Os valores de produção de EPS variaram de $0,13 \pm 0,01$ a $0,33 \pm 0,03$ mg/L (Tabela 4), sendo que Lf56 apresentou o maior valor ($0,33 \pm 0,03$) e Lf 141 o menor valor ($0,13 \pm 0,01$). Todas as cepas de *Lactobacillus* spp. tiveram atividade proteolítica negativa e produção positiva de EPS (Tabela 4).

BAL produzem metabólitos secundários e EPS, além de exercer atividade proteolítica durante a fermentação e acidificação da massa fermentada. Esses processos contribuem para o aroma, sabor, textura e desenvolvimento da massa na produção de pão de fermento natural. No entanto, a atividade proteolítica excessiva de algumas BAL pode impactar negativamente a qualidade da massa fermentada e influenciar a vida útil do pão de longa fermentação (Lynch *et al.*, 2018).

Considerando os resultados de acidificação *in vitro*, produção de EPS e atividade proteolítica, foi realizada uma PCA para determinar as cepas de *Lactobacillus* spp. para produção de fermento natural. A análise PCA revelou que Lf56 teve a maior produção de EPS, enquanto Lf141 e Lpc106 tiveram a menor produção de EPS. Entretanto, Lf139 e Lpe129 apresentaram superior capacidade de acidificação e produção de EPS. Assim, as cepas Lf56 (*L. fermentum* 56), Lpe129 (*L. pentosus* 129) e Lf139 (*L. fermentum* 139) foram selecionadas para utilização na produção de fermento natural.

3.3 Parâmetros microbiológicos, pH e análise de acidez titulável em massa fermentada

3.3.1 Enumeração de contagens de células viáveis de BAL e leveduras em massa fermentada

As cepas de *Lactobacillus spp.* selecionadas conforme PCA foram usadas como culturas iniciadoras na produção de fermento natural para avaliar seus impactos na qualidade e maturação do fermento natural fresco. As contagens de células viáveis de BAL nas amostras de fermento natural variaram de <2 a $9,20 \pm 0,01$ log UFC/g durante o tempo de propagação de 10 dias avaliado (Tabela 2). Mudanças nas contagens de BAL foram observadas em geral entre os dias 3 e 8 de propagação. No entanto, todas as amostras aumentaram significativamente as contagens de BAL no nono e décimo dias.

Tabela 6. Valores médios (log UFC/g) \pm desvio padrão para contagens de células viáveis de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural fresco durante período de propagação de dez dias a 30 ± 1 °C.

	Tempo (dias)	Fermento Natural Fresco (FN)			
		Controle	Lf56	Lp129	Lf139
BAL	0	<2	5.70 \pm 0.01 ^{Ag}	5.70 \pm 0.02 ^{Af}	5.44 \pm 0.06 ^{Bg}
	1	4.15 \pm 0.21 ^{Bf}	7.18 \pm 0.09 ^{Af}	6.68 \pm 0.08 ^{Ae}	6.65 \pm 0.24 ^{Af}
	2	4.00 \pm 0.01 ^{Cf}	7.59 \pm 0.16 ^{Ae}	7.22 \pm 0.06 ^{Bd}	7.23 \pm 0.04 ^{Bde}
	3	8.17 \pm 0.01 ^{Ad}	8.73 \pm 0.09 ^{Abc}	5.56 \pm 0.36 ^{Bf}	5.36 \pm 0.26 ^{Bg}
	4	5.69 \pm 0.08 ^{Ce}	8.33 \pm 0.01 ^{Bcd}	6.22 \pm 0.11 ^{Ce}	9.16 \pm 0.11 ^{Aa}
	5	8.62 \pm 0.06 ^{ABc}	8.75 \pm 0.09 ^{Ab}	8.42 \pm 0.02 ^{Bbc}	7.00 \pm 0.02 ^{Cef}
	6	8.82 \pm 0.03 ^{Bbc}	9.10 \pm 0.01 ^{Aab}	9.05 \pm 0.03 ^{Aa}	9.12 \pm 0.03 ^{Aa}
	7	9.19 \pm 0.02 ^{Aa}	9.20 \pm 0.01 ^{Aa}	8.24 \pm 0.11 ^{Bc}	7.59 \pm 0.16 ^{Bcd}
	8	8.50 \pm 0.02 ^{Accd}	7.98 \pm 0.01 ^{Bde}	7.97 \pm 0.02 ^{Bc}	7.77 \pm 0.21 ^{Bc}
	9	9.16 \pm 0.15 ^{Aab}	8.88 \pm 0.26 ^{Bab}	8.78 \pm 0.05 ^{Bab}	8.44 \pm 0.06 ^{ABb}
	10	9.13 \pm 0.02 ^{Aab}	9.03 \pm 0.04 ^{Aab}	8.87 \pm 0.04 ^{Aab}	9.01 \pm 0.08 ^{Aa}
Leveduras	0	3.26 \pm 0.03 ^{Ac}	1.60 \pm 0.14 ^{Afg}	2.93 \pm 1.63 ^{Ac}	3.26 \pm 0.09 ^{Ac}
	1	2.42 \pm 0.08 ^{Cd}	4.10 \pm 0.14 ^{Bcd}	4.98 \pm 0.08 ^{Aa}	5.16 \pm 0.06 ^{Aa}
	2	1.31 \pm 0.10 ^{Bf}	6.39 \pm 0.55 ^{Aa}	5.52 \pm 0.06 ^{Aa}	5.53 \pm 0.04 ^{Aa}
	3	1.18 \pm 0.08 ^{Cef}	3.37 \pm 0.39 ^{Ade}	3.00 \pm 0.10 ^{ABbc}	2.20 \pm 0.08 ^{Bd}
	4	1.60 \pm 0.04 ^{Bef}	1.00 \pm 0.02 ^{Bg}	1.30 \pm 0.06 ^{Bc}	2.20 \pm 0.04 ^{Ad}
	5	1.05 \pm 0.10 ^{Bf}	1.78 \pm 0.10 ^{ABf}	1.60 \pm 0.43 ^{ABc}	2.20 \pm 0.10 ^{Ad}
	6	1.00 \pm 0.07 ^{Cf}	2.15 \pm 0.21 ^{Bfg}	3.67 \pm 0.27 ^{Aac}	2.29 \pm 0.02 ^{Bd}
	7	1.00 \pm 0.02 ^{Bf}	1.47 \pm 0.04 ^{Bg}	4.10 \pm 0.14 ^{Aa}	3.52 \pm 0.25 ^{Ac}
	8	2.30 \pm 0.06 ^{Bd}	2.55 \pm 0.21 ^{Bef}	5.27 \pm 0.23 ^{Aa}	4.50 \pm 0.18 ^{Ab}
	9	4.46 \pm 0.37 ^{Ab}	4.40 \pm 0.25 ^{Abc}	5.46 \pm 0.22 ^{Aa}	5.40 \pm 0.29 ^{Aa}
	10	5.52 \pm 0.16 ^{Aa}	5.20 \pm 0.01 ^{Ab}	5.57 \pm 0.24 ^{Aa}	5.60 \pm 0.15 ^{Aa}

^{a-g} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-C} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FN Controle: fermento natural (microbiota selvagem); FN Lf56: fermento natural inoculado com *L. fermentum* 56 FN Lp129: fermento natural inoculado com *L. pentosus* 129; FN Lf139: fermento natural inoculado com *L. fermentum* 139.

Ao comparar as contagens de células viáveis de BAL entre as amostras em cada ponto de tempo de propagação medido, observou-se que a massa fermentada inoculada com Lf56 teve as contagens mais altas até o sétimo dia de propagação,

exceto no quarto dia. Após dez dias de propagação, as contagens de células viáveis de BAL não diferiram significativamente entre todas as amostras avaliadas. A estabilização das contagens de BAL após dez dias de propagação de fermento natural confirma os resultados de estudos anteriores (Gobbetti *et al.*, 2016; Van der Meulen *et al.*, 2007; Weckx *et al.*, 2010a, 2010b).

As contagens de células viáveis de levedura variaram de $1,00 \pm 0,07$ a $6,39 \pm 0,55$ log UFC/g para as amostras durante o tempo de propagação medido (Tabela 6). As maiores contagens de células viáveis de levedura foram encontradas para massa fermentada com Lf129 e Lf139 no primeiro e segundo dia de propagação. Após o quarto dia, todas as amostras obtiveram contagens reduzidas de células viáveis de levedura (<3 log UFC/g). As contagem de células viáveis de leveduras foram estabilizadas a partir do nono dia de propagação sem diferença estatística entre as amostras avaliadas. Notavelmente, apenas colônias de levedura características foram observadas durante todo o período de propagação para todas as amostras, indicando que o crescimento de fungos filamentosos foi inibido, provavelmente devido à diminuição do pH nas amostras ao longo do tempo.

3.3.2 pH e ATT durante a propagação de fermento natural

Após dois dias de propagação de fermento natural foi observada queda ($p < 0,05$) nos valores de pH e aumento ($p < 0,05$) na acidez nas amostras de fermento natural inoculadas com BAL (Tabela 7). Os valores de pH variaram de $5,78 \pm 0,07$ a $3,28 \pm 0,03$, enquanto a acidez variou de $1,62 \pm 0,24$ a $13,81 \pm 0,02$ g/100g. Após quatro dias de propagação, todas as amostras apresentaram pH abaixo de 4 ($p < 0,05$) e valores de acidez acima de 11 g/100g.

Curiosamente, a adição de Lpe 129 e Lf 139 aos seus respectivos fermentos naturais resultou em diferença ($p > 0,05$) para os valores de pH entre estas duas amostras do quinto ao décimo dia de propagação. No oitavo, nono e décimo dia de propagação não foi observada nenhuma diferença ($p > 0,05$) nos valores de pH entre todas as massas fermentadas adicionadas com BAL, o que pode demonstrar o impacto positivo da adição dessas cepas como cultura iniciadora, uma vez que promoveram essa homogeneidade no pH das massas fermentadas examinadas. Este fator é importante para a estabilidade deste produto. Mantzourani *et al.* (2019) e

Minervini *et al.* (2016) encontraram valores semelhantes de pH e ATT em leveduras de fermento natural inoculadas com *L. paracasei* após o quinto e sexto dia de propagação, respectivamente. Reale *et al.* (2016) descobriram que após 24 horas de propagação do fermento natural, a amostra controle não apresentou acidificação, enquanto amostra inoculada com *L. casei* apresentou acidificação.

Tabela 7. Valores médios \pm desvio padrão para determinação de pH e acidez titulável (ATT) (g/100g) em massa fermentada durante 10 dias de propagação a 30 ± 1 °C.

	Tempo (dias)	Fermento Natural Fresco (FN)			
		Controle	Lf56	Lp129	Lf139
pH	0	5.59 \pm 0.03 ^{Bb}	5.78 \pm 0.07 ^{Aa}	5.78 \pm 0.06 ^{Aa}	5.69 \pm 0.05 ^{Ab}
	1	5.90 \pm 0.02 ^{Aa}	5.78 \pm 0.07 ^{Ba}	5.69 \pm 0.02 ^{Bb}	5.78 \pm 0.03 ^{Ba}
	2	6.00 \pm 0.14 ^{Aa}	4.33 \pm 0.06 ^{Db}	5.41 \pm 0.09 ^{Bde}	5.60 \pm 0.04 ^{Cb}
	3	4.17 \pm 0.16 ^{Ac}	3.49 \pm 0.03 ^{Cc}	3.55 \pm 0.03 ^{BCc}	3.55 \pm 0.01 ^{Bc}
	4	3.45 \pm 0.03 ^{Ad}	3.30 \pm 0.01 ^{Bd}	3.25 \pm 0.01 ^{Cf}	3.30 \pm 0.01 ^{Bf}
	5	3.39 \pm 0.04 ^{Ad}	3.30 \pm 0.07 ^{Ad}	3.35 \pm 0.02 ^{Ae}	3.38 \pm 0.02 ^{Ae}
	6	3.56 \pm 0.01 ^{Ad}	3.37 \pm 0.05 ^{Ccd}	3.44 \pm 0.01 ^{Bd}	3.43 \pm 0.02 ^{BCd}
	7	3.56 \pm 0.06 ^{Ad}	3.40 \pm 0.03 ^{Bcd}	3.33 \pm 0.01 ^{Ce}	3.35 \pm 0.02 ^{Ce}
	8	3.45 \pm 0.07 ^{Ad}	3.32 \pm 0.03 ^{Bd}	3.30 \pm 0.02 ^{Be}	3.29 \pm 0.03 ^{Bf}
	9	3.42 \pm 0.07 ^{Ad}	3.35 \pm 0.01 ^{ABd}	3.30 \pm 0.02 ^{Be}	3.28 \pm 0.03 ^{Bf}
	10	3.43 \pm 0.07 ^{Ad}	3.30 \pm 0.03 ^{Bd}	3.35 \pm 0.04 ^{ABde}	3.29 \pm 0.02 ^{Bf}
ATT	0	1.62 \pm 0.24 ^{Bi}	1.85 \pm 0.42 ^{ABh}	1.98 \pm 0.23 ^{ABh}	2.40 \pm 0.34 ^{Ah}
	1	2.82 \pm 0.19 ^{Ag}	2.89 \pm 0.20 ^{Ag}	2.82 \pm 0.35 ^{Ag}	2.66 \pm 0.30 ^{Ah}
	2	2.43 \pm 0.17 ^{Ch}	5.25 \pm 0.10 ^{Af}	3.37 \pm 0.23 ^{Bf}	3.18 \pm 0.11 ^{Bg}
	3	6.87 \pm 0.15 ^{Bf}	7.39 \pm 0.19 ^{Ae}	7.00 \pm 0.02 ^{Bbe}	6.94 \pm 0.20 ^{Bf}
	4	11.28 \pm 0.19 ^{Bcd}	12.26 \pm 0.49 ^{Abc}	11.03 \pm 0.28 ^{Bd}	12.03 \pm 0.30 ^{Abcd}
	5	10.70 \pm 0.09 ^{Be}	11.22 \pm 0.07 ^{Ad}	11.48 \pm 0.35 ^{Ac}	10.31 \pm 0.26 ^{Ce}
	6	11.97 \pm 0.49 ^{Ab}	11.67 \pm 0.29 ^{Ac}	11.61 \pm 0.46 ^{Ac}	11.41 \pm 0.20 ^{Ad}
	7	13.04 \pm 0.10 ^{Ba}	12.63 \pm 0.49 ^{Cb}	13.74 \pm 0.45 ^{Aa}	11.95 \pm 0.07 ^{Dc}
	8	11.22 \pm 0.29 ^{Bd}	11.77 \pm 0.26 ^{Bc}	12.32 \pm 0.15 ^{Ab}	12.19 \pm 0.15 ^{Ab}
	9	12.31 \pm 0.29 ^{Cb}	13.23 \pm 0.04 ^{Ba}	12.39 \pm 0.20 ^{Cb}	13.81 \pm 0.02 ^{Aa}
	10	10.74 \pm 0.28 ^{Bde}	11.27 \pm 0.25 ^{Bd}	11.79 \pm 0.14 ^{Ac}	11.67 \pm 0.14 ^{Ad}

^{a-9}Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-C}Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FN Controle: fermento natural (microbiota selvagem); FN Lf56: fermento natural inoculado com *L. fermentum* 56 FN Lp129: fermento natural inoculado com *L. pentosus* 129; FN Lf139: fermento natural inoculado com *L. fermentum* 139.

3.4 Contagem de células viáveis de BAL e levedura e análise microbiológica em pão de fermento natural

Devido às temperaturas de cozimento superiores a 200 °C, a contagem de células viáveis de BAL foi < 2 log UFC/g em todas as amostras. A alta temperatura de cozimento inibe a sobrevivência das bactérias lácticas comprometendo seus potenciais efeitos no pão (Zhang, Taal, Boom, Chen, & Schutyser, 2018). A contaminação pós-cozimento pode ter influenciado a contagem de células viáveis da levedura.

O pão elaborado com Lf56 apresentou presença de fungos filamentosos após três dias de armazenamento, enquanto os pães Lp129 e Lf 139 elaborados respectivamente com cepas de *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 apresentaram < 2 log UFC/g de fungos filamentosos após sete dias de armazenamento. A inibição do crescimento microbiano nessas amostras pode ser atribuída ao baixo pH e à produção de ácidos orgânicos no fermento natural. No entanto, o pão tradicional e o Lf56 apresentaram crescimento de fungos, provavelmente devido aos seus valores de pH mais elevados após sete dias de armazenamento.

Zhang *et al.* (2018) e Mantzourani *et al.* (2019) relataram que culturas iniciadoras de fermento natural poderiam exibir atividade antifúngica na massa de pão de longa fermentação e descobriram que amostras de pão inoculadas com *L. paracasei* tinham vida útil estendida de até quinze dias, destacando a capacidade das BAL em preservar características sensoriais e prolongar a vida útil de pão.

3.5 pH, ATT, umidade e volume específico em pão de fermento natural

A Tabela 8 apresenta os valores de pH, ATT, umidade e volume específico dos pães durante o armazenamento. Os resultados indicam que a adição de *Lactobacillus* spp. como cultura iniciadora pode contribuir para prolongar a vida útil, diminuir o pH e aumentar a acidez do pão, principalmente nos pães Lpe129 e Lf139. A acidez foi significativamente menor nos pães elaborados sem a cultura iniciadora, enquanto nos pães com fermento natural inoculados com as cepas de *Lactobacillus* spp. apresentaram excelente estabilidade durante o armazenamento. Porém, a acidez muito intensa pode ser um atributo sensorial que promova uma rejeição do consumidor (Campo, del Arco, Urtasun, Oria, & Ferrer-Mairal, 2016).

Tabela 8. Valores (médios \pm desvio padrão) para parâmetros físico-químicos em pães elaborados com *L. fermentum* (Lf56), *L. pentosus* (Lpe129), *L. fermentum* 139 (Lf139), Controle e Tradicional (*Saccharomyces cerevisiae*) durante armazenamento de sete dias

Parâmetros	Tempo (dias)	Pão				
		Tradicional	Controle	Lf56	Lpe129	Lf139
pH	0	5.12 ^{Ab} \pm 0.03	4.13 ^{Ba} \pm 0.04	4.06 ^{Ba} \pm 0.04	4.14 ^{Ba} \pm 0.02	4.11 ^{Ba} \pm 0.02
	1	5.65 ^{Aa} \pm 0.10	4.10 ^{Ba} \pm 0.09	3.94 ^{Cc} \pm 0.02	4.09 ^{Bb} \pm 0.02	4.08 ^{Bab} \pm 0.01
	3	5.04 ^{Abc} \pm 0.05	3.95 ^{Bb} \pm 0.01	3.85 ^{Cd} \pm 0.02	3.84 ^{Cc} \pm 0.01	3.83 ^{Cc} \pm 0.02
	7	5.00 ^{Ac} \pm 0.03	3.87 ^{Cc} \pm 0.01	3.98 ^{Bb} \pm 0.01	3.86 ^{Cc} \pm 0.02	3.73 ^{Dd} \pm 0.02

ATT (mL NaOH/10g)	0	5.90 ^{Bc} ±0.06	4.60 ^{Ca} ±0.20	6.20 ^{Ab} ±0.20	6.44 ^{Aa} ±0.31	6.41 ^{Ab} ±0.09
	1	5.71 ^{Bd} ±0.10	3.90 ^{Cc} ±0.06	7.31 ^{Aa} ±0.14	5.55 ^{Bc} ±0.10	5.50 ^{Bd} ±0.20
	3	6.40 ^{Ab} ±0.34	4.10 ^{Babc} ±0.52	6.35 ^{Ab} ±0.13	6.50 ^{Aa} ±0.10	6.90 ^{Aa} ±0.20
	7	7.32 ^{Aa} ±0.10	4.40 ^{Dab} ±0.11	5.40 ^{BCc} ±0.24	5.90 ^{Bb} ±0.06	6.09 ^{Bc} ±0.16
Umidade	0	34.17 ^{Aa} ±0.27	28.62 ^{Aa} ±1.57	31.03 ^{Aa} ±1.88	30.09 ^{Aa} ±0.69	28.28 ^{Aa} ±0.62
	1	31.78 ^{Ab} ±0.84	28.25 ^{Ca} ±0.57	27.00 ^{Cb} ±0.04	28.00 ^{Aab} ±2.35	28.46 ^{Ca} ±0.50
	3	30.39 ^{Ac} ±0.27	23.71 ^{Cb} ±0.10	27.19 ^{Bb} ±0.34	26.90 ^{Bb} ±0.21	26.61 ^{Bb} ±0.22
	7	30.59 ^{Ac} ±0.11	22.97 ^{Cc} ±0.42	26.91 ^{Bb} ±0.94	22.20 ^{Dc} ±0.64	26.52 ^{Bb} ±0.08
Volume específico	0	2.91 ^{Ca} ±0.01	3.45 ^{Aa} ±0.01	2.92 ^{Ca} ±0.01	2.87 ^{Da} ±0.01	3.25 ^{Ba} ±0.02
	1	2.85 ^{Db} ±0.01	3.46 ^{Aa} ±0.01	2.89 ^{Cb} ±0.01	2.85 ^{Dab} ±0.02	3.07 ^{Bb} ±0.10
	3	2.62 ^{Dc} ±0.01	3.26 ^{Ab} ±0.02	2.83 ^{Cc} ±0.01	2.83 ^{Cb} ±0.00	3.04 ^{Bb} ±0.02
	7	2.62 ^{Cc} ±0.03	2.86 ^{Ac} ±0.01	2.82 ^{Bc} ±0.02	2.59 ^{Cc} ±0.01	2.44 ^{Dc} ±0.02

^{a-c} Em coluna, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Em linha, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). Controle: pão elaborado com fermento natural (microbiota selvagem); Lf56: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 56; Lpe129: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. pentosus* 129; Lf139: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 139.

Os pães costumam perder umidade devido à migração da água do interior do miolo para as porções mais externas e depois para o meio ambiente, o que é natural e faz parte do envelhecimento destes produtos. Essa redução foi observada em todas as amostras. Além disso, o volume específico das amostras de pão diminuiu durante o armazenamento, provavelmente devido à secagem, perda de gases retidos durante o cozimento e alterações na estrutura do amido e do glúten. Mantzourani *et al.* (2019) e Yu *et al.* (2019) encontraram valores de volume específico semelhantes para pães com massa fermentada, sendo que este último observou volumes menores em amostras de pães inoculados com *L. plantarum*.

3.6 Análise de cor e textura

Os resultados de L^* , a^* e b^* para as amostras de pães analisadas são apresentados na Tabela 9. Valores de L^* , variaram de $63,92 \pm 1,21$ a $68,82 \pm 1,19$, indicando tendência de luminosidade mais próxima do branco nos miolos dos pães. O parâmetro a^* ($-1,25 \pm 0,04$ a $-0,62 \pm 0,04$) foi próximo de zero. O parâmetro b^* ($12,35 \pm 0,04$ a $15,41 \pm 1,27$) foi associado ao miolo levemente amarelado, característico de pães com processos de mistura que promovem baixa oxidação dos pigmentos carotenoides da farinha de trigo (Antognoni, Mandrioli, Potente, Taneyo Saa, & Gianotti, 2019).

Tabela 9. Valores (médios ± desvio padrão) para determinação de cor (L^* , a^* , b^*) em pães elaborados com *L. fermentum* (Lf56), *L. pentosus* (Lpe129), *L. fermentum* 139 (Lf139), Controle e Tradicional (*Saccharomyces cerevisiae*) durante os dias 1º, 3º e 7º de armazenamento

Tempo (dias)	Pão				
	Tradicional	Controle	Lf56	Lp129	Lf139
1	68.21 ^{Aa} ± 0.83	68.82 ^{Aa} ± 1.19	63.33 ^{Ba} ± 0.32	66.16 ^{Aa} ± 1.01	67.12 ^{Aa} ± 1.44
3	L* 63.54 ^{Bb} ± 0.25	68.48 ^{Aa} ± 1.14	63.92 ^{Ca} ± 1.21	62.30 ^{Ba} ± 2.47	62.84 ^{Bb} ± 0.91
7	62.23 ^{Ab} ± 2.33	66.05 ^{Aa} ± 1.21	63.58 ^{Aa} ± 1.49	62.36 ^{Aa} ± 1.26	63.51 ^{Ab} ± 1.03
1	-1.16 ^{Ca} ± 0.06	-1.82 ^{Ba} ± 0.06	-0.88 ^{Ab} ± 0.08	-1.22 ^{Ca} ± 0.02	-1.25 ^{Ca} ± 0.04
3	a* -0.68 ^{Bb} ± 0.07	-1.43 ^{Ab} ± 0.01	-0.76 ^{Bb} ± 0.14	-1.00 ^{Cb} ± 0.08	-0.65 ^{Bc} ± 0.03
7	-0.58 ^{Bb} ± 0.07	-1.36 ^{Ab} ± 0.06	-1.08 ^{Ca} ± 0.00	-0.62 ^{Bc} ± 0.04	-1.08 ^{Cb} ± 0.07
1	14.23 ^{Aa} ± 0.08	14.75 ^{Aa} ± 0.29	12.35 ^{BCb} ± 0.04	12.55 ^{BCb} ± 0.52	12.76 ^{Cb} ± 0.35
3	b* 14.16 ^{Aa} ± 0.26	14.05 ^{Aab} ± 0.15	14.29 ^{Aa} ± 0.36	13.43 ^{Aab} ± 0.96	14.78 ^{Aa} ± 0.38
7	15.41 ^{Aa} ± 1.27	13.46 ^{Ab} ± 0.63	14.09 ^{Aa} ± 0.50	15.16 ^{Aa} ± 0.54	13.88 ^{Aab} ± 0.82

^{a-c} Em coluna, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Em linha, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). Controle: pão elaborado com fermento natural (microbiota selvagem); Lf56: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 56; Lpe129: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. pentosus* 129; Lf139: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 139.

No primeiro e terceiro dia de armazenamento, o pão de fermento natural adicionado de Lf56 apresentou luminosidade menor ($p < 0,05$) que as demais amostras. Este escurecimento mais significativo pode estar relacionado à reação de Maillard mais intensa (Tomić *et al.*, 2023) neste pão, possivelmente devido a algum impacto da adição de Lf56 na liberação de carboidratos e aminoácidos de menor peso molecular disponíveis para esta reação. Outro fator que interfere na luminosidade é a perda de água durante o armazenamento, que ocorreu para todas as amostras, fato que pode ter influenciado na similaridade da luminosidade das amostras após sete dias de armazenamento.

Quanto aos parâmetros a* e b*, foram observadas algumas alterações entre as amostras durante o armazenamento. No entanto, parecem não ter relação com a adição de fermento natural inoculada ou não com *Lactobacillus* spp.

A Tabela 10 apresenta os valores obtidos para análise da textura do miolo, incluindo dureza (D), elasticidade (E) e mastigabilidade (M), durante o período de armazenamento dos pães. Os valores de dureza (D) variaram de $5,37 \pm 0,43$ a $155,32 \pm 0,96$ N, de $0,19 \pm 0,01$ a $0,39 \pm 0,04$ para elasticidade (E) e de $5,64 \pm 0,35$ a $83,88 \pm 0,25$ N para mastigabilidade (M).

Em relação à dureza, parâmetros como perda de umidade e adição de fermento natural às massas estão associados à redução desse parâmetro, o que foi confirmado no estudo de Korcari *et al.* (2021) e também nesta pesquisa. Após um dia de armazenamento, os pães adicionados de Lf56 e Lpe129 apresentaram dureza inferior aos demais. Com o passar dos dias, a perda de umidade foi mais determinante no aumento da dureza do que o tipo de fermento utilizado, o que explica as variações entre as amostras; porém, todos os pães apresentaram aumento de dureza após sete

dias de armazenamento. Ventimiglia *et al.* (2015) encontraram valores de dureza em pães elaborados com fermento natural inoculado com cepas de *Lactobacillus* spp. variando de $11,58 \pm 0,02$ a $43,31 \pm 0,24$ N, dado que se assemelham aos resultados encontrados neste estudo.

Tabela 10. Valores (médios \pm desvio padrão) para determinação de textura nos parâmetros Dureza (H), Elasticidade (E) e Mastigabilidade (M) em pães elaborados com *L. fermentum* (Lf56), *L. pentosus* (Lpe129), *L. fermentum* 139 (Lf139), Controle e Tradicional (*Saccharomyces cerevisiae*) durante os dias 1^o, 3^o e 7^o de armazenamento

Tempo (dias)	Parâmetros	Pão				
		Tradicional	Controle	Lf56	Lpe129	Lf139
1	H (N)	9.09 ^{Bc} \pm 0.15	10.40 ^{Bc} \pm 0.63	8.21 ^{Bc} \pm 0.18	5.37 ^{Cc} \pm 0.43	13.98 ^{Ac} \pm 0.83
3		15.89 ^{Db} \pm 0.83	21.83 ^{Cb} \pm 1.04	18.77 ^{Cb} \pm 0.44	29.04 ^{Bb} \pm 0.49	33.73 ^{Ab} \pm 0.86
7		28.42 ^{Ea} \pm 0.57	155.32 ^{Aa} \pm 0.96	57.21 ^{Da} \pm 0.92	71.53 ^{Ca} \pm 0.28	113.23 ^{Ba} \pm 0.25
1	E	0.38 ^{Aa} \pm 0.01	0.32 ^{Ba} \pm 0.01	0.33 ^{Ba} \pm 0.00	0.39 ^{Aa} \pm 0.04	0.32 ^{Ba} \pm 0.01
3		0.24 ^{Cb} \pm 0.01	0.26 ^{Bb} \pm 0.01	0.25 ^{Bcb} \pm 0.01	0.28 ^{Ab} \pm 0.01	0.25 ^{Bcb} \pm 0.01
7		0.19 ^{Bc} \pm 0.01	0.21 ^{Abc} \pm 0.01	0.23 ^{Ab} \pm 0.03	0.21 ^{Abc} \pm 0.02	0.19 ^{Bc} \pm 0.01
1	C (N)	5.64 ^{Cc} \pm 0.35	12.12 ^{Aa} \pm 0.59	9.94 ^{Bc} \pm 0.59	5.90 ^{Cc} \pm 0.33	10.08 ^{Ba} \pm 0.79
3		7.78 ^{Db} \pm 0.20	42.80 ^{Bb} \pm 0.40	19.28 ^{Cb} \pm 0.33	20.02 ^{Cb} \pm 1.22	43.74 ^{Ab} \pm 0.10
7		12.82 ^{Ea} \pm 0.18	83.88 ^{Ac} \pm 0.25	29.51 ^{Da} \pm 0.73	39.21 ^{Ca} \pm 0.85	61.18 ^{Bc} \pm 0.18

^{a-c} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). Controle: pão elaborado com fermento natural (microbiota selvagem); Lf56: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 56; Lpe129: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. pentosus* 129; Lf139: pão elaborado com fermento natural inoculado com *L. fermentum* 139.

A elasticidade e a mastigabilidade também foram menores nos pães adicionados de fermento natural inoculada com Lf56 e Lpe129, uma vez que esses parâmetros foram calculados em função da dureza.

A perda de elasticidade do miolo também ocorre durante o armazenamento e contribui para a percepção do consumidor sobre o pão envelhecido (Tinzl-Malang *et al.*, 2020). Destaca-se a maior elasticidade do pão Lpe129 adicionado de fermento inoculado com *L. pentosus* 129, durante todo o período de armazenamento. A mastigabilidade foi menor entre os pães elaborados com fermento natural inoculados com *Lactobacillus* spp., a microbiota presente nesses fermentos produzem compostos que modificam a estrutura do amido e do glúten. A acidificação, a atividade proteolítica e a produção de exopolissacarídeos são fenômenos já documentados na fermentação do pão de longa fermentação, tornando sua estrutura mais complexa (Yildiz & Karatas, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

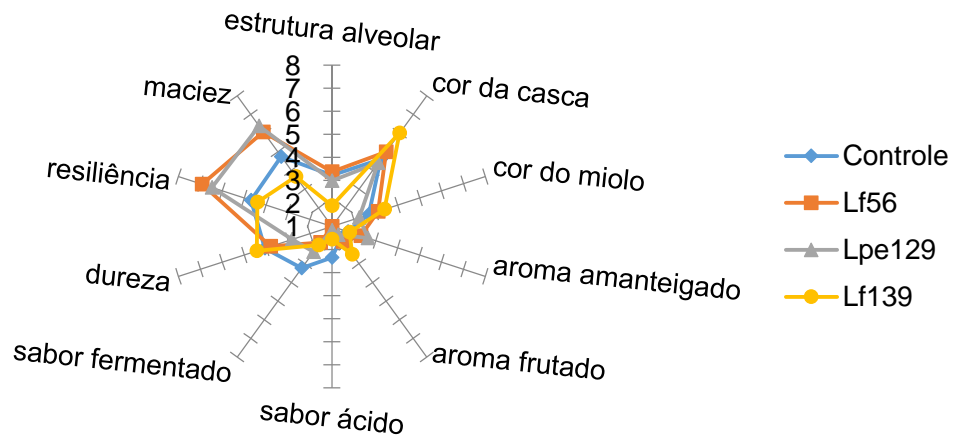
3.7 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) do pão de fermento natural

Os resultados da análise descritiva quantitativa (ADQ) dos diferentes pães são apresentados na Figura 1. O pão Lf139 apresentou os menores valores de estrutura alveolar, enquanto o pão Lpe129 não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) dos pães Controle e Lf139. Os pães Controle e Lf56 apresentaram os maiores valores na estrutura alveolar. Em relação à cor, o pão Lf139 apresentou o maior valor, embora semelhante ($p > 0,05$) aos pães Controle e Lf56. Neste estudo, foi observada menor oxidação do miolo nos pães elaborados com *Lactobacillus spp.* comparado ao pão tradicional.

O aroma amanteigado foi mais pronunciado nos pães Lf56 e Lpe129, sendo a amostra Lf56 os pães Controle e Lf139. O aroma frutado não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pães Controle, Lf56 e Lf139. De acordo com Clemente *et al.* (2018), as características da microbiota da massa fermentada e da farinha de trigo podem influenciar o produto final, e as percepções de aroma, sabor e textura são possivelmente afetadas por essas variáveis.

Em termos de sabor ácido, os pães Controle, Lpe129 e Lf139 não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Possivelmente, o sabor ácido no pão Controle pode ser atribuído à maior acidez devido à microbiota da massa fermentada selvagem, que acidifica o pão por um período mais longo. O pão Controle também apresentou sabor fermentado mais forte, semelhante ($p > 0,05$) às amostras Lp129 e Lf139, enquanto o pão Lf56 teve a menor pontuação neste parâmetro. Em geral, todos os pães elaborados com cultura de *Lactobacillus spp.* tinham baixos valores de dureza. Os pães Lf56 e Lp129 foram os melhores em resiliência e maciez. Além disso, o pão Controle não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) do pão Lpe129 e Lf139 nestes parâmetros.

Figura 1. Resultados médios para avaliação descritiva quantitativa em pães elaborados com *Limosilactobacillus fermentum* (Lf56), *Lactiplantibacillus pentosus* (Lpe129), *Limosilactobacillus fermentum* 139 (Lf139) e Controle.



4. Conclusões

Dentre as cepas selecionadas, *L. fermentum* 56, *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 demonstraram satisfatório em seus respectivos fermentos naturais e pães de longa fermentação. Em geral, o uso de *Lactobacillus* spp. influenciou as características microbiológicas e físico-químicas da massa fermentada e do pão. Todas as cepas testadas contribuíram para a estabilização (maturação) da massa fermentada entre o nono e o décimo dias de propagação. Os pães Lpe129 e Lf139 apresentaram os resultados mais promissores em termos de inibição do crescimento de fungos filamentosos deteriorantes após sete dias de armazenamento. Quanto à avaliação sensorial, a acidez característica associada às BAL, identificada nos testes microbiológicos e físico-químicos não foi perceptível durante a análise sensorial dos pães. A estrutura alveolar foi identificada principalmente nos pães com Lf56, enquanto o aroma amanteigado e a maciez foram mais evidentes nos pães com Lpe129. A inclusão das bactérias lácticas também pode ter influenciado positivamente nos parâmetros de textura destes pães. Sendo assim, culturas iniciadoras de *Lactiplantibacillus pentosus* e *Limosilactobacillus fermentum* demonstraram possuir potencial aplicação na produção de fermentos naturais, com amadurecimento da sua microbiota após dez dias propagação, bem como satisfatória inserção do fermento fresco na produção de pães de longa fermentação.

Referências

- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Settanni, L. (2013). Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology*, 36(2), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.003>
- Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Taneyo Saa, D. L., & Gianotti, A. (2019). Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry*, 292, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.061>
- Aoac International. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. Aoac International.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>
- Blaiotta, G., Romano, R., Trifuoggi, M., Aponte, M., & Miro, A. (2022). Development of a Wet-Granulated Sourdough Multiple Starter for Direct Use. *Foods*, 11(9), 1278. <https://doi.org/10.3390/foods11091278>
- Campo, E., del Arco, L., Urtasun, L., Oria, R., & Ferrer-Mairal, A. (2016). Impact of sourdough on sensory properties and consumers' preference of gluten-free breads enriched with teff flour. *Journal of Cereal Science*, 67, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.09.010>
- Cauvain, S. (2016). Bread and other bakery products. In *The stability and shelf life of food* (pp. 431–459). Elsevier.
- Coda, R., Cagno, R. D., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.018>
- de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2017). In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- Fraberger, V., Unger, C., Kummer, C., & Domig, K. J. (2020). Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough. *LWT*, 127, 109358. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109358>
- Gänzle, M. G., & Zheng, J. (2019). Lifestyles of sourdough lactobacilli – Do they matter for microbial ecology and bread quality? *International Journal of Food Microbiology*, 302, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019>
- Garcia, E. F., Amanda, Luciano, W. A., Rodrigues, M., Maria, Madruga, M. S., Lima, S., Magnani, M., Saarela, M., & de. (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>

- Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C. A., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., de Moraes Júnior, M. A., Lucena, B. T. L., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2016). Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022>
- Hadaegh, H., Seyyedain Ardabili, S. M., Tajabadi Ebrahimi, M., Chamani, M., & Azizi Nezhad, R. (2017). *The Impact of Different Lactic Acid Bacteria Sourdoughs on the Quality Characteristics of Toast Bread*. *Journal of Food Quality*. <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/7825203/>
- Korcari, D., Secchiero, R., Laureati, M., Marti, A., Cardone, G., Rabitti, N. S., Ricci, G., & Fortina, M. G. (2021). Technological properties, shelf life and consumer preference of spelt-based sourdough bread using novel, selected starter cultures. *LWT*, 151, 112097. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112097>
- Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., Zhao, G., Xu, L., Shen, L., Liu, Y., Chen, H., Wu, W., Li, C., & Liu, S. (2018). Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. *LWT*, 95, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.061>
- Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>
- Mantzourani, I., Plessas, S., Odatzidou, M., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., & Bekatorou, A. (2019). Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chemistry*, 271, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.183>
- Martinbianco, F., Martins, A. R., Rech, R., Flôres, S. H., & Ayub, M. A. Z. (2013). Avaliação sensorial de pães de fermentação natural a partir de culturas starters inovadoras. *Ciência Rural*, 43(9), 1701–1706. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782013000900026>
- Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Added ingredients affect the microbiota and biochemical characteristics of durum wheat type-I sourdough. *Food Microbiology*, 60, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.016>
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27(7), 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.021>
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between

- Ingredients and Microbial Species Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1251–1264. <https://doi.org/10.1128/aem.07721-11>
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology*, 26(7), 676–684. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.001>
- Randazzo, C. L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P., & Caggia, C. (2005). Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 251–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02624.x>
- Reale, A., Di Renzo, T., Zotta, T., Preziuso, M., Boscaino, F., Ianniello, R., Storti, L. V., Tremonte, P., & Coppola, R. (2016). Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. *LWT*, 73, 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.065>
- Sidel, J. L., & Stone, H. (1993). The role of sensory evaluation in the food industry. *Food Quality and Preference*, 4(1-2), 65–73. [https://doi.org/10.1016/0950-3293\(93\)90314-v](https://doi.org/10.1016/0950-3293(93)90314-v)
- Silva, N. da, Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. de A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2017). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. Editora Blucher.
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., de Oliveira Garcia, A., Heck, R. T., Valle Garcia, M., Martins Fries, L. L., & Venturini Copetti, M. (2019). Stability, sensory attributes and acceptance of panettones elaborated with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 and *Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533. *Food Research International*, 116, 973–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.035>
- Tinzl-Malang, S. K., Grattepanche, F., Rast, P., Fischer, P., Sych, J., & Lacroix, C. (2020). Purified exopolysaccharides from *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 act synergistically on bread structure to prevent staling. *LWT*, 127, 109375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109375>
- Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2010). *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*, 26(3), 205–229. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>
- Tomić, J., Dapčević-Hadnađev, T., Škrobot, D., Maravić, N., Popović, N., Stevanović, D., & Hadnađev, M. (2023). Spontaneously fermented ancient wheat sourdoughs in breadmaking: Impact of flour quality on sourdough and bread physico-chemical properties. *LWT*, 175, 114482. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114482>
- Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2007). Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4741–4750. <https://doi.org/10.1128/aem.00315-07>
- Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., & Settanni, L. (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 51, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.011>

- Weckx, S., Van der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., & De Vuyst, L. (2010a). Community Dynamics of Bacteria in Sourdough Fermentations as Revealed by Their Metatranscriptome. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5402–5408. <https://doi.org/10.1128/aem.00570-10>
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2010b). Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology*, 27(8), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.005>
- Yildirim, R. M., & Arici, M. (2019). Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. *LWT*, 112, 108224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.122>
- Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009>
- Yu, Y., Wang, L., Qian, H., Zhang, H., Li, Y., Wu, G., Qi, X., Xu, M., & Rao, Z. (2019). Effect of selected strains on physical and organoleptic properties of breads. *Food Chemistry*, 276, 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.048>
- Zhang, L., Taal, M. A., Boom, R. M., Chen, X. D., & Schutyser, M. A. I. (2018). Effect of baking conditions and storage on the viability of *Lactobacillus plantarum* supplemented to bread. *LWT*, 87, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.005>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

CAPITULO III – ARTIGO 2

RESUMO

Os resultados presentes no capítulo III, intitulado “Efeitos de fermentos naturais liofilizados com *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 na qualidade do pão de longa fermentação”, será submetido em periódico internacional relacionado com a temática da pesquisa. O estudo avaliou a produção de fermento natural liofilizado com cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 em cultura única ou em co-cultura. Após a maturação, os fermentos foram liofilizados e avaliados durante o armazenamento de 60 dias. A citometria de fluxo foi utilizada para identificar e avaliar o impacto do processo de secagem (liofilização) na viabilidade celular da microbiota presente no fermento fresco. Todos os fermentos apresentaram resultados satisfatórios quanto a sua caracterização microbiológica e físico-química, indicando excelente vida de prateleira ao final dos 60 dias de armazenamento sem condições controladas de umidade. O fermento liofilizado produzido com a cepa *L. fermentum* 139 e seu respectivo pão apresentou os melhores resultados nos parâmetros avaliados no estudo.

Ademais, o estudo confirmou que é viável a produção de pães de longa fermentação a partir de fermento natural liofilizado com características tecnológicas e satisfatória atividade fermentativa (produção de ácidos orgânicos e dióxido de carbono) compostos essenciais em fermento natural que atuam no aumento do volume e na produção de gases que dispensa a utilização de fermentos biológicos secos (*Saccharomyces cerevisiae*). Devido aos resultados encontrados neste estudo, um pedido de patente intitulado “Fermento natural desidratado com *Limosilactobacillus fermentum* 139 para a produção de pães” foi realizado para propor um produto que ainda não existe no mercado brasileiro de panificação, solicitado no dia 22 de março de 2023, através da Agência UFPB de Inovação Tecnológica (INOVA UFPB), sob o processo 23074.026014/2023-60, como disposto no Apêndice A. Até o presente momento, o pedido de patente obteve no dia 03 de julho de 2023 parecer favorável após análise pela Diretoria de Incubação Empresarial de Base Tecnológica desta INOVA-UFPB.

Efeito de fermentos naturais liofilizados com *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 na qualidade do pão de longa fermentação

Resumo

As culturas iniciadoras de bactérias lácticas fornecem opções eficazes para a produção de fermento natural. Técnicas de secagem são utilizadas para manter a viabilidade da microbiota presente neste tipo fermento. Este estudo teve como objetivo produzir fermento natural liofilizado (FNL) utilizando como culturas iniciadoras as espécies de BAL *Lactiplantibacillus pentosus* (Lpe129) e *Limosilactobacillus fermentum* (Lf139). Um grupo controle também foi incluído. Todas as amostras de FNL e pães produzidos foram caracterizadas durante o armazenamento. A liofilização foi utilizada como técnica de secagem dos fermentos após sua maturação. Os resultados indicaram que a viabilidade das células BAL em todas as amostras de fermento natural liofilizadas, exceto FNL Lp129, foi superior a 7 log UFC/g. O citômetro de fluxo revelou que a porcentagem de células viáveis foi superior a 70% em amostras de fermento natural fresca e liofilizada. As amostras de FNL apresentaram pouca variação nos parâmetros físico-químicos analisados, indicando excelente vida de prateleira durante o armazenamento de 60 dias. O volume específico foi maior no pão Lf139 e no pão Mix, estes mesmos pães apresentaram os menores valores de dureza e elasticidade. Cor característica do miolo em todas os pães. A calorimetria exploratória diferencial indicou que o pão Lp129 apresentou o menor envelhecimento no primeiro dia, enquanto o pão Lf139 apresentou o menor valor de entalpia no terceiro dia. Digestibilidade da proteína > 90% em todas as amostras, notadamente melhor nos pães inoculados com fermento liofilizado com as espécies em cultura única. Os resultados demonstram excelente caracterização tecnológica de massas fermentadas liofilizadas ao final de 60 dias de armazenamento e demonstraram grande potencial e aplicabilidade na produção de pães de longa fermentação com características semelhantes aos pães produzidos com massa fermentada fresca e com fermentação satisfatória sem uso de levedura de panificação.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; Fermento; Produto liofilizado à base de cereais; Produção de pão.

Abstract

Lactic acid bacteria starter cultures provide effective options for sourdough production. Drying techniques are used to maintain the viability of the microbiota present in this type of sourdough. This study aimed to produce freeze-dried sourdough (FD-SD) using starter cultures from *Lactiplantibacillus pentosus* (Lpe129) and *Limosilactobacillus fermentum* (Lf139) strains. A control group was also included. All samples of FD-SD and breads produced were characterized during storage. The freezing drying was used as a technique in the production of sourdough with starter culture after maturation. The results indicated that LAB cell viability in all freeze-dried sourdough samples, except for FD-SD Lp129, exceeded 7 log CFU/g. Flow cytometer revealed that the percentage of live cells was >70% in both fresh and freeze-dried sourdough samples. FD-SD samples showed little variation in the physical-chemical parameters analyzed, indicating excellent shelf life during storage. The specific volume was higher in bread 139 and bread Mix, these same breads had the lowest hardness and stability values. Distinct crumb color and >90% protein digestibility in all samples, notably freeze-dried sourdough with isolated strains. Differential scanning calorimetry indicated that the Lp129 bread showed the lowest aging on the first day, while the Lf139 bread showed the lowest enthalpy value on the third day. The results demonstrate excellent technological characterization of freeze-dried sourdoughs at the end of 60-day storage and demonstrated great potential and applicability in the production of long fermentation breads with characteristics similar to breads produced with fresh sourdough and with satisfactory leavening without the use of baking-yeast.

Keywords: Lactic acid bacteria; Sourdough; Freeze-dried, cereal-based product; Bread-making.

1. Introdução

A produção de fermento natural é um processo complexo de fermentação que envolve vários microrganismos, como bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras, com papel importante na produção de pão. Este consórcio microbiano numa mistura de farinha e água não só gera dióxido de carbono para levedar a massa, mas também vários compostos que contribuem para o sabor, acidificação, proteólise e inibição de fungos deteriorantes (Axel *et al.*, 2016; Melini & Melini, 2018; Gul *et al.*, 2022).

A diversidade de bactérias lácticas no fermento natural é um importante fator que influencia e a distingue do pão fermentado exclusivamente por *Saccharomyces cerevisiae*. As bactérias lácticas (BAL) produzem ácidos orgânicos (Su *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2023) e exopolissacarídeos (EPS) com propriedades bioativas, além de atuarem como agentes emulsificantes e estabilizantes e influenciarem as características tecnológicas e sensoriais do pão (İspirli, Özmen, Yılmaz, Sağdıç, & Dertli, 2020; Gül, Gül, & Çon, 2022; Calasso *et al.*, 2023). *Lactiplantibacillus pentosus* e *Limosilactobacillus fermentum* são espécies de BAL com capacidade de produzir ácido láctico e EPS (de Albuquerque *et al.*, 2018; Jiang, He, Gan, Li, & Tian, 2022; Fang *et al.*, 2023).

O ecossistema da massa fermentada é dinâmico e as mudanças nas espécies microbianas dominantes durante a fermentação levam a variações nas suas características físico-químicas. A fermentação natural sem controle restrito de temperatura, pH e tempo de incubação resulta em uma variabilidade mais pronunciada na comunidade microbiana que compõe o ecossistema do fermento natural (Jiang *et al.*, 2022; Xiong, Liu, & Huang, 2023). Os altos custos associados à manutenção do fermento natural fresco e a ausência de protocolos de produção padronizados representam desafios significativos para a indústria de panificação (Calvert *et al.*, 2021; Albagli, Schawartz, Amaral, Ferreira, & Finotellil, 2021; Gül *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; al., 2018; Sakandar, Huang, Kubow, Sadiq e Imran, 2019; Ma *et al.*, 2021; Arora *et al.*, 2021; Hérmandez-Parada *et al.*, 2023).

As culturas iniciadoras surgiram como alternativas aos processos naturais de fermentação (Galglio *et al.*, 2020; Plessas, Mantzourani, & Bekatorou, 2020; Gül *et al.*,

2022) e técnicas, como liofilização e pulverização, têm sido cada vez mais utilizadas para preservar essas culturas (Huang *et al.*, 2017; Archakca *et al.*, 2019). A incorporação das cepas liofilizadas de *Lactipantibacillus plantarum* (2979 e 3355) e *Lactococcus lactis* (4355) mostrou-se eficaz na melhoria da viscoelasticidade da massa, do aroma e da acidez do pão (Gu *et al.*, 2023). As técnicas de secagem e suas tecnologias permitem a estabilização do fermento natural em sua forma desidratada, e preserva as características tecnológicas, de qualidade e sensoriais na massa fermentada e na produção de pão sem a necessidade do uso de fermento comercial (Reale *et al.*, 2019).

Embora as tecnologias de secagem possam servir como alternativas ao fermento natural fresco e melhorar a qualidade do pão produzido (Caglar, Ermis, & Durak, 2021; Gül *et al.*, 2022; Gidari-Gounaridou *et al.*, 2023), a sua utilização também pode ter algum desvantagens, como causar danos à estrutura celular de microrganismos benéficos e reduzir a sua taxa de sobrevivência no fermento desidratado durante o armazenamento (Gul, Gul, Yilmaz, Dertli, & Çon, 2020), especialmente quando crioprotetores não são empregados. A aplicação de crioprotetores ajuda a manter a viabilidade desses microrganismos benéficos, e substâncias, como leite desnatado, proteína de soro de leite, dissacarídeos e frutooligosacarídeos (FOS), podem diminuir os danos causados a essas culturas iniciais que foram incorporadas ao fermento natural em pó (Kim *et al.*, 2018; Stefanello *et al.*, 2019; Frakolaki, Giannou, Kekos, & Tzia, 2020; Guo *et al.*, 2022; Sompach, Rodklongtan, Nitisinprasert, & Chitprasert, 2022; Gül *et al.*, 2022).

O FOS demonstrou ser eficaz na proteção das membranas celulares bacterianas (Fenster *et al.*, 2019) e atua como agente estabilizador durante a liofilização de culturas bacterianas e armazenamento de pós produzidos (Romano, Schebor, Mobili, & Gómez-Zavaglia, 2016; Romano, Sciammaro, Mobili, Puppo e Gómez-Zavaglia, 2019).

O fermento natural em pó exerce vantagem em comparação ao fermento fresco quando se objetiva a sua produção industrial, pois oferece maior vida útil, qualidade de produto consistente, facilidade de formulação e custos de transporte reduzidos (Caglar *et al.*, 2021). Estudos anteriores demonstraram resultados positivos com a utilização de culturas iniciadoras, com e sem levedura comercial, na produção de fermento natural tipo II (fermentação longa) e III (seca) (Siepmann, Sousa de Almeida,

Waszczynskyj, & Spier, 2019; Perri, Grego Miani, Amendolagine, Pontonio, & Rizello, 2022; Calasso *et al.*, 2023; Gu *et al.*, 2023). Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os impactos da adição de espécies de bactérias lácticas *L. pentosus* e *L. fermentum* individualmente e em combinação como culturas iniciadoras na produção de fermento natural liofilizado, bem como avaliar seus efeitos nos parâmetros físico-químicos, tecnológicas e de qualidade durante o armazenamento e na produção e avaliação de pães de longa fermentação.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

As cepas *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139 foram isoladas de subprodutos da polpa de frutas e caracterizados por sua segurança e propriedades funcionais como acidificação, produção de EPS e atividade antagônica contra patógenos alimentares (Garcia *et al.*, 2016; de Albuquerque *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2018). Estas cepas foram armazenadas a -18 °C em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Sigma Aldrich, Alemanha) suplementado com 80% de glicerol (Sigma-Aldrich).

2.2 Preparação do inóculo e dos fermentos naturais

O fermento natural (FN) foi preparada segundo Minervini *et al.* (2010) com pequenas modificações. As cepas *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 foram inoculadas em caldo MRS e incubadas (37 ± 1 °C) por 20 horas até atingirem a fase estacionária de crescimento. As células foram centrifugadas (5500 rpm, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes com tampão salino-fosfato estéril (PBS; composição para 1 L: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,4 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂HPO₄, pH 7,4) e ressuspensas em água destilada estéril para obter uma suspensão celular com densidade óptica de 1 no comprimento de onda de 625 nm, que correspondeu a contagens de células viáveis entre 10 - 11 log unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC /mL).

O inóculo foi adicionado à respectiva massa fermentada (FN + cepa) nas seguintes proporções: farinha de trigo (168,75 g), água potável (101,25 mL) e inóculo (10 mL). As amostras incluíram: i) fermento natural com *L. pentosus* 129 (Lpe129), ii) fermento natural com *L. fermentum* 139 (Lf139), fermento natural com uma mistura de *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (Mix), e fermento natural preparado sob as mesmas condições mas sem adição de cepas de BAL (Controle). O processo de propagação iniciou após o primeiro dia retirando-se uma porção do respectivo fermento natural, misturando-a com água potável e farinha (Dona Benta, Moinho J. Macêdo, Salvador, BA, Brasil) e incubada por 24 horas. Os fermentos naturais (Controle, Lpe129, Lf139 e Mix) foram propagados e incubados em estufa com Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (28 ± 1 °C, 24 h). Este procedimento de

propagação e incubação foi repetido a cada 24 horas por um período máximo de 10 dias, até a maturação dos fermentos, com contagem de células viáveis no décimo dia.

2.3 Liofilização de fermento natural

No décimo dia de propagação, as amostras de fermento natural foram suplementadas com frutooligossacarídeo (FOS) (10%, p/p) como crioprotetor. As amostras foram congeladas (-18 °C, 24 h) e posteriormente liofilizadas (temperatura de -55 ± 2 °C, pressão de vácuo <138 µHg, taxa de liofilização 1 mm/h, aproximadamente 40 h) usando um liofilizador de bancada (Liotop, Modelo L-101, São Carlos, SP, Brasil). O pó de cada amostra de fermento natural foi acondicionado em sacos de polietileno, selados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente (28 ± 1 °C) por 60 dias.

2.4 Análise dos fermentos naturais liofilizados

2.4.1 Enumeração de células viáveis de BAL e leveduras e determinação de parâmetros físico-químicos durante o armazenamento

As células viáveis de BAL e levedura em fermento natural liofilizado [FNL + cepa/s (Controle (microbiota selvagem), Lpe129 (*L. pentosus* 129), Lf139 (*L. fermentum* 139) e Mix (co-cultura *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139)] foram enumerados em zero (imediatamente após a liofilização), 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento. Para a enumeração de células viáveis de BAL, 10 g de cada amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada estéril (0,1%, p/v), diluída em série (10⁻¹ - 10⁻⁶) e 20 µL de cada diluição foram inoculados em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cicloheximida (4 mg/100 mL, Sigma-Aldrich) usando a técnica de microgotas e incubadas (37 ± 0,5 °C) por 48 h. Os resultados foram expressos como log UFC/g. Para enumeração de células viáveis de levedura, 100 µL de cada diluição foram inoculados em ágar YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L e ágar 15 g/L) e incubados (28 ± 1 °C) por 72 h. Os resultados foram expressos como log UFC/g (Reale *et al.* , 2019).

O pH, a acidez titulável total (ATT), a atividade de água (a_w) e a umidade dos fermentos naturais liofilizados foram avaliados aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento. O pH e a ATT foram medidos em 10 g da amostra homogeneizada com 90 mL de água destilada. O pH foi medido utilizando um potenciômetro com eletrodo de vidro combinado para determinação de pH (modelo PHS-3E, Even, São Paulo, SP, Brasil). A ATT foi medida por titulação com NaOH 0,1 N e expressa em g/100 mL. A atividade de água (a_w) foi medida utilizando um medidor de atividade de água (Aqualab, Decagon Devices, EUA) em temperatura constante (24 ± 1 °C). A umidade foi determinada pelo método de dessecação direta, secando as amostras em estufa de circulação de ar (ACB Labor, São Paulo, SP, Brasil) a 105 °C até atingir peso constante (AOAC, 2016).

2.4.2 Quantificação de EPS

A quantificação de EPS no fermento natural liofilizado foi quantificada imediatamente após a liofilização de acordo com Galli, Venturi, Coda, Maina, & Granchi (2020) com pequenas modificações. 20 gramas de cada amostra foram diluídas com água destilada (1:2, v/v), a suspensão foi centrifugada (6600 rpm, 15 min, 24 °C), dois volumes de etanol frio foram adicionados ao sobrenadante e a amostra foi deixada em repouso a 4 °C por 24 horas. O precipitado foi coletado por centrifugação (4500 rpm, 20 min, 5 °C), o EPS foi dissolvido (1;2, v/v) em água destilada, dois volumes de etanol foram adicionados à suspensão e centrifugado (4500 rpm, 20 min, 5 °C). Por fim, os precipitados foram secos em estufa e a quantidade de EPS foi calculada pelo método gravimétrico (mg/g).

2.4.3 Determinação do estado fisiológico da microbiota do fermento natural

O estado fisiológico da microbiota nas amostras de fermento natural foi analisado imediatamente após a liofilização por meio de citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). Inicialmente, as amostras foram centrifugadas (6500 rpm, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS estéril. As análises de CFM foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo com laser de íon argônio emitindo a 488 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). O canal FL1 533 nm \pm 30 nm, coloração com diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) e canal FL3 >

670 nm, coloração com iodeto de propídio (PI) coletou a fluorescência verde e vermelha, respectivamente. Os níveis limite para aquisição de dados foram definidos no espalhamento direto (FSC) (12.000) e no espalhamento lateral (SSC) (30.000) para eliminar partículas muito menores que as células intactas e delimitar as células que compõe a microbiota do fermento, respectivamente.

A concentração de células (viáveis, injuriadas e mortas) no fermento natural fresco e liofilizado foi medida usando uma configuração de taxa de fluxo baixa, e um total de 10.000 eventos foram analisados. A compensação automática foi aplicada e a análise dos dados foi realizada utilizando o *software* BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company). Gráficos de densidade indicando FSC *versus* SSC foram utilizados para identificar a população microbiana de interesse. Outra região específica nos gráficos de densidade FL1 *versus* FL3 foi bloqueada para exibir os resultados da coloração. Quatro quadrantes (gates) foram definidos para compreender cada subpopulação celular com base nas leituras de fluorescência. Para a coloração dupla com PI e cFDA, as subpopulações celulares caracterizadas como PI-cFDA+ (upper left gate) foram consideradas células não permeabilizadas com atividade enzimática, enquanto PI+cFDA- (lower right gate) foram consideradas células permeabilizadas sem atividade enzimática (Araújo *et al.*, 2020; de Souza Pedrosa *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021).

2.4.4 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

Os teores de açúcares (frutose, glicose e maltose) e ácidos orgânicos (acético, cítrico, fórmico, láctico, málico e succínico) foram quantificados imediatamente após a liofilização dos fermentos naturais. Inicialmente, dois gramas de cada fermento natural liofilizado foram homogeneizados em 10 mL de água ultrapura (sistema MilliQ®, EMD Millipore, EUA) por 10 minutos utilizando um mini Turrax. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm, 15 min, 4 °C) e filtradas através de um filtro Millex-HA de 0,45 µm (Millipore Co., Bedford, MA). As análises foram realizadas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) com sistema de cromatografia Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA) acoplado a um detector de índice de refração (RID) e um detector de arranjo de diodos (DAD). Uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 × 300 mm, 8 µm) e 4 MH₂SO₄ em água ultrapura

foi usada como fase móvel (vazão de 0,5 mL/min). Os dados foram processados utilizando o *software* OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Curvas padrão e análises quantitativas foram realizadas para cada composto.

2.5 Produção dos pães

O preparo do pão foi baseado na formulação apresentada na Tabela 1. Inicialmente, 50 g de cada amostra de fermento natural liofilizado foram reativados por 24 h em uma mistura (1:1, v/p) de água potável (250 mL) e farinha de trigo (250 g). Em seguida, todos os ingredientes, exceto a manteiga, foram misturados em batedeira espiral (VAES25NR, Venâncio, RS, Brasil) por 5 minutos (velocidade 1). Uma vez parcialmente desenvolvida a rede de glúten, a manteiga foi adicionada à massa e misturada durante 5 minutos (velocidade 2). A massa foi deixada em descanso por 20 minutos a 22 ± 1 °C e após dividida em porções de 100 g e adicionadas em assadeira. A fermentação foi realizada em estufa a 31 ± 1 °C durante aproximadamente 3 h. O cozimento foi realizado a 180 °C por 20 minutos em forno turbo (Twister FVT5D, Venâncio, RS, Brasil). Posteriormente, os pães foram resfriados, identificados e armazenados em temperatura ambiente (28 ± 1 °C) para posterior teste.

Tabela 1. Protocolo para produção de pão com fermento natural liofilizado inoculo com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 e controle

Ingredientes	Formulação
	Pão
Farinha de trigo branca (**)	100g
Água potável	55 mL/100 g de **
Açúcar	4g/100g de **
Sal	1,5 g/100 g de **
Manteiga	2 g/100 g de **
Fermento natural liofilizado (reidratado)	40 g/100 g de **

Fonte: Stefanello et al. (2019) com modificações.

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no primeiro, terceiro e sexto dia pós-cozimento. Estudos de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizados no primeiro e terceiro dia após o cozimento. A digestibilidade *in vitro* da proteína e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram determinadas com amostras de pão imediatamente após o resfriamento (primeiro dia pós-cozimento).

2.6 Determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pães

O pH e a ATT foram medidos em 10 g de amostra de pão homogeneizada com 90 mL de água destilada. O pH foi determinado utilizando um potenciômetro (modelo PHS-3E, Even, São Paulo, Brasil). A ATT foi expressa em g/100 mL de NaOH 0,1 N. A umidade foi determinada pelo método de dessecação direta, secando as amostras em estufa de circulação de ar (ACB Labor, São Paulo, Brasil) a 105 °C até atingir peso constante (AOAC, 2016).

O volume específico do pão foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (*Panicum miliaceum L.*) e os resultados foram expressos em cm³/g (Mantzourani *et al.*, 2019). A cor do miolo do pão foi medida em três pontos do núcleo central das fatias usando um colorímetro (Chroma Meter CR-400C, Minolta, Osaka, Japão), medindo os parâmetros L*, a* e b* de acordo com o método de Hunter CIELab. (Stefanello *et al.*, 2019).

2.7 Determinação das propriedades de textura do pão

O perfil de textura foi determinado utilizando um Analisador de Textura CT3 (Brookfield, Middleborough, EUA) equipado com uma sonda de compressão cilíndrica de 25 mm de diâmetro. Os pães foram cortados em fatias de 1,5 cm, 3 cm de altura e largura, e foram analisados nas seguintes condições: velocidade pré-teste 5,0 mm/s, velocidade teste 1 mm/s, velocidade pós-teste 5,0 mm/s, compressão de 30%, força automática do tipo gatilho 5 g e tempo de espera entre o primeiro e o segundo ciclo de compressão de 5 segundos. Os parâmetros de textura avaliados foram dureza, mastigabilidade e elasticidade (Yildirim & Arici, 2019).

2.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e determinação da digestibilidade *in vitro* do pão

2.8.1 DSC

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada conforme descrito por Torrieri, Pepe, Ventrino, Masi, & Cavella (2014). A análise foi realizada simultaneamente utilizando equipamento SHIMADZU previamente calibrado (modelo

HMV-2T). Dez mg de cada amostra de pão foram colocadas em uma panela de alumínio sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e aquecidos a uma taxa de 10 °C/min desde a temperatura ambiente até 400 °C. Os parâmetros analisados foram temperatura inicial (T₀), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_f) e entalpia (ΔH , Jg⁻¹) do amido retrogradado.

2.8.1 DIVP (%)

A digestibilidade *in vitro* da proteína (DIVP) do pão foi determinada de acordo com Mahmoud *et al.* (2016). Um grama de cada amostra foi incubado com 1,5 mg de pepsina em 15 mL de HCl 0,1 M a 37°C por 3 h. Após neutralização com NaOH 2 M e adição de 4 mg de pancreatina em 7,5 mL de PBS (pH 8,0), foi adicionado 1 mL de tolueno para evitar o crescimento microbiano e a solução foi incubada por 24 horas a 37 °C. Após 24 h, a enzima foi inativada pela adição de 10 mL de ácido tricloroacético (20%, p/v) e a proteína não digerida foi precipitada. O volume foi completado para 100 mL com água destilada e a mistura foi centrifugada (5000 rpm, 20 min). A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando o valor encontrado na amostra antes da digestão (branco) e a equação fornecida para cálculo da DIVP.

2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em pão

Microscopia eletrônica de varredura (TESCAN Vega modelo 4, República Tcheca) foi utilizada para examinar a microestrutura do miolo do pão. As amostras de pães foram cortadas em fatias de 5 mm e revestidas com uma camada ultrafina de ouro para análise. A estrutura da massa fermentada foi observada por MEV em diferentes ampliações usando uma tensão de aceleração de 5 a 20 kV (Coțovanu & Mironeasa, 2022).

2.10 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A

normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Diferenças significativas foram determinadas ($p < 0,05$) por meio da ANOVA seguida de teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa XLSTAT versão 2019.2.2.5964 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3. Resultados e discussão

3.1 Enumeração de células viáveis de BAL e leveduras e parâmetros físico-químicos durante o armazenamento

A Tabela 2 apresenta as contagens de células viáveis de BAL e leveduras (log UFC/g) em amostras de fermento natural antes da liofilização e durante 60 dias de armazenamento. As contagens de células viáveis de bactérias lácticas variaram de $9,08 \pm 0,01$ a $8,72 \pm 0,03$ log UFC/g antes da liofilização, enquanto variaram entre $8,77 \pm 0,04$ e $6,70 \pm 0,02$ log UFC/g após a liofilização e durante os 60 dias de armazenamento. A contagem de células viáveis de levedura nas amostras de fermento natural antes da liofilização variaram de $7,35 \pm 0,02$ a $7,22 \pm 0,05$ log UFC/g, e após liofilização obteve valores que variaram de $7,20 \pm 0,04$ a $5,00 \pm 0,03$ log UFC/g durante os 60 dias de armazenamento.

Tabela 2. Contagens de células viáveis de BAL e leveduras (log UFC/g) em fermento natural liofilizado (FNL) durante 60 dias de armazenamento a 28°C.

Amostras	BAL (UFC/g)					
	**	Armazenamento (Dias)				
		0	15	30	45	60
Controle	8.72 $\pm 0.03^c$	8.64 $\pm 0.04^{Ab}$	8.29 $\pm 0.02^{Ba}$	8.17 $\pm 0.03^{Ca}$	8.10 $\pm 0.05^{Ca}$	7.81 $\pm 0.16^{Da}$
Lp 129	8.90 $\pm 0.08^b$	8.62 $\pm 0.01^{Ab}$	7.44 $\pm 0.06^{Bc}$	7.65 $\pm 0.07^{Cc}$	6.85 $\pm 0.18^{Dc}$	6.70 $\pm 0.02^{Dc}$
Lf 139	9.08 $\pm 0.01^a$	8.50 $\pm 0.03^{Ac}$	8.22 $\pm 0.10^{Ba}$	8.02 $\pm 0.03^{Cb}$	8.07 $\pm 0.04^{Ca}$	7.70 $\pm 0.06^{Da}$
Mix	8.97 $\pm 0.13^{ab}$	8.77 $\pm 0.04^{Aa}$	8.08 $\pm 0.03^{Bb}$	7.95 $\pm 0.07^{Cb}$	7.84 $\pm 0.04^{Cb}$	7.33 $\pm 0.21^{Db}$

Amostras	Leveduras (UFC/g)					
	**	Armazenamento (Dias)				
		0	15	30	45	60
Controle	7.29 $\pm 0.02^{bc}$	7.16 $\pm 0.03^{Ab}$	7.12 $\pm 0.01^{Ab}$	7.08 $\pm 0.08^{ABb}$	7.04 $\pm 0.03^{Bd}$	6.99 $\pm 0.05^{Ba}$
Lp 129	7.34 $\pm 0.04^{ab}$	7.18 $\pm 0.08^{Ac}$	6.72 $\pm 0.04^{Bc}$	5.95 $\pm 0.02^{Cc}$	5.48 $\pm 0.04^{Dc}$	5.00 $\pm 0.03^{Ed}$
Lf 139	7.35 $\pm 0.02^a$	7.20 $\pm 0.04^{Aa}$	6.76 $\pm 0.12^{Ba}$	6.18 $\pm 0.15^{Ca}$	5.95 $\pm 0.05^{Da}$	5.30 $\pm 0.02^{Ec}$
Mix	7.22 $\pm 0.05^c$	7.17 $\pm 0.02^{Ad}$	7.09 $\pm 0.06^{Ad}$	6.73 $\pm 0.08^{Bd}$	6.59 $\pm 0.03^{Cb}$	6.23 $\pm 0.01^{Dd}$

^{a-d} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-E} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1)
 ** log UFC/g antes da liofilização.

A contagem de células viáveis de BAL nas amostras em amostras de fermento natural imediatamente após a liofilização ficou entre 8 – 9 log UFC/g. No entanto, todas as amostras de fermento natural liofilizados tiveram uma redução de

aproximadamente 1 log UFC/g ao final dos 60 dias de armazenamento. A contagem de células viáveis de leveduras ficou entre 8 – 7 log UFC/g após a liofilização. Da mesma forma, as contagens de células viáveis de levedura foram reduzidas em 1 – 2 log UFC/g nos fermentos naturais liofilizados após 60 dias de armazenamento.

Investigações anteriores também relataram reduções nas contagens de células viáveis de BAL e leveduras após a liofilização, provavelmente ligadas ao estresse térmico celular causado por processos de congelamento e desidratação (Stefanello *et al.*, 2018), que causam danos à membrana celular e comprometem a viabilidade celular de bactérias e leveduras. Entretanto, o uso de crioprotetores pode ter reduzido esses danos.

Um estudo inicial relatou reduções de aproximadamente 3 e 2 log UFC/g nas contagens de BAL e leveduras, respectivamente, em fermento natural após liofilização sem o uso de crioprotetor (Reale *et al.*, 2019). Caglar *et al.* (2021) compararam duas formas de secagem utilizadas em massa fermentada e identificaram que a liofilização foi mais eficiente quando comparada à secagem por pulverização (spray-drying) e que ainda obteve uma contagem de células viáveis de BAL de $8,0 \pm 0,6$ UFC/g como a obtida neste estudo até o trigésimo dia de armazenamento.

O FNL Mix (co-cultura das cepas *Lactiplantibacillus pentosus* 129 e *Limosilactobacillus fermentum* 139) juntamente com o FNL Controle (microbiota selvagem) e o FNL Lf139 (*L. fermentum* 139) mantiveram ao longo dos 60 dias de armazenamento contagens de bactérias lácticas superiores a 7 log UFC/g. Por outro lado, houve uma diminuição a partir de 45° nas contagens de BAL do FNL Lpe129 (*L. pentosus* 129) com valores abaixo de 7 log UFC/g.

Em comparação com a contagem de BAL, a menor contagem de leveduras em todas as massas fermentadas testadas já foi evidenciada por outros estudos (Reale *et al.*, 2019; Lattanzi *et al.*, 2014). As leveduras parecem ser mais sensíveis ao estresse causado pelas mudanças de temperatura. O estudo de Lattanzi *et al.* (2014) destaca que não só na massa fermentada desidratada, mas também naquelas mantidas refrigeradas ou congeladas, a sensibilidade das leveduras é maior que a das bactérias, e a contagem foi inferior à observada neste estudo.

A viabilidade das BAL e das leveduras durante o armazenamento é essencial para a aplicação desses fermentos liofilizados na fermentação de massas para a produção de pães. Mesmo com reduções de 1 ou 2 log UFC/g após 60 dias de

armazenamento, o protocolo de produção utilizado permitiu contagens que tornam esta massa fermentada metabolicamente ativa quando reidratada. Pode ser considerado um agente de fermentação e não apenas um agregador de sabor como a maioria das massas fermentadas desidratadas disponíveis no mercado são. (Sanchez-Adriá *et al.*, 2023).

A Tabela 3 apresenta os resultados da caracterização físico-química de pH, acidez titulável, umidade e atividade de água dos fermentos naturais liofilizados durante o período de armazenamento. Após 60 dias de armazenamento, os valores de pH variaram de $3,90 \pm 0,01$ a $4,06 \pm 0,03$. Caglar *et al.* (2021), em estudos recentes com fermento desidratado em pó produzida por diferentes métodos de secagem (pulverização, liofilização, estufa), obtiveram valores de pH entre $3,54 \pm 0,00$ e $3,79 \pm 0,00$, e Gul *et al.* (2020) $3,71 \pm 0,02$ a 4°C .

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio padrão) de fermento natural liofilizado inoculada ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 durante 60 dias de armazenamento ($28 \pm 1^\circ\text{C}$).

Parâmetros	Armazenamento (Dias)	Fermento Natural Liofilizado (FNL)			
		Controle	Lpe129	Lf139	Mix
pH	0	$3.94 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$3.90 \pm 0.01^{\text{Cd}}$	$4.02 \pm 0.03^{\text{Ab}}$	$4.02 \pm 0.02^{\text{Ab}}$
	15	$3.98 \pm 0.02^{\text{Bb}}$	$3.96 \pm 0.02^{\text{Bb}}$	$4.04 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$4.03 \pm 0.01^{\text{Ab}}$
	30	$3.98 \pm 0.02^{\text{Bb}}$	$3.98 \pm 0.01^{\text{Bb}}$	$4.03 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$4.02 \pm 0.02^{\text{ABb}}$
	45	$4.04 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$4.00 \pm 0.04^{\text{Aab}}$	$4.06 \pm 0.03^{\text{Aab}}$	$4.05 \pm 0.03^{\text{Aab}}$
	60	$4.05 \pm 0.04^{\text{Aab}}$	$3.93 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$4.03 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$4.02 \pm 0.01^{\text{Ab}}$
ATT (mL NaOH/10g)	0	$6.07 \pm 0.15^{\text{Bab}}$	$6.68 \pm 0.35^{\text{Aa}}$	$6.30 \pm 0.21^{\text{ABa}}$	$6.24 \pm 0.36^{\text{ABa}}$
	15	$5.84 \pm 0.17^{\text{ABc}}$	$6.09 \pm 0.07^{\text{Ab}}$	$5.15 \pm 0.20^{\text{Cc}}$	$5.31 \pm 0.15^{\text{Cb}}$
	30	$6.01 \pm 0.11^{\text{Ac}}$	$6.09 \pm 0.21^{\text{Ac}}$	$5.21 \pm 0.25^{\text{Bbc}}$	$6.17 \pm 0.25^{\text{Aa}}$
	45	$6.30 \pm 0.15^{\text{Aa}}$	$5.25 \pm 0.14^{\text{Cd}}$	$5.48 \pm 0.06^{\text{Bb}}$	$6.30 \pm 0.15^{\text{Aa}}$
	60	$5.91 \pm 0.25^{\text{Aabc}}$	$5.71 \pm 0.25^{\text{ABc}}$	$5.15 \pm 0.30^{\text{Cbc}}$	$5.54 \pm 0.36^{\text{ABCb}}$
Umidade (%)	0	$3.81 \pm 0.03^{\text{Cc}}$	$4.53 \pm 0.09^{\text{Bd}}$	$3.66 \pm 0.04^{\text{Dd}}$	$4.68 \pm 0.01^{\text{Ad}}$
	15	$4.19 \pm 0.04^{\text{Cb}}$	$4.62 \pm 0.06^{\text{Dd}}$	$4.95 \pm 0.07^{\text{Ac}}$	$4.77 \pm 0.06^{\text{Bc}}$
	30	$4.41 \pm 0.20^{\text{Db}}$	$5.21 \pm 0.04^{\text{Bc}}$	$5.08 \pm 0.06^{\text{Cc}}$	$5.93 \pm 0.07^{\text{Ab}}$
	45	$5.07 \pm 0.07^{\text{Da}}$	$7.12 \pm 0.14^{\text{Ab}}$	$5.91 \pm 0.02^{\text{Cb}}$	$6.08 \pm 0.10^{\text{Bb}}$
	60	$5.16 \pm 0.04^{\text{Ca}}$	$7.96 \pm 0.06^{\text{Aa}}$	$6.67 \pm 0.14^{\text{Ba}}$	$6.70 \pm 0.12^{\text{Ba}}$
a_w	0	$0.18 \pm 0.00^{\text{Cc}}$	$0.23 \pm 0.02^{\text{Be}}$	$0.26 \pm 0.02^{\text{Ae}}$	$0.24 \pm 0.01^{\text{Bd}}$
	15	$0.19 \pm 0.02^{\text{Dbc}}$	$0.30 \pm 0.01^{\text{Bd}}$	$0.28 \pm 0.01^{\text{Cd}}$	$0.36 \pm 0.01^{\text{Ac}}$
	30	$0.20 \pm 0.01^{\text{Cb}}$	$0.37 \pm 0.00^{\text{Ac}}$	$0.36 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$0.37 \pm 0.01^{\text{ABbc}}$
	45	$0.21 \pm 0.01^{\text{Cb}}$	$0.48 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.38 \pm 0.00^{\text{Bb}}$	$0.38 \pm 0.01^{\text{Bb}}$
	60	$0.33 \pm 0.00^{\text{Ca}}$	$0.45 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$0.42 \pm 0.01^{\text{Ba}}$	$0.40 \pm 0.00^{\text{Ba}}$

^{a-d} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1)

A ATT dos fermentos liofilizados variaram de $5,15 \pm 0,01$ a $6,30 \pm 0,21$ mL/10g durante o armazenamento. Em seu estudo com fermento natural liofilizado com *L. paracasei* e *L. bulgaricus*, Mantzourani *et al.* (2019) encontraram valores de acidez titulável ligeiramente superiores aos encontrados neste estudo, que variaram de 7,10

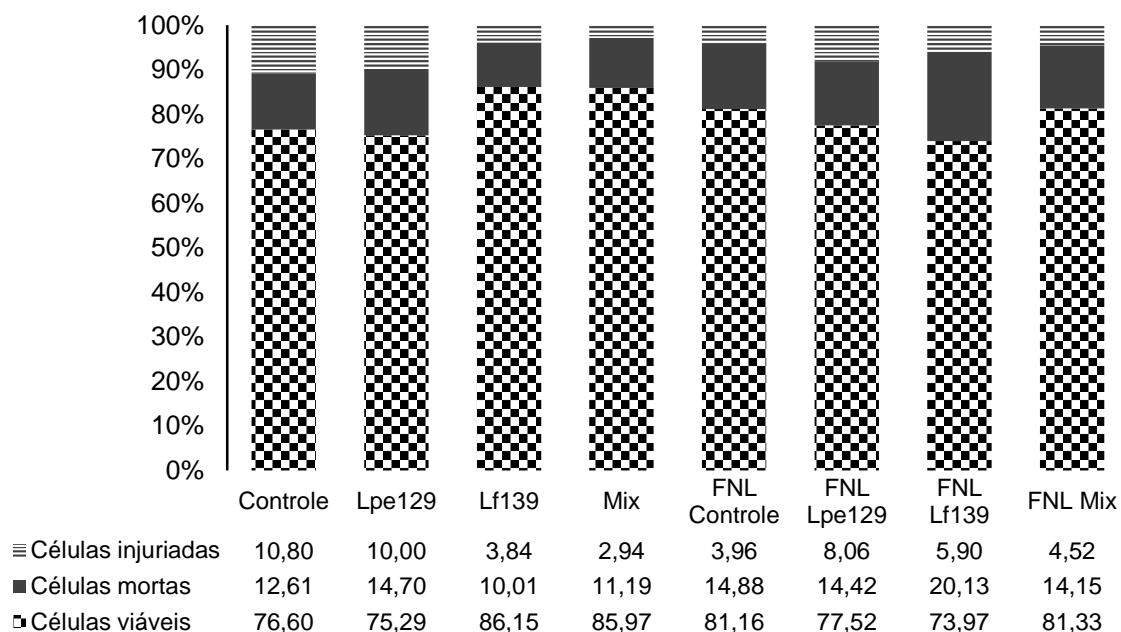
$\pm 0,10$ a $8,67 \pm 0,11$ mL. Os ácidos orgânicos (acético, láctico, succínico e málico) produzidos pelas BAL reduzem significativamente o pH e aumentam a acidez (Rossel, 2016).

A umidade dos fermentos liofilizados variaram de $3,66 \pm 0,04$ a $7,96 \pm 0,06$ % durante o armazenamento de 60 dias. O aumento da umidade ao longo do tempo é esperado para produtos secos; entretanto, segundo Bhandari *et al.* (2013), produtos em pó com umidade entre 2 e 8% são considerados seguros para o não desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Durante o armazenamento, os valores encontrados para atividade de água (a_w) nos fermentos liofilizados variaram de $0,18 \pm 0,00$ a $0,48 \pm 0,02$. Segundo os autores Prabhakar & Mallika (2014), o principal objetivo da secagem de alimentos é garantir maior estabilidade ao produto que evite o crescimento de microrganismos, reduzindo sua umidade. Segundo os autores, alimentos secos que apresentam atividade de água abaixo de 0,60 são microbiologicamente estáveis e seguros (Prabhakar & Mallika, 2014). As variações na umidade e na atividade de água entre os fermentos naturais liofilizados não estão relacionadas ao tipo de microrganismo inoculado. Entretanto, o método de armazenamento foi realizado sem controle de umidade.

3.2 Estado fisiológico da microbiota de fermento natural

O tamanho das populações de células microbianas com diferentes estados fisiológicos (viáveis, injuriadas e mortas) nos fermentos naturais antes e depois da liofilização é mostrado na Figura 1. As populações de células microbianas vivas foram superiores a 70% em todas as amostras de fermento natural após a liofilização. Entre as amostras de fermento natural fresca (antes da liofilização), a maior (>) população de células microbianas viáveis observada foi encontrada em Lf139 > Mix > Controle > Lpe129. Imediatamente após a liofilização, a maior população de células microbianas viáveis foi encontrada em FNL Mix > FNL Controle > FNL Lpe129 > FNL Lf139.

Figura 1. Estado fisiológico das células (viáveis, mortas e injuriadas) da microbiota em massa fermentada fresca antes e depois do processo de liofilização.



As populações de células microbianas mortas e danificadas nos fermentos frescos foram menores em Lf139 (10,01 - 3,84%) e Mix (11,19 - 2,94%), respectivamente. Após a liofilização, as maiores populações de células microbianas injuriadas foram encontradas em FNL Lf139 e FNL Lp129. As altas populações de células lesionadas em FNL Lp129 podem estar associadas às menores contagens de células viáveis de BAL e leveduras encontradas ao fim dos 60 dias de armazenamento, uma vez que membranas danificadas podem comprometer as funções e a sobrevivência de células bacterianas e de levedura. Mesmo com essas reduções, o fermento liofilizado quando reidratado poderá ser novamente metabolicamente ativo (Lattanzi *et al.*, 2014; Reale *et al.*, 2019).

3.3 Quantificação de EPS e conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos em fermento natural liofilizado

O teor de EPS nos fermentos liofilizados (Tabela 4) variaram de $0,22 \pm 0,08$ a $0,33 \pm 0,13$ mg/L (FNL Controle = $0,27 \pm 0,1$ mg/L; FNL Lpe129 = $0,29 \pm 0,10$ mg/L; FNL Lf139 = $0,33 \pm 0,13$ mg/L; FNL Mix = $0,22 \pm 0,08$ mg/L). A presença de EPS nos fermentos liofilizados favorece a textura, a umidade, a formação da rede de glúten, o

volume específico e as características de envelhecimento do pão (Sánchez *et al.*, 2006; Kaditzky *et al.*, 2008; Katina *et al.*, 2009; Lynch, Coffey, & Arendt, 2018). Especialmente, o FNL Lf139 apresentou um teor de EPS mais elevado quando comparado com os outros fermentos liofilizados, o que pode estar ligado à capacidade superior relatada de *L. fermentum* 139 de produzir EPS (de Albuquerque *et al.*, 2018).

Tabela 4. Conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos em fermento natural liofilizado inoculada ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139

Parâmetros	Fermento Natural Liofilizado (FNL)			
	Controle	Lpe129	Lfe139	Mix
EPS (mg/L)	0.27 ± 0.12 ^A	0.29 ± 0.10 ^A	0.33 ± 0.13 ^A	0.22 ± 0.08 ^A
Açúcares (mg/L)	Frutose	3.58 ± 0.12 ^B	3.04 ± 0.09 ^C	5.30 ± 0.17 ^A
	Glicose	3.90 ± 0.16 ^A	3.31 ± 0.11 ^B	1.20 ± 0.09 ^C
	Maltose	n.d.	n.d.	0.61 ± 0.11 ^A
Ácidos orgânicos (mg/L)	Acético	0.01 ± 0.02 ^A	0.01 ± 0.01 ^A	0.02 ± 0.01 ^A
	Cítrico	0.08 ± 0.02 ^A	0.07 ± 0.01 ^A	0.02 ± 0.04 ^A
	Fórmico	0.07 ± 0.03 ^A	0.04 ± 0.02 ^{AB}	0.02 ± 0.02 ^{AB}
	Lático	0.12 ± 0.19 ^C	0.22 ± 0.07 ^C	0.70 ± 0.13 ^A
	Málico	0.22 ± 0.13 ^A	0.19 ± 0.10 ^A	n.d.
	Succínico	1.43 ± 0.25 ^A	0.30 ± 0.16 ^B	0.03 ± 0.09 ^C

^{a-d} Em coluna, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-C} Em linha, média ± desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1). n.d. não detectado

As contagens mais altas de BAL no FNL Lf139 poderiam estar associadas a uma maior concentração de EPS nessas massas fermentadas ($0,33 \pm 0,13$ mg/L). Kong *et al.* (2022) identificaram associação entre síntese de EPS e maior resistência celular ao estresse causado pelo processo de liofilização de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, com melhora na viabilidade celular à medida que a concentração de EPS foi maior identificou associação entre síntese de EPS e maior resistência celular ao estresse causado por o processo de liofilização de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, com melhora na viabilidade celular à medida que a concentração de EPS foi maior.

O conteúdo de açúcares em amostras de fermento natural liofilizadas é mostrado na Tabela 4. O teor de frutose variou de $5,30 \pm 0,12$ a $0,51 \pm 0,13$ mg/L, e o conteúdo de glicose variou de $0,27 \pm 0,10$ a $3,90 \pm 0,16$ mg/L em amostras de fermento natural. Os teores de glicose e frutose não diferiram entre as diferentes amostras de fermento natural ($p < 0,05$). Os teores de maltose não diferiram ($p < 0,05$) entre FNL Lf139 e FNL Mix, mas ficaram abaixo do limite de detecção em FNL Controle e FNL Lp129. A detecção de maltose em FNL Lf139 e FNL Mix assume que ambas as cepas

têm a incapacidade de fermentar maltose em comparação com FNL Controle e FNL Lpe129 (bactérias lácticas maltose-positivo) (Korcari *et al.*, 2021).

Curiosamente, FNL Lf139 e FNL Mix apresentaram menores teores de glicose e maiores teores de maltose. Isto pode estar associado ao fato de que algumas BAL heterofermentativas sintetizam a enzima maltose fosforilase quando bem adaptadas à massa fermentada. Esta enzima permite decompor a maltose, que é a fonte de energia mais abundante nas farinhas, em glicose e glicose 1-P sem utilizar ATP. Além disso, a excreção de glicose não fosforilada induz a repressão da glicose em outros microrganismos presentes no ecossistema da massa fermentada, impedindo a competição pela maltose (Gänzle *et al.*, 2007, Gobbetti, De Angelis, Corsetti, & Di Cagno, 2005, Stolz, Hammes e Vogel, 1996). A utilização de aceptores de elétrons alternativos encontrados na massa, como a frutose, também proporciona vantagem energética, uma vez que ela é reduzida a manitol, favorecendo a produção de acetato e ATP concomitantemente (De Vuyst, Comasio & Kerrebroeck, 2021; Gobbetti *et al.*, 2005; Vranken, Rimaux, De Vuyst e Leroy, 2008).

O teor de ácido acético foi baixo em todas as amostras de fermento natural liofilizado ($0,01 \pm 0,02$ a $0,02 \pm 0,01$ mg/L). O teor de ácido láctico variou de $0,12 \pm 0,19$ a $0,70 \pm 0,13$ mg/L entre as amostras de fermentos liofilizados. FNL Lf139 e FNL Mix tiveram comportamento diferente das demais amostras de fermento natural, com maiores teores de ácido láctico do que os demais ácidos orgânicos medidos, o que pode estar associado a uma atividade metabólica mais intensa da cepa *L. fermentum* 139 presente em ambos os fermentos naturais liofilizados. Um estudo inicial relatou maiores teores de ácido láctico em fermento natural inoculada com BAL heterofermentativas quando comparada com fermento natural inoculado apenas com monocultura de levedura (Carbonetto *et al.*, 2020).

A não detecção de ácido málico nos fermentos liofilizados Lf139 e Mix indicam que sua degradação pode ter sido convertida em ácido láctico, que foi identificado em todos os fermentos, porém em maior concentração nos fermentos inoculados com *L. fermentum* 139 (García, Rendueles, & Díaz, 2019). O ácido succínico foi encontrado em todas as amostras de fermento natural liofilizadas ($0,03 \pm 0,09$ a $1,67 \pm 0,22$ g/L). Os menores teores de ácido succínico foram encontrados em FNL Lpe129 e FNL Lf139. Esses resultados podem estar ligados à presença de *L. pentosus* e *L. fermentum* nessas amostras, uma vez que o fermento natural liofilizado inoculado com

monocultura heterofermentativa de BAL apresentou teores mais baixos do que o FNL Mix. A presença de ácidos orgânicos em amostras de fermento natural liofilizadas é um importante indicativo da contribuição destes compostos no desenvolvimento do sabor e acidificação de pães de longa fermentação.

3.5 Caracterização da qualidade dos pães de longa fermentação

3.5.1 pH, ATT, umidade (%) e volume específico

Os valores dos parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável total (ATT) e umidade %) e do volume específico (V.E) dos pães elaborados com os fermentos naturais liofilizados durante o armazenamento de seis dias são apresentados na Tabela 5. Os valores de pH e ATT variaram de $4,43 \pm 0,06$ a $4,32 \pm 0,01$ e $3,43 \pm 0,15$ a $2,71 \pm 0,15$ mL/10g, respectivamente. Em geral, o pH dos pães apresentou ligeira variação durante o armazenamento. Alimentos com pH abaixo de 4,5 constituem um ambiente ácido, sendo um fator limitante para o crescimento e sobrevivência de espécies de fungos deteriorantes.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio padrão) de pães elaborados com fermento natural inoculado ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 durante seis dias de armazenamento (28 ± 1 °C).

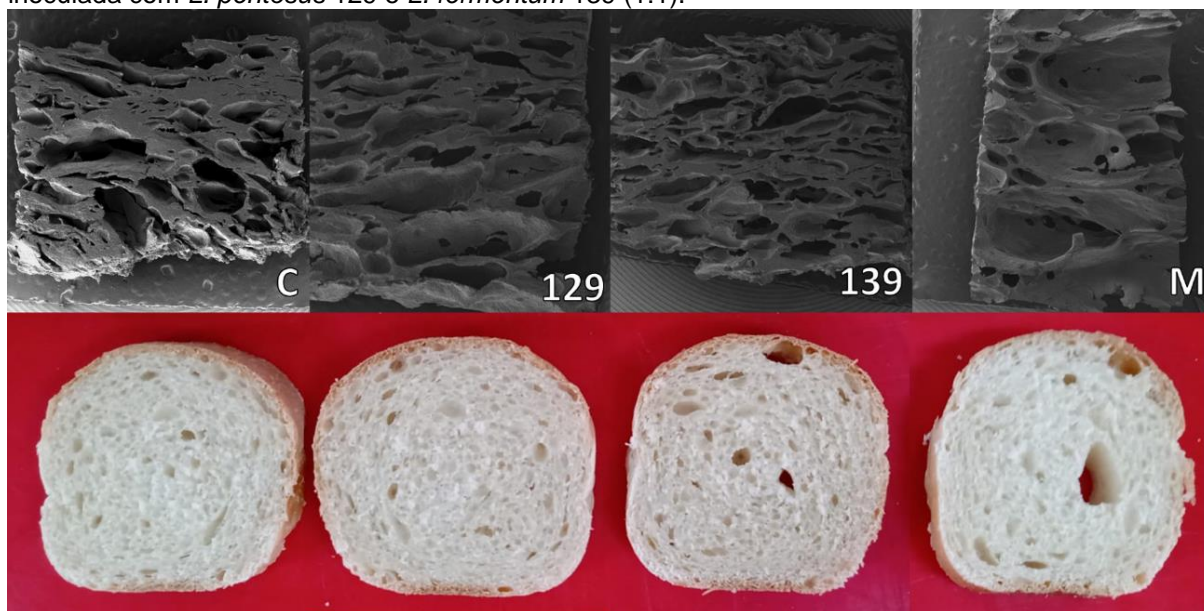
Parâmetros	Armazenamento (Dias)	Pão			
		Controle	Lpe129	Lf139	Mix
pH	0	4.43 ± 0.06^{ABa}	4.40 ± 0.00^{Ba}	4.40 ± 0.00^{Ba}	4.40 ± 0.00^{Ba}
	3	4.38 ± 0.02^{Aa}	4.38 ± 0.01^{Ab}	4.39 ± 0.03^{Aa}	4.32 ± 0.03^{Bb}
	6	4.40 ± 0.00^{Aa}	4.40 ± 0.00^{Aa}	4.40 ± 0.00^{Aa}	4.40 ± 0.00^{Aa}
ATT (mL NaOH/10g)	0	2.90 ± 0.21^{Ba}	3.32 ± 0.49^{Aba}	3.43 ± 0.15^{Aa}	3.30 ± 0.46^{Aba}
	3	2.90 ± 0.30^{Aa}	2.92 ± 0.07^{Ab}	2.97 ± 0.10^{Ab}	3.14 ± 0.21^{Aa}
	6	2.74 ± 0.06^{Bb}	2.87 ± 0.20^{ABb}	2.71 ± 0.15^{Bc}	2.97 ± 0.10^{Ab}
Umidade (%)	0	37.02 ± 0.80^{Aa}	34.60 ± 0.27^{Ba}	37.79 ± 0.72^{Aa}	34.68 ± 0.34^{Ba}
	3	33.90 ± 0.19^{Ab}	33.00 ± 0.27^{Cb}	33.29 ± 0.09^{BCb}	33.42 ± 0.06^{Bb}
	6	29.52 ± 0.84^{BCc}	29.66 ± 0.45^{BCc}	33.19 ± 0.13^{Ab}	28.96 ± 0.83^{Cc}
V.E	0	2.94 ± 0.08^{Ba}	2.82 ± 0.08^{Ba}	3.22 ± 0.16^{Aa}	3.24 ± 0.08^{Aa}
	3	2.85 ± 0.08^{Bab}	2.79 ± 0.16^{Bb}	3.12 ± 0.04^{Ab}	3.11 ± 0.20^{ABb}
	6	2.82 ± 0.02^{Bb}	2.65 ± 0.14^{Cb}	2.99 ± 0.08^{Ab}	2.98 ± 0.29^{ABb}

^{a-d} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-C} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1)

O teor de umidade nas amostras de pães variou de $37,79 \pm 0,72$ a $28,96 \pm 0,83\%$ ao final do armazenamento de seis dias, sendo constatada redução no teor de umidade, exceto para o pão Lf139. Durante o envelhecimento do pão, a água livre tende a migrar do miolo para a casca e da casca para o meio ambiente, reduzindo o teor de umidade do pão.

O volume específico dos pães indica a capacidade de expansão da massa durante o processo de levedação e cozimento. Os valores de V.E variaram de $3,24 \pm 0,08$ a $2,65 \pm 0,14 \text{ cm}^3/\text{g}$ entre as amostras de pão. A redução na umidade e no volume do pão é esperada durante o armazenamento. A perda de umidade e o encolhimento causados pela retrogradação do amido podem reduzir o volume do pão durante o envelhecimento. Foi encontrado maior volume específico para o pão Lf139 e pão Mix, o que pode ser causado por uma maior atividade proteolítica que fortaleceu a rede de glúten na massa das duas amostras, resultando em maior extensibilidade e aumento de volume nos pães (Caglar *et al.*, 2021).

Figura 2. Imagens de micrografias eletrônicas de varredura (MEV) e fatias de pão obtidas de pão fermentado produzido com massa fermentada liofilizada. C: Controle do pão (microbiota selvagem); 129: Pão com massa fermentada liofilizada inoculada com *L. pentosus* 129; 139: Pão com massa fermentada liofilizada inoculada com *L. fermentum* 139; M: Pão com massa fermentada liofilizada inoculada com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1).



Fonte: Dados da pesquisa

A MEV do pão Mix mostra alvéolos bem desenvolvidos e uma fatia com massa mais aerada (Fig. 2 - M). Por outro lado, a micrografia do pão Controle (Fig. 2 - C) aponta um pão com estrutura de massa densa e uma fatia com núcleo mais fechado. Apesar do baixo volume específico e da micrografia apresentar uma estrutura em favo

de mel, a fatia do pão Lpe129 (Fig. 2 - 129) apresenta uma estrutura semelhante à do pão Controle. Em contrapartida, a micrografia do pão Lf139 (Fig. 2 - 139) e sua respectiva fatia é globalmente semelhante à do pão Mix, que apresentou maior volume específico.

3.5.2 Cor do miolo

Os resultados dos parâmetros de cor dos miolos dos pães produzidos com os fermentos liofilizados durante o armazenamento são apresentados na Tabela 6. Os valores variaram de $76,65 \pm 0,84$ a $80,60 \pm 0,13$ para o parâmetro L^* , de $0,35 \pm 0,05$ a $0,68 \pm 0,01$ para o parâmetro a^* e de $14,40 \pm 0,57$ a $16,38 \pm 0,87$ para o parâmetro b^* .

Tabela 6. Parâmetros de cor (L^* a^* b^* , média \pm desvio padrão) em pães elaborados com fermento natural liofilizado inoculado ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 durante seis dias de armazenamento ($28 \pm 1^\circ\text{C}$)

		Cor do miolo do pão (L^* a^* b^*)			
Armazenamento (Dias)		Controle	Lpe129	Lf139	Mix
0		76.63 ± 0.84^{Aa}	77.94 ± 0.74^{Aa}	77.93 ± 0.31^{Ab}	79.44 ± 0.27^{Ab}
3	L^*	78.56 ± 0.90^{BCa}	77.41 ± 0.41^{Ca}	79.59 ± 0.75^{Ba}	80.60 ± 0.13^{Aa}
6		76.88 ± 0.70^{Ca}	78.12 ± 0.53^{Ba}	79.82 ± 0.78^{Aa}	79.77 ± 0.32^{Ab}
0		0.61 ± 0.06^{ABa}	0.54 ± 0.08^{Ba}	0.68 ± 0.01^{Aa}	0.35 ± 0.05^{Cc}
3	a^*	0.56 ± 0.08^{Aa}	0.51 ± 0.12^{Aa}	0.55 ± 0.01^{Ab}	0.45 ± 0.13^{Abc}
6		0.52 ± 0.11^{BCa}	0.44 ± 0.11^{BCa}	0.46 ± 0.07^{Cc}	0.60 ± 0.05^{ABab}
0		14.71 ± 0.41^{Bc}	14.40 ± 0.57^{Ba}	16.38 ± 0.87^{Aa}	15.90 ± 0.14^{Aa}
3	b^*	16.23 ± 0.64^{Aa}	14.98 ± 0.28^{Ca}	15.53 ± 0.33^{Bb}	15.42 ± 0.18^{Bb}
6		15.03 ± 0.17^{Bb}	15.54 ± 0.91^{ABCa}	14.66 ± 0.29^{Cc}	15.74 ± 0.23^{Aab}

^{a-c} Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-D} Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1)

No sexto dia de armazenamento, as amostras apresentaram diminuição nos valores de L^* , exceto para o pão Lf 139. As variações nos valores de a^* provavelmente não estiveram relacionadas ao tipo de fermento natural utilizada na formulação do pão, uma vez que esses valores foram próximos de zero. O parâmetro b^* está associado ao miolo levemente amarelado, característica comum em pães preparados com processos de mistura que promovem baixa oxidação dos pigmentos carotenoides da farinha de trigo (Antononi *et al.*, 2019), o que provavelmente não foi afetado pelo tipo de fermento natural usado para produzir o pão.

3.6 Propriedades da textura do pão

Os resultados dos parâmetros de textura dureza (D), elasticidade (E) e mastigabilidade (M) dos pães elaborado com fermentos liofilizados durante seis dias de armazenamento são apresentados na Tabela 7. Os valores de dureza variaram de $2,36 \pm 0,16$ a $13,22 \pm 0,56$ N, para a elasticidade, os valores variaram de $0,21 \pm 0,03$ a $0,45 \pm 0,02$ e para a mastigabilidade variaram de $1,50 \pm 0,07$ a $5,33 \pm 0,33$ nas amostras de pães.

Tabela 7. Parâmetros de textura [dureza (H), elasticidade (E) e mastigabilidade (C)] de pães elaborados fermento natural liofilizado inoculado ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 durante seis dias de armazenamento ($28 \pm 1^\circ\text{C}$)

Armazenamento (Dias)	Parâmetros	Pão			
		Controle	Lpe129	Lf139	Mix
0	D (N)	$3.68 \pm 0.28^{\text{Ac}}$	$3.61 \pm 0.22^{\text{Ac}}$	$2.36 \pm 0.16^{\text{Cc}}$	$2.89 \pm 0.32^{\text{Bc}}$
3		$8.40 \pm 0.27^{\text{Bb}}$	$9.56 \pm 0.25^{\text{Ab}}$	$5.29 \pm 0.16^{\text{Cb}}$	$5.61 \pm 0.37^{\text{Cb}}$
6		$13.22 \pm 0.56^{\text{Aa}}$	$13.16 \pm 0.29^{\text{Aa}}$	$10.33 \pm 0.47^{\text{Ba}}$	$10.69 \pm 0.28^{\text{Ba}}$
0	E	$0.45 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.43 \pm 0.03^{\text{Aba}}$	$0.43 \pm 0.05^{\text{ABa}}$	$0.42 \pm 0.01^{\text{Ba}}$
3		$0.29 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.27 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.27 \pm 0.03^{\text{Ab}}$	$0.27 \pm 0.04^{\text{Ab}}$
6		$0.23 \pm 0.01^{\text{Ac}}$	$0.27 \pm 0.06^{\text{Ab}}$	$0.22 \pm 0.04^{\text{Ab}}$	$0.21 \pm 0.03^{\text{Ab}}$
0	M (N)	$2.40 \pm 0.18^{\text{Ac}}$	$2.30 \pm 0.22^{\text{Ac}}$	$1.50 \pm 0.07^{\text{Cc}}$	$1.89 \pm 0.18^{\text{Bc}}$
3		$4.16 \pm 0.08^{\text{Ab}}$	$4.22 \pm 0.27^{\text{Ab}}$	$2.51 \pm 0.18^{\text{Bb}}$	$2.68 \pm 0.14^{\text{Bb}}$
6		$5.30 \pm 0.16^{\text{Aa}}$	$5.33 \pm 0.33^{\text{Aa}}$	$3.65 \pm 0.01^{\text{Ca}}$	$4.54 \pm 0.29^{\text{Ba}}$

^{a-c}Em coluna, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). ^{A-C}Em linha, média \pm desvio padrão com letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$). FNL Controle: fermento natural liofilizado (microbiota selvagem); FNL Lpe129: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129; FNL Lf139: fermento natural liofilizado inoculado com *L. fermentum* 139; FNL Mix: fermento natural liofilizado inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1)

A dureza dos pães aumentou nos pães preparados com FNL Controle e FNL Lpe129, enquanto reduziu nos pães preparados com massa fermentada FNL Lf139 e FNL Mix. Um estudo inicial relatou maior dureza no pão preparado com adição de fermento natural (Caglar *et al.*, 2021). Alguns fatores podem afetar a dureza do pão, incluindo o teor de EPS, que está associado ao maior volume específico e a redução da dureza do pão. Como o FNL Lf139 tinha maior teor de EPS, poderia ajudar a reduzir a dureza dos pães contendo *L. fermentum* 139.

A elasticidade dos pães elaborados com os fermentos liofilizados não se alterou ($p > 0,05$) durante o armazenamento, com exceção do pão elaborado com FNL Mix, que foi a menor entre as amostras. A redução da elasticidade dos pães ao longo do tempo é esperada uma vez que a perda de umidade faz parte do processo natural de envelhecimento, característica que afeta diretamente a elasticidade.

O pão Lf139 apresentou os menores valores de mastigabilidade ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento quando comparado às demais amostras de pães. Ao

terceiro dia de armazenamento, o pão Mix obteve mastigabilidade que não diferiu do pão Lf139. O uso do FNL Lf139 e do FNL Mix na produção de pães reduziu a dureza e teve menor impacto na elasticidade dos pães ao fim do sexto dia de armazenamento, contribuindo para a redução do envelhecimento. Ambos os pães foram produzidos com fermentos liofilizados que contém a espécie de bactéria láctica *Limosilactobacillus fermentum* 139.

3.7 Calorimetria exploratória diferencial e digestibilidade da proteína in vitro nos pães

3.7.1 DSC

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) caracterizou o amido retrogradado após o cozimento dos pães elaborados com fermento natural liofilizado. O DSC avaliou se o uso de fermento natural previamente inoculado com BAL influenciava o cozimento e a estrutura do pão, bem como a estabilidade térmica dos pães. Os parâmetros avaliados foram o calor de fusão do amido retrogradado (H), temperatura inicial de transição (T_0), temperatura de pico de transição (T_P) e temperatura final de transição (T_F).

A temperatura inicial de transição nos pães avaliados variou de 26,4 a 28,3 °C; os valores da temperatura de pico de transição variaram de 33,9 a 37,1 °C; os valores da temperatura final de transição variaram de 49,8 a 55,5 °C, e os valores do calor de fusão do amido retrogradado (H) variaram de 31,82 a 43,24 J/g (Tabela 8).

Como a entalpia (ΔH (Jg⁻¹)) é a quantidade de energia gasta para realizar um fenômeno calorimétrico, é possível observar que a entalpia de fusão da amilopectina recristalizada, obtendo-se assim a quantidade de amido retrogradado no pão. Quanto maior a entalpia maior será a quantidade de energia gasta para derreter o amido retrogradado. Por sua vez, quanto mais significativa for a variação de entalpia maior será a quantidade de amido retrogradado na amostra.

Tabela 8. Calorimetria exploratória diferencial [calor de fusão do amido retrogradado (ΔH Jg⁻¹), temperatura de transição inicial (T_0), temperatura de pico de transição (T_P) e temperatura de transição final (T_F)] de pães feitos fermentos liofilizados inoculado ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 no primeiro e terceiro dia de armazenamento ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) e digestibilidade da proteína *in vitro* (DIVP %).

Pão	Armazenamento	T_0 (°C)	T_F (°C)	T_P (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	IVPD (%)
Controle	0	26.9	50.6	35.0	39.74	91.01
Lp 129		26.4	49.8	34.0	31.82	98.66
Lf 139		28.3	55.5	37.1	43.24	98.12
Mix		28.0	53.9	33.9	35.55	93.37
Controle	3	23.1	32.3	49.9	86.2	
Lp 129		24.3	39.6	47.0	73.2	
Lf 139		24.2	32.4	43.2	61.1	
Mix		25.4	40.0	51.6	84.6	

A retrogradação do amido é um dos principais agentes de envelhecimento do pão e a presença de BAL capazes de produzir EPS e acidificar a massa fermentada são fatores-chave para retardar esse processo (Torrieri *et al.*, 2014). O menor valor de entalpia no tempo zero (primeiro dia) foram encontrados nos pães Lpe129 e Mix, com valores respectivos de 31,82 e 35,55 J/g e ambos pães produzidos com a BAL *Lactiplantibacillus pentosus* 129; no terceiro dia de armazenamento foi encontrado no pão Lf139 (61,10 J/g) o menor valor de entalpia, e no pão Lpe129 o valor de entalpia de (73,2 J/g). Os menores valores encontrados ao terceiro dia para os pães Lpe129 e Lf139 indicam que menor quantidade de amido recristalizado e menor envelhecimento do pão com manutenção das características sensoriais. Os dados encontrados para textura e no DSC indicam que a adição do FNL Lf139 na produção de pães reduz a ação do envelhecimento durante o armazenamento.

3.7.2 DIVP

Antes da avaliação da digestibilidade *in vitro*, o teor de proteína nos pães variou de $11,41 \pm 0,39$ a $13,58 \pm 0,22$ $\mu\text{g}/10$ mL. Após a digestão *in vitro*, o teor de proteína nos pães variou de $0,18 \pm 0,14$ a $1,12 \pm 0,45$ $\mu\text{g}/10$ mL (Tabela 8). Todos os pães produzidos com fermento natural liofilizado apresentaram teor reduzido de proteínas após digestão *in vitro*. Todos os pães apresentaram digestibilidade *in vitro*

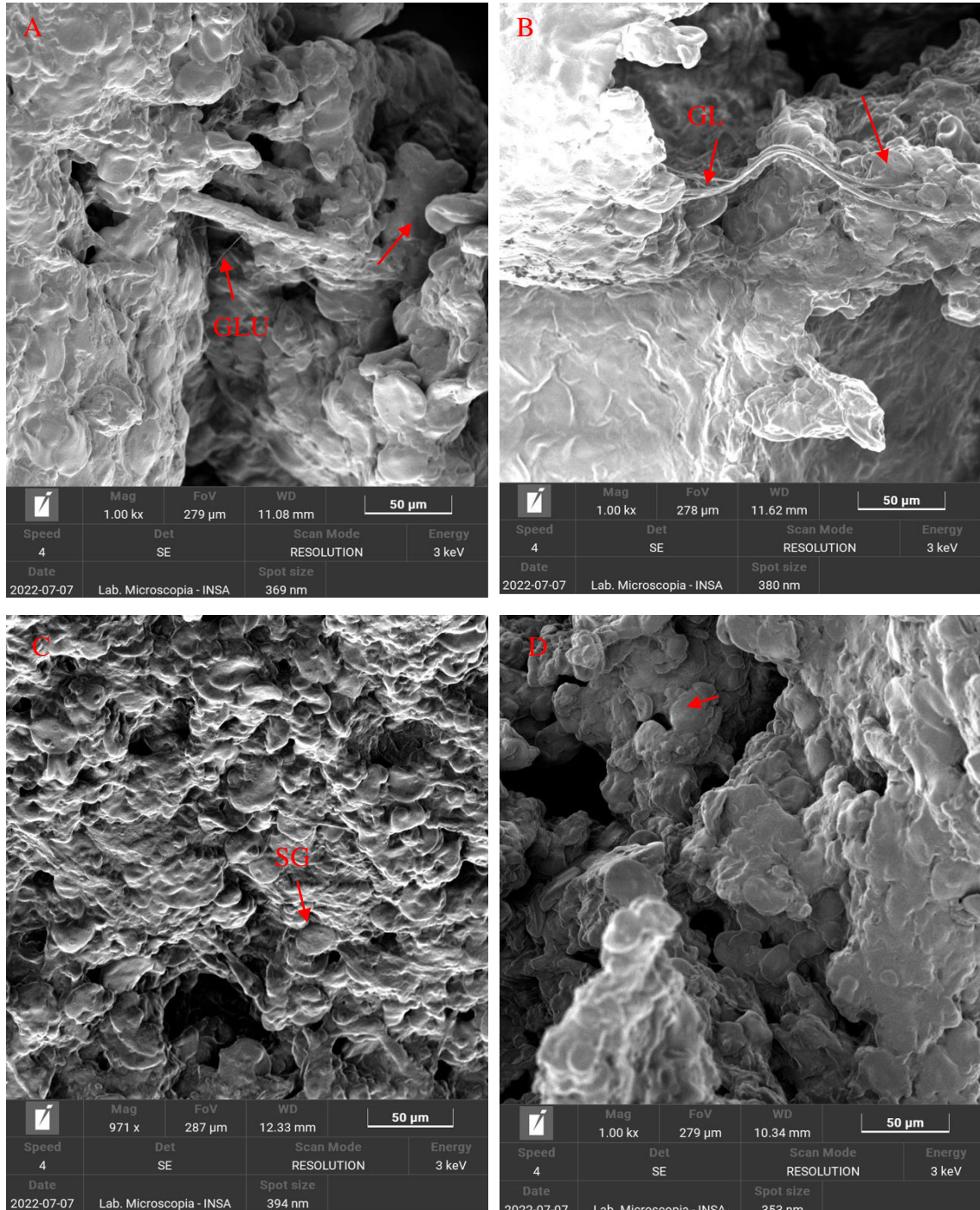
acima de 90% (Controle= 91,01%; Lpe129= 98,66%; Lf139= 98,12% e Mix= 93,37%). Os pães Lpe129 e Lf139 apresentaram maior digestibilidade *in vitro*.

Os resultados da análise dos fermentos naturais liofilizados inoculado com *L. pentosus* e *L. fermentum* indicaram intensa atividade metabólica (De Vuyst *et al.*, (2021). A longa fermentação dos pães com ambas as bactérias lácticas, neste caso presente tanto no FNL Mix e no pão Mix poderia causar uma atividade proteolítica mais intensa com impacto positivo na digestibilidade proteica. Entretanto, esse impacto foi mais evidente para os pães Lpe129 e Lf139 inoculados em cultura única de bactéria láctica

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em pão

A Figura 3 mostra as micrografias do pão produzido com massa fermentada liofilizada. As microestruturas permitiram a visualização de grandes grânulos de amido nos pães, que estão inseridos e conectados à rede de glúten.

Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de pães elaborados com fermento natural liofilizado (FNL) inoculado ou não com *L. pentosus* 129 e/ou *L. fermentum* 139 (ampliação de 1000x). A – Pão Controle: pão de FNL (microbiota selvagem); B – Pão Lp129: pão de FNL inoculado com *L. pentosus* 129; C – Pão Lf 139: pão de FNL inoculado com *L. fermentum* 139; D – Pão Mix: pão de FNL inoculado com *L. pentosus* 129 e *L. fermentum* 139 (1:1). SG – Grânulo de Amido; GLU – Glúten.



4. Conclusões

Após a liofilização, as amostras FNL sofreram uma redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos na contagem de células viáveis após 60 dias de armazenamento. No geral, o FNL apresentou excelente estabilidade e vida útil durante a caracterização e armazenamento, já que após reativação na produção de pães promoveram acidificação e aumento de volume. Quanto aos parâmetros físico-químicos avaliados, a utilização das cepas Lpe129 e Lf139 como culturas iniciadoras apresentou resultados satisfatórios em termos de viabilidade celular, produção de ácidos orgânicos, textura, volume específico e vida útil dos pães adicionados de fermentos liofilizados, variações foram observadas especialmente para maior dureza em pães inoculados com Lf139, no entanto, quanto a digestibilidade da proteína *in vitro*, os pães adicionados de BAL isoladamente ou em co-cultura no fermento (Lpe129, Lf139 e MIX) apresentaram digestibilidade superior, indicando maior atividade metabólica dessas cepas nos fermentos e pão. Além disso, um menor envelhecimento foi observado para os pães adicionados com os fermentos inoculados com as BAL isoladamente. A liofilização permitiu a obtenção de uma massa fermentada liofilizada com aplicação promissora na produção de pães de longa fermentação com características semelhantes aos pães produzidos com massa fermentada fresca madura e com aumento de volume e características de qualidade satisfatória, sem utilização de fermento comercial de panificação.

Referências

- Albagli, G., Schwartz, I. do M., Amaral, P. F. F., Ferreira, T. F., & Finotelli, P. V. (2021). How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. *LWT*, *149*, 111888. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111888>
- Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Taneyo Saa, D. L., & Gianotti, A. (2019). Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry*, *292*, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.061>
- Araújo, C. C., Sampaio, K. B., Gleire, F., Tayse, E., Lima, M. dos S., Viera, V. B., Garcia, E. F., Gómez-Zavaglia, A., Leite, E., & Inês, M. (2020). Protective Effects of Tropical Fruit Processing Coproducts on Probiotic Lactobacillus Strains during Freeze-Drying and Storage. *Microorganisms*, *8*(1), 96–96. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>
- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., Celińska, E., Jankowski, T., Olejnik, A., & Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of Lactococcus lactis: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food Chemistry*, *274*, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.033>
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *International Journal of Food Microbiology*, *239*, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006>
- Bhandari, B. (2013). Introduction to food powders. *Handbook of Food Powders*, 1–25. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.1>
- Bora, A. F. M., Li, X., Zhu, Y., & Du, L. (2018). Improved Viability of Microencapsulated Probiotics in a Freeze-Dried Banana Powder During Storage and Under Simulated Gastrointestinal Tract. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9464-1>

- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Caglar, N., Ermis, E., & Durak, M. Z. (2021). Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking. *Journal of Food Engineering*, 292, 110355. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110355>
- Calasso, M., Marzano, M., Caponio, G. R., Celano, G., Fosso, B., Calabrese, F. M., De Palma, D., Vacca, M., Notario, E., Pesole, G., De Angelis, M., & De Leo, F. (2023). Shelf-life extension of leavened bakery products by using bio-protective cultures and type-III sourdough. *LWT*, 177, 114587. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114587>
- Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ*, 9, e11389. <https://doi.org/10.7717/peerj.11389>
- Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenc, S., Perez, M., Segond, D., & Sicard, D. (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020240>
- Coşovanu, I., & Mironeasa, S. (2022). Features of Bread Made from Different Amaranth Flour Fractions Partially Substituting Wheat Flour. *Applied Sciences*, 12(2), 897. <https://doi.org/10.3390/app12020897>
- da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., Almeida, E. T. da C., Tavares, J. F., de Souza, E. L., Garcia, E. F., & Magnani, M. (2019). Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 116, 108496–108496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108496>
- de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2017). In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- de Souza Pedrosa, G. T., de Souza, E. L., de Melo, A. N. F., da Cruz Almeida, E. T., de Sousa Guedes, J. P., de Carvalho, R. J., Pagán, R., & Magnani, M. (2020). Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria

- in orange juice caused by Citrus essential oils and mild heat. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108837. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108837>
- De Vuyst, L., Comasio, A., & Kerrebroeck, S. V. (2021). Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–33. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1976100>
- Fang, L., Wang, W., Dou, Z., Chen, J., Meng, Y., Cai, L., & Li, Y. (2023). Effects of mixed fermentation of different lactic acid bacteria and yeast on phytic acid degradation and flavor compounds in sourdough. *LWT*, 174, 114438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114438>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. (2019). The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*, 7(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2020). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1515–1536. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>
- Gaglio, R., Alfonzo, A., Barbera, M., Franciosi, E., Francesca, N., Moschetti, G., & Settanni, L. (2020). Persistence of a mixed lactic acid bacterial starter culture during lysine fortification of sourdough breads by addition of pistachio powder. *Food Microbiology*, 86, 103349. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103349>
- Galli, V., Venturi, M., Coda, R., Maina, N. H., & Granchi, L. (2020). Isolation and characterization of indigenous *Weissella confusa* for in situ bacterial exopolysaccharides (EPS) production in chickpea sourdough. *Food Research International*, 138, 109785. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109785>
- Gänzle, M. G., Vermeulen, N., & Vogel, R. F. (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24(2), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006>
- Garcia, E. F., Amanda, Luciano, W. A., Rodrigues, M., Maria, Madruga, M. S., Lima, S., Magnani, M., Saarela, M., & de. (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>

- Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C. A., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., de Moraes Júnior, M. A., Lucena, B. T. L., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2016). Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
- Gidari-Gounaridou, C., Nouska, C., Hatzikamari, M., Kotsiou, K., Biliaderis, C. G., & Lazaridou, A. (2023). Impact of dry sourdough based on a fermented chickpea starter on quality characteristics and shelf life of gluten-free bread. *Food Bioscience*, 53, 102780–102780. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102780>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.013>
- Gu, Y., Luo, X., Qian, H., Li, Y., Fan, M., & Wang, L. (2023). Effects of freeze-dried pure strains to replace type II sourdough in bread production. *Food Bioscience*, 53, 102752–102752. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102752>
- Gul, L. B., Con, A. H., & Gul, O. (2020). Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. *Cryobiology*, 96, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.07.007>
- Gül, L. B., Gül, O., & Çon, A. H. (2022). Potential of three different lactic acid Bacteria to use as starter culture for production of type II sourdough breadmaking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 3398–4008. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01493-0>
- Gul, L. B., Gul, O., Yilmaz, M., Dertli, E., & Çon, A. H. (2020). Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: Determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(4). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14400>
- Guo, Q., Tang, J., Li, S., Qiang, L., Chang, S., Du, G., Yue, T., & Yuan, Y. (2022). *Lactobacillus plantarum* 21805 encapsulated by whey protein isolate and dextran conjugate for enhanced viability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 216, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.207>
- Hernández-Parada, N., Gonzalez-Rios, O., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Figueroa-Hernández, C. Y., Juan, Rayas-Duarte, P., & Figueroa-Espinoza, M. C.

- (2022). Exploiting the Native Microorganisms from Different Food Matrices to Formulate Starter Cultures for Sourdough Bread Production. *Microorganisms*, 11(1), 109–109. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010109>
- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
- İspirli, H., Özmen, D., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O., & Dertli, E. (2020). Impact of glucan type exopolysaccharide (EPS) production on technological characteristics of sourdough bread. *Food Control*, 107, 106812. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106812>
- Jiang, G., He, J., Leong Ming Gan, Li, X., & Tian, Y. (2022). Optimization of Exopolysaccharides Production by *Lactiplantibacillus pentosus* B8 Isolated from Sichuan PAOCAI and Its Functional Properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 58(2), 195–205. <https://doi.org/10.1134/s0003683822020107>
- Jiang, H., Wang, Y., Xu, X., Deng, L., Feng, L., Han, J., & Liu, W. (2023). Effect of oligosaccharides as lyoprotectants on the stability of curcumin-loaded nanoliposomes during lyophilization. *Food Chemistry*, 410, 135436–135436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135436>
- Jr, G. W., & Aoac International. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. Aoac International.
- Kaditzky, S., Seitter, M., Hertel, C., & Vogel, R. F. (2007). Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. *European Food Research and Technology*, 227(2), 433–442. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0738-1>
- Katina, K., Maina, N. H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M., & Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26(7), 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.008>
- Kim, M.-N., Nam, D.-H., Kim, S. H., Im, P., Choe, J., & Choi, A. (2018). Enhancement of viability, acid, and bile tolerance and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agents. *Food Science & Nutrition*, 6(7), 1904–1913. <https://doi.org/10.1002/fsn3.762>
- Kong, L., Huang, Y., Pan, D., Ye, C., Wu, Z., Pan, D., & Pan, D. (2022). Effects of galactosyltransferase on EPS biosynthesis and freeze-drying resistance of

- Lactobacillus acidophilus NCFM. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100145–100145. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100145>
- Lattanzi, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2014). Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 948–955. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.032>
- Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., & Chen, W. (2018). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral Lactobacillus fermentum survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology Letters*, 41(2), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02634-6>
- Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., Zhao, G., Xu, L., Shen, L., Liu, Y., Chen, H., Wu, W., Li, C., & Liu, S. (2018). Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. *LWT*, 95, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.061>
- Liu, X., Zhou, M., Jiabin, C., Luo, Y., Ye, F., Jiao, S., Hu, X., Zhang, J., & Lü, X. (2018). Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. *LWT*, 96, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.023>
- Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>
- Ma, S., Wang, Z., Guo, X., Wang, F., Huang, J., Sun, B., & Wang, X. (2021). Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges—A review. *Food Chemistry*, 360, 130038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>
- Mafaldo, Í. M., de Medeiros, V. P. B., da Costa, W. K. A., da Costa Sassi, C. F., da Costa Lima, M., de Souza, E. L., Barão, C. E., Pimentel, T. C., & Magnani, M. (2022). Survival during long-term storage, membrane integrity, and ultrastructural aspects of Lactobacillus acidophilus 05 and Lactocaseibacillus casei 01 freeze-dried with freshwater microalgae biomasses. *Food Research International*, 159, 111620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111620>
- Mamhoud, A., Nionelli, L., Bouzaine, T., Hamdi, M., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2016). Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and exploitation of the

- use as starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.004>
- Mantzourani, I., Plessas, S., Odatzidou, M., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., & Bekatorou, A. (2019). Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chemistry*, 271, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.183>
- Melini, V., & Melini, F. (2018). Strategies to extend bread and GF bread shelf-life: From sourdough to antimicrobial active packaging and nanotechnology. *Fermentation*, 4, Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010009>
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010a). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27(7), 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.021>
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010b). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27(7), 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.021>
- Perri, G., Greco Miani, M., Amendolagine, G., Pontonio, E., & Rizzello, C. G. (2022). Defatted durum wheat germ to produce type-II and III sourdoughs: Characterization and use as bread ingredient. *LWT*, 163, 113566. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113566>
- Plessas, S., Mantzourani, I., & Bekatorou, A. (2020). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* SP2 as Starter Culture on Sourdough Bread Making. *Foods*, 9(1), 77. <https://doi.org/10.3390/foods9010077>
- Prabhakar, K., & Mallika, E. N. (2014). Dried Foods. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 574–576. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00085-9>
- Reale, A., Di Renzo, T., Preziuso, M., Panfili, G., Cipriano, L., & Messina, M. C. (2019). Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *LWT*, 99, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.016>
- Rodrigues, N. P. A., Garcia, E. F., Sampaio, K. B., do Nascimento, H. M. A., de Sousa Guedes, J. P., & de Souza, E. L. (2021). Dynamics of physiological responses of potentially probiotic fruit-derived *Limosilactobacillus fermentum* in apple and orange juices during refrigeration storage and exposure to simulated gastrointestinal

conditions. *Archives of Microbiology*, 204(1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02672-1>

- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>
- Romano, N., Sciammaro, L., Mobili, P., Puppo, M. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Flour from mature *Prosopis nigra* pods as suitable substrate for the synthesis of prebiotic fructo-oligosaccharides and stabilization of dehydrated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 121, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.016>
- Rosell, C. M. (2016). Bread: Chemistry of Baking. *Encyclopedia of Food and Health*, 484–489. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00088-x>
- Sakandar, H. A., Huang, W., Kubow, S., Sadiq, F. A., & Imran, M. (2019). Comparison of bacterial communities in gliadin-degraded sourdough (Khamir) sample and non-degraded sample. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 375–380. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04030-y>
- Sánchez, J.-I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., & Rodríguez, A. (2006). Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7495–7502. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-06>
- Sánchez-Adriá, I. E., Sanmartín, G., Prieto, J. A., Estruch, F., Fortis, E., & Randez-Gil, F. (2023). Technological and acid stress performance of yeast isolates from industrial sourdough. *LWT*, 184, 114957. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114957>
- Siepmann, F. B., Sousa de Almeida, B., Waszczynskyj, N., & Spier, M. R. (2019). Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. *LWT*, 108, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>
- Sompach, G., Rodklongtan, A., Nitisinprasert, S., & Chitprasert, P. (2022). Microencapsulating role of whey protein isolate and sucrose in protecting the cell membrane and enhancing survival of probiotic lactobacilli strains during spray drying, storage, and simulated gastrointestinal passage. *Food Research International*, 159, 111651. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111651>

- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90–94.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>
- Stolz, P., Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1996). Maltose-phosphorylase and hexokinase activity in lactobacilli from traditionally prepared sourdoughs. *Adv. Food Sci.*, 18, 1.
<https://mediatum.ub.tum.de/1398816>
- Su, X., Wu, F., Zhang, Y., Yang, N., Chen, F., Jin, Z., & Xu, X. (2019). Effect of organic acids on bread quality improvement. *Food Chemistry*, 278, 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.011>
- Torrieri, E., Pepe, O., Ventrino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.005>
- Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2007). Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4741–4750.
<https://doi.org/10.1128/aem.00315-07>
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2010). Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology*, 27(8), 1000–1008.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.005>
- Xiong, J., Liu, D., & Huang, Y. (2023). Exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum*: isolation, purification, structure–function relationship, and application. *European Food Research and Technology*, 249(6), 1431–1448.
<https://doi.org/10.1007/s00217-023-04237-6>
- Yildirim, R. M., & Arici, M. (2019). Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. *LWT*, 112, 108224.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.122>

APÊNDICE

