



Maria Judite Alves da Costa e Almeida • Caracterização da Flora Zimológica de Fermentos Tradicionais e Avaliação do seu Potencial para Utilização na Indústria da Panificação • Departamento de Biologia • Universidade do Minho • Braga 1997.

Maria Judite Alves da Costa e Almeida * Caracterização da Flora
Zimológica de Fermentos Tradicionais e Avaliação do seu
Potencial para Utilização na Indústria de Panificação *

Departamento de Biologia * Universidade do Minho * Braga, 1997.

Autor: Maria Judite Alves da Costa e Almeida.

Orientação e Revisão: Professora Doutora Célia do Sacramento Santos Pais

Título: Caracterização da Flora Zimológica de Fermentos Tradicionais e Avaliação do seu Potencial para Utilização na Indústria de Panificação.

Capa: Nuno Cláudio, sobre pintura de Bruggel (fragmento de "Os Provérbios Flamengos", 1559).

Impressão: Copissaurio, Julho 1997.

*Dissertação apresentada à Escola de Ciências
da Universidade do Minho para prestação de
provas de Doutoramento em Ciências.*

*Ao Mário Rui,
A quem agradecer é muito pouco.*

Todo o trabalho de investigação desenvolvido e aqui descrito foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica agradeço o subsídio para a execução gráfica desta Tese de Doutoramento.

...

A microscópio de desilusões

Findei, prolixo nas minúcias fúteis...

Minhas conclusões práticas, inúteis...

Minhas conclusões teóricas, confusões...

...

Álvaro de Campos

Índice

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
ABREVIATURAS.....	xviii

PLANIFICAÇÃO

PLANO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE.....	1
--	---

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1. NOTA HISTÓRICA.....	6
2. A IMPORTÂNCIA DO PÃO.....	8
3. A PANIFICAÇÃO.....	10
3.1. Constituição e propriedades das farinhas.....	10
3.1.1. Os aditivos incorporados nas farinhas.....	13
3.2. A massa panar e o seu desenvolvimento.....	17
3.3. Processos industriais de produção de massa panar.....	19
3.3.1. Massa porosa ou esponjosa ("sponge dough").....	19
3.3.2. Massa de mistura directa ("straight dough").....	20
3.3.3. Massa de mistura contínua ("continuous mix").....	20
3.3.4. Utilização de fermentos líquidos ("liquid ferment").....	21
4. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE LEVEDURA.....	22
4.1. A levedura prensada.....	27
4.2. A levedura seca ou dessecada.....	27
5. SELECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS PARA PANIFICAÇÃO.....	28
5.1. Métodos de selecção.....	28

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA FLORA ZIMOLÓGICA DE ISCOS CASEIROS.....32

1. INTRODUÇÃO.....33

2. ALGUNS MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRODUÇÃO DE PÃO.....33

2.1. O pão achatado.....34

2.2. O pão ácido - "sour-dough".....35

3. O PÃO TRADICIONAL DO NORTE DE PORTUGAL.....37

4. IMPORTÂNCIA DO FENÓMENO "KILLER" EM LEVEDURAS.....42

MATERIAL E MÉTODOS.....45

1. RECOLHA DOS FERMENTOS.....45

2. ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO, MANUTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE CADA ISCO.....47

2.1. Isolamento.....47

2.2. Quantificação.....48

2.3. Manutenção.....49

2.4. Identificação.....49

3. DETECÇÃO DA SENSIBILIDADE E ACTIVIDADE "KILLER" DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....54

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....56

1. ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS E SUA CARACTERIZAÇÃO.....56

2. ASSOCIAÇÕES DE LEVEDURAS PRESENTES NO MESMO ISCO.....60

3. COMPOSIÇÃO E pH DOS ISCOS.....62

4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E CAPACIDADE "KILLER".....64

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO E SELECÇÃO DAS ESTIRPES DE LEVEDURAS ISOLADAS COM VISTA AO SEU POTENCIAL USO EM PANIFICAÇÃO70

1. INTRODUÇÃO.....71

2. CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO.....71

3 . A MASSA PANAR.....	75
3 . 1 . Estabilização e retenção do dióxido de carbono na massa.....	75
3 . 2 . Os alvéolos gasosos e a expansão da massa.....	76
3 . 3 . Quantificação do dióxido de carbono durante o processo fermentativo....	78
MATERIAL E MÉTODOS.....	80
1 . DETERMINAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E BIOMASSA MÁXIMA DAS ESTIRPES SELECIONADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	80
1 . 1 . Meios de cultura.....	80
1 . 2 . Determinação da biomassa máxima.....	81
1 . 3 . Determinação da taxa específica de crescimento.....	83
2 . PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO NAS MASSAS.....	83
2 . 1 . Obtenção das células de levedura.....	84
2 . 2 . Preparação das massas.....	85
2 . 3 . Utilização do reofermentómetro.....	86
2 . 4 . Estudos de microscopia electrónica de varrimento.....	89
3 . DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA INVERTASE E DA α -GLUCOSIDASE.....	90
3 . 1 . Preparação dos extractos celulares.....	90
3 . 2 . Determinação da actividade da invertase.....	90
3 . 3 . Determinação da actividade da α -glucosidase.....	92
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
1 . CARACTERÍSTICAS GERAIS E CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS ESTIRPES ISOLADAS.....	93
2 . EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS NA MASSA.....	96
3 . EFEITO DA FONTE DE CARBONO DO MEIO DE CRESCIMENTO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS NA MASSA.....	98
4 . EFEITO DA FONTE DE CARBONO DO MEIO DE CRESCIMENTO NAS ACTIVIDADES DA α -GLUCOSIDASE E DA INVERTASE.....	100
4 . 1 . Actividade da α -glucosidase.....	100
4 . 2 . Actividade da invertase.....	103

5. OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS DO DESENVOLVIMENTO DA MASSA PANAR.....107

CAPÍTULO 4

CAPACIDADE FERMENTATIVA E TOLERÂNCIA AO CONGELAMENTO DAS ESTIRPES SELECIONADAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E *TORULASPORA DELBRUECKII*

.....112

1. INTRODUÇÃO.....113

2. AS MASSAS CONGELADAS.....114

3. A TOLERÂNCIA DAS LEVEDURAS AO CONGELAMENTO.....116

4. ESTUDOS GENÉTICOS PARA OBTENÇÃO DE ESTIRPES CRIO-TOLERANTES.....119

5. A IMPORTÂNCIA DA TREALOSE NA AQUISIÇÃO DE TERMOTOLERÂNCIA.....121

MATERIAL E MÉTODOS.....127

1. MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA.....127

2. PREPARAÇÃO DAS MASSAS.....127

3. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....128

4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE TREALOSE.....129

5. REPRODUCIBILIDADE.....130

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....131

1. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE CONGELAMENTO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS.....131

2. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE PRÉ-FERMENTAÇÃO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS.....133

3. EFEITO DO CONGELAMENTO E DA PRÉ-FERMENTAÇÃO NA VIABILIDADE CELULAR.....134

4. CONTEÚDO INTRACELULAR DE TREALOSE E SUA RELAÇÃO COM A CRIO-RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS.....138

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL.....	141
1. DISCUSSÃO GERAL.....	142
1.1. Leveduras representativas dos iscos.....	143
1.2. Leveduras isoladas <i>versus</i> parâmetros relevantes em panificação: potencial uso de estirpes de <i>Torulaspota delbrueckii</i>	144
1.3. Considerações finais.....	149

APÊNDICE I

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS UTILIZADOS.....	151
I. Meio de cultura utilizado para o isolamento das leveduras.....	152
II. Meio de cultura utilizado na contagem de colónias de leveduras (UFC).....	153
III. Meio de cultura utilizado na manutenção das leveduras.....	154
IV. Meio de cultura utilizado na identificação das leveduras.....	155
V. Meio de cultura utilizado na detecção de propriedades "killer" nas leveduras.....	165
VI. Meio de cultura utilizado na selecção de estirpes de leveduras com potencial interesse em panificação.....	167
VII. Meio de cultura utilizado no crescimento de estirpes de leveduras com potencial interesse em panificação.....	170
VIII. Método utilizado no fabrico das massas.....	170
IX. Método de quantificação das unidades formadoras de colónias (UFC) quer antes quer após o seu congelamento.....	171
X. Método de preparação de amostras para microscopia electrónica de varrimento (M.E.V.).....	172
XI. Método de preparação de células para determinação do conteúdo intracelular de trealose.....	173
XII. Métodos utilizados na determinação da actividade enzimática da invertase e da α -glucosidase.....	173
XIII. Método utilizado no doseamento da proteína nos extractos celulares.....	176
BIBLIOGRAFIA.....	179
AGRADECIMENTOS.....	200

RESUMO

A indústria da panificação utiliza normalmente estirpes seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como agente levedante mas, nos processos artesanais nomeadamente no fabrico da broa, usa-se um isco ou fermento que consiste numa porção de massa que se guarda da fabricação anterior e na qual se conservam e multiplicam as leveduras responsáveis pela fermentação. Dado o crescente interesse na investigação de novas leveduras de panificação, este estudo teve como principal objectivo o conhecimento e caracterização da flora de leveduras presente nos fermentos ou iscos utilizados no fabrico artesanal da broa com vista a uma possível selecção de estirpes com potencial valor para a indústria da panificação.

Para tal, foram recolhidos iscos em 34 locais diferentes, predominantemente do norte do país, tendo sido isoladas 95 estirpes de leveduras e identificadas 75 de acordo com os métodos clássicos utilizados na taxonomia de leveduras. As estirpes isoladas pertenciam a nove espécies diferentes sendo as seguintes as mais representativas: *S. cerevisiae*, presente em cerca de 80% das amostras, *Pichia membranaefaciens* e espécies afins, *Torulaspota delbrueckii*, *Issatchenkia orientalis*, (presentes em cerca de 40%), *P. anomala*, *S. kluyveri* (presentes em cerca de 10%), *Kluyveromyces marxianus* e *I. occidentalis* (presentes em 3%). A distribuição das leveduras nos fermentos variou de uma a quatro espécies diferentes por fermento, apresentando alguns deles mais do que uma estirpe da mesma espécie. Apenas sete dos fermentos estudados continham uma cultura pura de *S. cerevisiae*. Associações de duas espécies diferentes foram encontradas em 48% dos fermentos, 30% apresentavam associações de três espécies e os restantes consistiam numa mistura de quatro espécies de leveduras. Associações de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, *I. orientalis* e/ou *P. membranaefaciens* foram as mais frequentes. Todas as estirpes isoladas

foram caracterizadas em relação à sua actividade "killer" tendo esta característica sido detectada em cerca de um quarto dos isolados.

Entre as principais características desejáveis numa levedura de panificação contam-se uma alta actividade glicolítica, rápida fermentação da maltose, e elevadas actividades quer da invertase quer da α -glucosidase. Assim, numa segunda fase do trabalho foram seleccionadas as estirpes que apresentavam maior capacidade fermentativa da maltose e elevada produção de biomassa em diferentes meios de cultura com o objectivo de determinar a sua capacidade fermentativa nas massas e as actividades específicas da α -glucosidase e invertase quando crescidas em diferentes meios de cultura. A fim de determinar a potencial aplicação de estirpes não convencionais na indústria da panificação, além das estirpes de *S. cerevisiae* foram estudadas com particular atenção as de *T. delbrueckii* anteriormente isoladas. Estudos idênticos foram também efectuados em estirpes de *S. cerevisiae* isoladas de fermentos comerciais bem como em estirpes de outras proveniências, para comparação dos resultados. Quando as leveduras foram crescidas em meio Y.P.S. com 2% de sacarose verificou-se que a sua capacidade fermentativa na massa era semelhante à obtida para as estirpes comerciais, apresentando valores compreendidos entre 350 e 480 ml CO₂.3h⁻¹.100g⁻¹ massa. Os valores mais elevados foram obtidos para as estirpes DB 42B (IGC 5321) de *T. delbrueckii* e DB 56A (IGC 5320) de *S. cerevisiae*. A presença de 3% de NaCl no meio de crescimento estimulou a capacidade fermentativa de algumas das estirpes o mesmo acontecendo quando se adicionou 0,5% de maltose. Concentrações superiores de maltose no meio tiveram, pelo contrário, um efeito inibitório na capacidade fermentativa das leveduras. No entanto, em ambos os casos, a biomassa máxima produzida apresentou uma redução da ordem dos 25 a 30% tornando indesejável a utilização de qualquer destes compostos. No que respeita à actividade da α -glucosidase e da invertase todas as estirpes testadas apresentaram valores elevados, registando-se uma maior actividade com o aumento da concentração de maltose no meio. Verificou-se ainda que as estirpes de *T. delbrueckii* que isolámos (IGC 5321 [DB 42B]) e (IGC 5323 [DB 62A]) apresentaram sempre actividades mais

elevadas e tanto maiores quanto maior fosse a concentração de maltose no meio.

Tendo presente que os produtores de levedura para panificação procuram permanentemente estirpes que apresentem elevada capacidade fermentativa e que a mantenham, mesmo quando armazenadas a baixas temperaturas, conforme as solicitações crescentes da indústria de panificação (como o uso de massas congeladas), seleccionaram-se com base nessas características, cinco estirpes de *S. cerevisiae* e três de *T. delbrueckii* para continuação dos estudos. No que respeita ao congelamento das massas a -20°C constatou-se que apenas as duas estirpes de *T. delbrueckii* estudadas mantiveram a capacidade fermentativa e a viabilidade celular após congelamento das massas durante 30 dias, tendo, no entanto, sido detectada uma diminuição na taxa de sobrevivência quando a massa foi sujeita a uma fermentação prévia. Após quatro dias de congelamento, a capacidade fermentativa diminuía quando se fazia aumentar o período de pré-fermentação, excepto nas duas estirpes de *T. delbrueckii*, que a mantinham após 15 dias de congelamento precedido de 2,5 horas de pré-fermentação. As duas estirpes comerciais e as duas estirpes acima referidas, exibiam um conteúdo intracelular de trealose superior a 20% (p/p).

Quando comparadas todas as estirpes, nas diversas situações experimentais, os resultados obtidos ao longo deste trabalho, parecem indicar a presença de pelo menos duas, pertencentes à espécie *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B]) e (IGC 5323 [DB 62A]), capazes de conservar elevada capacidade de produção de CO_2 , revelando simultaneamente altas concentrações de trealose intracelular e uma elevada tolerância ao congelamento, indiciando assim, um potencial valor para a panificação industrial.

ABSTRACT

In breadmaking, fermentation by yeasts is of primary importance for its leavening function and the possible contribution for the production of desirable flavour compounds. Although the baking industry generally uses *Saccharomyces cerevisiae*, in rural areas in Portugal bread is sometimes prepared with dough carried over from a previous making. Thus, the main objective of this work was to identify and characterize the yeast flora present in traditional bread doughs in order to select for strains of potential value for the baking industry.

Thirty-four samples were randomly taken from home-made bread doughs at different locations in the country or at the same sites but from bread having distinct organoleptic characteristics and 95 strains were isolated. Only 75 were identified according to conventional methods used in yeast taxonomy and nine species representative of the yeast flora were found. By far, the predominant species, isolated from about 80% of the samples was *S. cerevisiae*. *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranaefaciens* and related species and *T. delbrueckii* were present in ca. 40% of the samples, *P. anomala*, *S. kluyveri*, were present in about 10% and *Kluyveromyces marxianus* and *I. occidentalis* present in 3%. It is noteworthy that some doughs had very specific yeast populations, some of them having two or three strains of a single species. All the isolates have been characterized with respect to their "killer" activity. About one quarter displayed killer activity, strains of *P. anomala* showing the broadest spectra.

Among the main characteristics desirable in a baking yeast are a high biomass production together with a rapid maltose fermentation and high fermentative capacity. Five strains of *S. cerevisiae* and three of *T. delbrueckii*, selected on the basis of these characteristics were used in this study. When these yeast strains were grown in a rich medium, Y.P.S. (with 2% of sucrose) and used in the dough, the leavening ability of the yeast cells

ranged from 350 to 480ml CO₂. 3h⁻¹. 100g⁻¹ dough. These values were very similar to those showed by the commercial strains and the highest ones belonged to a strain of *S. cerevisiae* (IGC 5320 [DB 56A]) and to two strains of *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B] and IGC 5323 [DB 62A]). When 3% of NaCl or 0.5% of maltose were added to the growth medium, we observed that fermentative activity was enhanced but maximum biomass decreased about 20 to 30%. The activity of α -glucosidase of the selected strains was studied in the different growth media and the strains of *T. delbrueckii* systematically showed the highest values. These values increased with the increase of maltose concentration in the medium. In what respects invertase and in the same experimental conditions, strains of *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B] and IGC 5323 [DB 62A] showed the same pattern.

Manufacturers of baker's yeast are in constant pursuit of strains with improved dough raising properties and capacity to retain fermentative ability during storage at low temperature in order to meet baking industry requirements such as the increasing use of frozen doughs. The same strains of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* were used in this study. The objective was to test the influence of dough freezing and storage both on the leavening ability of the yeast cells and on their viability using two strains of commercial baker's yeast as a reference. Most of the studied strains displayed dough-raising capacities similar to the ones found in baker's yeasts. During storage of frozen doughs two strains of *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B] and IGC 5323 [DB 62A] presented approximately the same leavening ability for 30 days. Cell viability was not significantly affected by freezing, but when the dough was submitted to a bulk fermentation before being stored at -20°C there was a decrease in the survival ratio which depended on the yeast strain. Furthermore, the leavening ability after four days of storage decreased as the prefermentation period of the dough before freezing increased, except for strains of *T. delbrueckii*. These two strains retained the fermentative activity after 15 days of storage and 2.5 hours of prefermentation, despite showing a reduction of viable cells under the same conditions. The intracellular trehalose content was higher than 20% (w/w) in

four of the yeasts tested: the two commercial strains of baker's yeast and the referred two strains of *T. delbrueckii*. However, the strains of *S. cerevisiae* were clearly more susceptible to freezing damages, indicating that other factors may contribute to the freeze tolerance of these yeasts.

Summarizing, from the results obtained, we may conclude that two strains of *T. delbrueckii*, when compared to all the other strains studied, kept a strong capacity to produce CO₂ under all circumstances tested, showed high intracellular concentrations of trehalose and presented the highest tolerance to freezing. These properties make them candidates of potential value for the baking industry.

ABREVIATURAS

Å	angström
ADY	levedura seca activa
AP	L-ascorbil-6-palmitato
atm	atmosfera (unidade de pressão)
BSA	albumina de soro bovino
D.O.	densidade óptica
DATEM	monoéster diacetiltartárico de glicerol
DNS	ácido dinitrossalicílico
<i>et al.</i>	<i>et alterum</i>
<i>g</i>	aceleração da gravidade
GMS-90	monoestearato de glicerol
HPLC	cromatografia líquida de alta precisão
<i>i. e.</i>	<i>ipso est</i>
IDY	levedura seca instantânea
IR	infra-vermelho
<i>kc</i>	taxa específica de crescimento
<i>locus</i>	local
M	Molar
M.E.V.	microscopia electrónica de varrimento
min	minuto
µm	micrometro

Mr	massa molecular relativa
N	Normal
PNPG	p-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo
ppm	partes por milhão
q.b.	quanto baste
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SSL	estearoil-2-lactilato
UFC	unidade formadora de colónia
°C	graus Celsius

Planificação

PLANO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE

A sensibilidade, que por vezes a realidade nos impõe, fez-nos enveredar por um campo pouco ou nada investigado em Portugal e quase nada na Europa: o estudo de leveduras de panificação, não daquelas que a indústria colocou já no mercado, mas daquelas, que por estarem esquecidas nas casas mais típicas portuguesas, ainda não tinham sido objecto da curiosidade do Mundo da Ciência. Embora a indústria use genericamente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, nas áreas rurais de Portugal, um pão especial, feito essencialmente à custa de farinha de milho e centeio, é preparado com base num isco que foi guardado da preparação anterior, funcionando como um iniciador ou inóculo do processo fermentativo seguinte. Este tipo de fermento, um sistema biológico natural, caracterizado pela presença de leveduras e bactérias lácticas, que convivem numa associação complexa, é de algum modo semelhante ao que é encontrado no pão ácido ("sour-dough"). Mas, enquanto a microflora do "sour-dough" e o seu processo de fabrico estão bem documentados na literatura, no caso deste pão tradicional de milho e centeio, a informação é virtualmente inexistente. Não se conhecem a flora de leveduras e bactérias aí presente nem as possíveis interacções entre as diversas leveduras e outros microrganismos, em particular com as bactérias lácticas.

Foi em função do que referimos que surgiu este trabalho, que teve como objectivos centrais a recolha dos iscos ou fermentos no local onde eram fabricados, o isolamento e caracterização das leveduras aí presentes e a selecção de estirpes de leveduras com potencial aplicação na indústria da panificação.

Assim, tendo como estratégia de planificação as linhas gerais acima definidas, apresenta-se no primeiro capítulo, após uma breve nota histórica, uma revisão dos conceitos fundamentais ligados à panificação.

Uma vez que esta tarefa se iniciou a partir de material inexistente nos nossos laboratórios, houve necessidade de nos dedicarmos à recolha dos iscos, feita *in loco*, em vários pontos do país. O segundo capítulo é dedicado ao isolamento, identificação e caracterização das leveduras que foram utilizadas durante o trabalho. Procedeu-se ainda à avaliação quer da sensibilidade quer da actividade "killer" das estirpes de leveduras isoladas.

Terminada esta primeira etapa e, com cerca de uma centena de estirpes isoladas, necessitámos de eleger critérios que nos permitissem uma primeira escolha daquelas estirpes eventualmente mais adequadas para o processo da panificação. Estes estudos foram desenvolvidos e estão descritos no terceiro capítulo.

O primeiro critério utilizado baseou-se essencialmente na capacidade de fermentação da maltose, o que nos permitiu reduzir de modo considerável o número de estirpes com que passaríamos a trabalhar. Fomos, de seguida, determinar nas leveduras seleccionadas, quer a taxa específica de crescimento, quer a biomassa máxima obtida em diferentes meios de cultura. Outro critério importante de selecção das referidas estirpes foi a sua capacidade de produção de dióxido de carbono nas massas, em comparação com a mesma aptidão encontrada nas estirpes comerciais de panificação.

Porque, no decorrer deste trabalho, algumas das estirpes experimentadas se mostraram de evidente interesse no domínio da panificação, fomos ainda determinar a actividade específica de enzimas cuja actividade é considerada importante em estirpes de panificação: a α -glucosidase e a invertase. Estudámos ainda o efeito da adição de cloreto de sódio e da fonte de carbono do meio de crescimento na capacidade fermentativa das leveduras na massa.

A avaliação da capacidade fermentativa das leveduras seleccionadas, em massas congeladas a -20°C , durante períodos de tempo variáveis, bem como a sua aptidão para a produção de CO_2 em massas sujeitas a uma

fermentação anterior ao congelamento, foram alvo dos estudos realizados e descritos no capítulo quatro.

Detectados alguns dos muitos problemas relacionados com o congelamento das massas e com os períodos de pré-fermentação, indagámo-nos sobre as causas subjacentes a tais processos, que permitiam que um conjunto de leveduras se apresentasse resistente ao congelamento e mesmo a períodos variáveis de pré-fermentação, enquanto outro fosse extremamente sensível ao congelamento e/ou a um período de fermentação prévio. Recorrendo à literatura que tínhamos ao nosso alcance, verificámos que em *Saccharomyces cerevisiae*, a acumulação de um dissacarídeo não redutor isómero da maltose, a trealose, apresentava, de um modo geral, uma correlação positiva com a resistência à tensão térmica, sugerindo que a trealose pudesse ser um agente protector que contribuía para a tolerância ao congelamento. Assim, determinámos o conteúdo intracelular de trealose, numa tentativa de encontrar alguma correlação entre a referida concentração desse dissacarídeo e a capacidade fermentativa, nas estirpes seleccionadas.

Finalmente, no capítulo cinco, apresentam-se as considerações gerais decorrentes do trabalho experimental desenvolvido, procedendo-se a uma discussão global dos resultados obtidos. Referem-se ainda algumas das possíveis linhas de investigação que ao longo desta tese foram surgindo como perspectivas de trabalho a desenvolver no futuro.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. NOTA HISTÓRICA

Sendo um dos mais velhos processos biotecnológicos de produção de alimentos, a panificação, que remonta à mais profunda antiguidade valendo-se da utilização da fermentação alcoólica, reivindicará hoje, sem dúvida, alguns direitos antecedentes, numa época em que as biotecnologias e as suas aplicações dominam as indústrias agro-alimentares. Faltam as referências bibliográficas, já que nos remontamos a tempos em que, talvez por obra do acaso, alguém teria abandonado uma massa num ambiente fresco e húmido e, passado algum tempo, teria tido a surpresa de encontrá-la aumentada, macia e de cheiro agradável. Qual não seria hoje o espanto daquele antigo padeiro, que cozia esta massa sobre a pedra, ao verificar que aquele alimento iria conhecer um sucesso tão grande junto do público, que nenhum tecnologista actual ousaria esperar para qualquer novo produto...

Segundo a Bíblia, os Hebreus (2000 a. C.) utilizavam já diversos tipos de farinhas provenientes de cereais, conhecendo a técnica de fabrico do pão por levedação (Bauer e Czuppon, 1995). Foram em seguida as legiões romanas que ensinaram aos Gauleses as técnicas de panificação aprendidas com os gregos, técnicas essas que os gregos já tinham por sua vez herdado dos Hebreus (Bervas *et al.*, 1991). Desde esta origem longínqua, até à época moderna, a panificação foi evoluindo, com a introdução de fermentos, que mais não eram do que uma pequena parte da massa da fabricação precedente.

Von Stokar (1956) refere pinturas murais no Egipto que indicam que fermentos ácidos eram usados no Séc. XIII a. C.. Pederson (1971) diz existirem em Roma cerca de 250 padarias no ano 100 a. C. e cerca de 40 em Pompeia, quando o Vesúvio a destruiu em 79 a. C..

Segundo Rohrllich (1976), o uso de fermentos ácidos divulgou-se na Alemanha entre o Séc. I e VI a. C., usando centeio e cevada como matéria prima. Então, cerca de 1510 leveduras provenientes da fermentação da

cerveja foram adicionadas ao fermento ácido, de modo a aumentar a produção de gás durante a fermentação (Evans, 1990; Röcken e Voysey, 1995).

Ignorava-se, como é evidente, toda a composição microbiana dos fermentos. Sabe-se, no entanto, que os artífices Gauleses procuraram melhorar as tecnologias de fermentação. É conhecida a excelente reputação do sabor e leveza do pão gaulês, fermentado com adição de fermentos provenientes da cerveja. Estas primeiras incursões, utilizando a levedura de cerveja na panificação (que na época medieval e mesmo depois, se podia adquirir nas cervejarias), perdeu-se logo a seguir à Idade Média.

Só no fim do Séc. XVII apareceu a levedura de panificação, levedura que se introduziu, em associação, no fermento tradicional, independentemente das autoridades médicas da época a considerarem nociva para o consumidor (Bervas *et al.*, 1991). A produção específica de leveduras para padaria teve início na Europa entre os fins do Séc. XVII e o início do Séc. XIX, num processo não aeróbio, de baixo rendimento, em que as leveduras cresciam numa massa de cereal (Evans, 1990). Wolffin (1894) é considerado o primeiro investigador a demonstrar a existência de bactérias lácticas e leveduras nesses fermentos e a associar a acidificação com o metabolismo bacteriano (Röcken e Voysey, 1995).

Cerca de 1840, em França, um padeiro introduziu a levedura como único agente de fermentação. A selecção de leveduras específicas para a panificação, usando culturas puras, crescidas em meios com oxigenação eficiente durante a duplicação, com adição de uma fonte de carbono (a técnica de "fed-batch"), originou um grande aumento na qualidade e na quantidade da produção durante os 100 anos seguintes. Só em 1870 se criou a primeira fábrica para a produção industrial de levedura de padeiro. Mas, foi certamente a Primeira Guerra Mundial que, infelizmente, mais contribuiu para a difusão das técnicas de panificação com levedura. A falta de grão fez substituir a pasta de cereal usada inicialmente para o crescimento das leveduras, por melaço de cana ou beterraba (muitas vezes uma mistura dos dois), que além de mais barato, era de mais fácil armazenamento e uso (Evans, 1990). Técnicas de operação simples, fizeram assim desaparecer uma

geração de padeiros peritos na arte de trabalhar os fermentos, utilizando a cerveja fermentada.

Em Portugal, como na maior parte da Europa Ocidental, o fabrico industrial de pão, recorrendo ao uso de levedura de panificação comerciável, também ocorre em pleno Séc. XIX. Contudo, ainda hoje é notável a quantidade de "pães caseiros", conhecidos nalguns locais por broas, que se fabricam de Norte a Sul de Portugal. Os métodos envolvidos em tal fabrico são diferentes, tanto quanto o são a composição das farinhas utilizadas e os fermentos, também designados por iscos. No que respeita às farinhas, a variedade (principalmente milho, trigo e centeio) e a percentagem em que cada uma entra na elaboração de determinado pão, é extremamente variável, dominando, como seria de esperar, aquela que resulta do cereal mais abundante na região sendo, apesar disso, possíveis todas as combinações (Monteiro, 1950; Almeida e Pais, 1996a).

Hoje, quem trabalha com leveduras de panificação, tem de se defrontar com o impacto de novas tecnologias, com processos computadorizados de controlo, de manipulação genética, bem como com um número crescente de problemas relacionados com a qualidade, preço e acesso aos nutrientes. Tanto os fabricantes quanto os padeiros têm cada vez mais de satisfazer um público que procura alimentos diferenciados e considerados saudáveis, sem esquecer a pressão exercida quer pela moda quer pelas próprias técnicas publicitárias.

2. A IMPORTÂNCIA DO PÃO

Nos nossos dias, o pão é um alimento base de grande parte da população mundial dado, quer o seu intrínseco valor energético e proteico, quer as possibilidades que apresenta de ser consumido sob diversas formas, com outros alimentos. Mais de metade do total de calorias que são ingeridas pela população humana provêm do trigo. Apesar deste poder ser utilizado de formas diversas, o que se destina ao consumo humano é convertido em farinha para ser panificável. A variedade de pães hoje disponíveis, baseia-se

essencialmente no uso de farinhas de trigo e centeio. Outros tipos de pão, feitos à custa não só de trigo mas de milho e outros cereais, como a cevada e a aveia, representam cerca de 21% do total do pão fabricado. Apesar dos produtos de panificação serem produzidos e consumidos na maior parte dos países do mundo, existe uma variação considerável nos produtos de panificação dos diferentes países e não raras vezes de região para região dentro do mesmo país.

Há características distintas nos diversos tipos de pão: a primeira é a fermentação — existe pão não fermentado, fermentado com levedura (caso mais generalizado em Portugal), fermentado quimicamente ou ainda levedado por acção de bactérias. Outra, é a própria fórmula ou receita: em quase todo o mundo a maior parte do pão é fabricado à custa de uma mistura de farinha, água, levedura e sal, enquanto alguns contêm ainda quantidades apreciáveis de outros ingredientes como gordura, ovos e leite. Outras características como a forma e o tamanho, o volume específico (que varia desde um pão de baixa densidade e elevado volume — pão fabricado por exemplo na América do Norte, até um pão denso e escuro, típico da Europa Central), as características da crosta e as do próprio miolo, são aspectos importantes na avaliação da qualidade do pão (Ponte e Reed, 1982).

A taxa de extracção da farinha de trigo é, igualmente, de primordial importância na definição das propriedades do pão. Um maior conteúdo em cinzas, e capacidades de expansão e tampão, em farinhas de elevada taxa de extracção, afectam a actividade bioquímica da flora que intervém na fermentação e na qualidade da panificação. Diferenças nas variedades de trigo e na qualidade da farinha, alteram também a capacidade das bactérias quando utilizadas como iniciadores do processo fermentativo (Martínez-Anaya *et al.*, 1995). Parece-nos lícito referir que a qualidade no fabrico de pão, aceitável para fins comerciais é definida dentro de limites estreitos, numa larga gama de propriedades físicas, químicas e reológicas do trigo (Horimoto *et al.*, 1995).

Do que atrás foi referido decorreu a necessidade de desenvolver novas técnicas que possibilitassem o desenvolvimento e melhoramento da

indústria de panificação. Assim, para consumir tais carências a investigação orientou-se no sentido de atingir objectivos tais como: melhorar o sabor dos produtos de panificação, contribuir para aumentar o seu valor nutritivo, aumentar o volume da massa em consequência da produção de dióxido de carbono dimanado da fermentação dos hidratos de carbono da farinha, promover uma melhor estrutura e textura da massa em consequência do desenvolvimento de malhas proteicas resultantes em boa parte da expansão dos alvéolos gasosos (Burrows e Harrison, 1959).

3. A PANIFICAÇÃO

De um modo muito simplificado podemos assumir que a panificação mais não é do que a transformação da farinha em pão. Tal alteração implica a adição de quantidades de água perfeitamente determinadas e, de um modo geral, de um agente levedante. Estes ingredientes são então correctamente misturados e deixados a levedar até se considerar que a referida massa está pronta a ser moldada da forma desejada e cozida em forno apropriado até se obter o pão (Contamine *et al.*, 1995). É da qualidade da farinha e da fermentação sofrida pela massa que mais depende a qualidade do pão obtido (Monteiro, 1950). Sendo as farinhas tão importantes para o processo de panificação é sobre a sua constituição e propriedades que falaremos em primeiro lugar.

3.1. CONSTITUIÇÃO E PROPRIEDADES DAS FARINHAS

As farinhas, resultantes da moagem de grãos de diversos cereais, obtidas com maior ou menor grau de extracção, são a base do fabrico de qualquer tipo de pão. Como já foi referido, o trigo é o cereal mais utilizado em tal fabrico. Não devemos, no entanto, deixar de chamar a atenção para a importância crescente do milho, do centeio, da aveia, da cevada e mesmo da soja no fabrico destes produtos. Este aspecto torna-se tanto mais relevante, quanto mais relacionarmos o fabrico do pão com a predominância de um

cereal numa região, levando ao aparecimento de pães e broas com texturas e propriedades organolépticas características. O trigo e outros cereais têm como componente principal pequenos grânulos de amido além de proteínas e gorduras (Morgan *et al.*, 1992). Uma amostra tipo de farinha de trigo contém cerca de 80% de amido, 14% de proteínas, 4 a 5% de lípidos e 2% de outros hidratos de carbono (Petrofsky e Hosney, 1995). A farinha possui também um grau de humidade que varia, de um modo geral entre 10 e 15%.

Amido e outros hidratos de carbono

O amido é uma mistura de dois polissacarídeos, amilopectina e amilose, que no trigo se apresentam numa gama de 73-83% e 17-27% respectivamente. Qualquer destes polissacarídeos é formado exclusivamente por resíduos α -D-glucopiranosil, na maioria unidos por ligações 1- \rightarrow 4. Na amilopectina, em cerca de 5-6% dos resíduos estabelecem-se ligações 1- \rightarrow 4, bem como ligações tipo 1- \rightarrow 6 favorecendo esta organização a criação de uma estrutura altamente ramificada. Em contraste, a amilose é um polímero linear. A amilopectina possui um elevado grau de polimerização com pesos moleculares na gama dos 10^6 a 10^9 daltons (Morgan *et al.*, 1992). O amido dos cereais não pode ser considerado um sistema isolado, uma vez que amilopectina e a amilose são branqueadas a partir dos grânulos danificados e entram em contacto directo com as proteínas e outros componentes como as gorduras e as fibras. Estes componentes, mesmo em pequena quantidade, são relevantes para a textura do produto final (Eynard *et al.*, 1995).

O amido no pão é mais extensa e rapidamente hidrolizado do que quando se encontra na farinha ou na massa, se bem que não se tivessem encontrado diferenças significativas na fermentação convencional com leveduras em qualquer das variedades de trigo. O pão que sofreu fermentação ácida apresenta inicialmente uma amilase lenta, embora o nível final atingido seja o mesmo que o obtido para o pão feito da mesma farinha, pelo método convencional de fermentação por leveduras (Eynard *et al.*, 1995).

Dos outros hidratos de carbono que fazem parte da constituição das farinhas, os açúcares, nomeadamente, a glucose, a sacarose e a maltose

existem numa percentagem de 1 a 2%. A celulose, os sais minerais e as gorduras, no seu conjunto representam 5%.

Proteínas

O glúten (mistura de gliadina e glutenina), corresponde a 8 - 15% da farinha, sendo a proteína que constitui a fracção predominante e que controla as propriedades viscoelásticas das massas feitas à custa de farinha de trigo (Petrofsky e Hoseney, 1995). É constituído por partículas coloidais que, em contacto com a água, formam uma substância gelatinosa dotada de elasticidade e tenacidade notáveis. Estas propriedades físicas do glúten dependem, quer da qualidade do trigo donde provém, quer da conservação da respectiva farinha, verificando-se que a tenacidade varia em sentido inverso em relação à elasticidade e que, na massa, a tenacidade vai diminuindo com o tempo, enquanto a elasticidade aumenta, até se atingir um ponto em que ambos os parâmetros diminuem, tornando-se a massa cada vez mais plástica. Também o modo de distribuição das proteínas poliméricas (com ligações bissulfeto entre cadeias), tem um efeito positivo nos parâmetros elásticos das farinhas de trigo. Espera-se que as amostras com percentagem elevada de grandes polímeros tenham uma maior resistência (elasticidade) e requeiram um período de amassadura mais longo do que as que possuem uma menor proporção (Gupta *et al.*, 1993). Os conhecimentos actuais indicam que as subunidades de glutenina da proteína polimérica, de elevada massa molecular relativa (M_r) desempenham um papel primordial na determinação das propriedades funcionais da farinha. (Bekes *et al.*, 1994).

Entre os outros constituintes da farinha, que se destacam mais pela sua importância do que pela sua quantidade, estão as enzimas α e β -amilases. São constituintes integrantes das farinhas e estão directamente envolvidas na hidrólise do amido, em dextrinas ou mesmo em unidades de maltose, posteriormente usadas no processo fermentativo.

Lípidos

As reservas lipídicas do trigo são triacilglicerois. Pequenas quantidades de diacil, monoacilglicerois e ácidos gordos livres, podem ser quer intermediários na biossíntese de triacilglicerois, quer produtos de degradação produzidos por acção das lipases. Estes lípidos são colectivamente denominados apolares, embora alguns sejam moderadamente polares. Os outros lípidos do trigo (glicolípidos e fosfolípidos, também lípidos polares) são estruturais encontrando-se em várias membranas e organelos. Os lípidos do endosperma também se costumam dividir em não-amídicos, que afectam as propriedades da farinha de trigo durante a panificação, e amilo-lisofosfolípidos, que não afectam tal processo (Gan *et al.*, 1995).

3.1.1. OS ADITIVOS INCORPORADOS NAS FARINHAS

Não pensemos, no entanto, que a qualidade do pão que ingerimos depende em exclusivo de uma farinha resultante da moagem de um cereal, contendo os níveis inerentes de enzimas amilolíticas e outros compostos essenciais à panificação (Patterson e Damoglou, 1986; Scott e Kanhere, 1995; Scott *et al.*, 1995). Na sequência do que já foi referido, compreende-se que se venha adicionando às farinhas compostos de ordem vária, que de algum modo melhorem alguma(s) característica(s) desejáveis nesses produtos imprescindíveis à panificação. Tais substâncias são genericamente conhecidas como aditivos e entre eles contam-se diferentes tipos de enzimas e vitaminas bem como os chamados melhorantes e surfactantes.

As enzimas

A suplementação com α -amilase fúngica proveniente de *Aspergillus oryzae*, *A. niger* ou *A. awamori* é frequente sendo numerosos os efeitos e a influência dessa adição. As misturas de enzimas fúngicas contêm níveis mais elevados de glucoamilase do que o próprio cereal ou preparações de amilase a partir de bactérias. Este aspecto torna-se relevante quando a fórmula da

massa não contém açúcar e quando as leveduras apresentam baixa actividade da maltase. A hidrólise de dextrinas origina maltose e glucose que mantêm a taxa de fermentação, ao mesmo tempo que se produz açúcar adicional no produto final. A actividade da α -amilase faz baixar a viscosidade da massa ao mesmo tempo que afecta a sua suavidade. A textura do miolo é também influenciada pela quantidade e tipo de α -amilase presente na massa (Ponte e Reed, 1982).

À escala comercial também são adicionadas às massas enzimas proteolíticas, estimando-se que dois terços do pão branco fabricado nos Estados Unidos seja tratado com enzimas derivadas de *A. oryzae*. A proteólise durante a fermentação origina cadeias mais curtas de proteína que se reagrupam sob a forma de lençol, num filme proteico. Como consequência, o tempo necessário para atingir o máximo de extensibilidade diminui. Níveis apropriados de proteinase fúngica tornam por um lado as massas menos susceptíveis aos danos causados pela maquinaria envolvida na panificação e, por outro, promovem um aumento de volume e melhor simetria da massa. As proteinases provenientes de fungos e de bactérias suavizam o glúten durante a fermentação, proporcionando um balanço correcto entre a extensibilidade e a elasticidade nas massas quebradiças (Ponte e Reed, 1982).

A enzima lipoxigenase, constituinte menor da farinha de trigo, mas abundante na farinha de soja, mimetiza o efeito oxidante da levedura na massa fermentada. O seu efeito só ocorre enquanto o oxigénio se está a misturar com a massa. Para além deste efeito, esta enzima também aumenta a resistência ao colapso e inverte o efeito negativo da presença de compostos activos de dupla ligação e rápida actividade oxidante. Verificou-se ainda que tanto a levedura como a lipoxigenase têm efeitos semelhantes nas propriedades reológicas das massas. Distinguem-se pelo local e modo como actuam: a primeira exerce a sua acção durante a fermentação, através da fracção solúvel da farinha em água; a segunda actua durante o período de mistura, necessitando da presença de oxigénio (Kerr *et al.*, 1992).

As vitaminas

Para além das enzimas, qualquer que seja a sua origem, as vitaminas são igualmente adicionadas às farinhas com vários intuitos. Por exemplo, carências nutricionais das populações têm levado à inclusão nas massas de vitaminas do complexo B (Menz *et al.*, 1995).

Existem vitaminas anti-oxidantes, consideradas agentes reguladores de reacções oxidativas que decorrem no organismo, que reduzem o risco de doenças degenerativas. A incorporação de tais vitaminas (E, C e precursores de vitamina A) no pão é, então, importante. Dado que o trigo e outros cereais, apenas possuem traços de β -caroteno, tudo indica que as farinhas devam também ser enriquecidas em tais vitaminas (Ranhotra *et al.*, 1995). Na Europa, a situação relativa ao enriquecimento do pão em vitaminas é muito variável de país para país, havendo mesmo casos, como a França, que proibiram esta prática (Ponte e Reed, 1982).

Os melhorantes

Os melhorantes actuam oxidando o glúten da farinha, produzindo uma massa proveniente da fermentação por leveduras, mais apta a reter o dióxido de carbono, induzindo-lhe um maior volume final (Ponte e Reed, 1982). Entre as principais substâncias melhorantes contam-se o bromato de potássio, o propionato, o bicarbonato de sódio, o ácido cítrico e ainda fontes de nitrogénio assimiláveis, que podem também contribuir para aumentar a taxa de fermentação.

Os emulsionantes

Entre as tecnologias básicas usadas na produção à escala industrial de alimentos fermentados por leveduras, está o uso de emulsionantes. O modo como estes compostos químicos aumentam a superfície de contacto entre as diferentes fases envolvidas, tem vindo a ser estudado utilizando várias técnicas, que indicam que os emulsionantes reagem de um modo específico com os diferentes componentes da farinha (Hähnel *et al.*, 1995). Os emulsionantes mais conhecidos e utilizados são o monoéster diacetiltartárico

de glicerol (DATEM), o estearoil-2-lactilato de sódio (SSL), o monoestearato de glicerol (GMS-90) e o L-ascorbil-6-palmitato (AP).

A adição de DATEM à massa para produção de pão ou de produtos de panificação mais finos é comum porque se obtém um volume bom e constante, um miolo fino e uma taxa reduzida de secagem. Esta vantagem tecnológica de uma prolongada estabilidade pós-fermentação é conhecida e usada há décadas, no fabrico desses produtos (Hansen e Hansen, 1994).

Vários autores verificaram que a adição de qualquer dos emulsionantes provocava um enorme aumento na qualidade do pão, mas diminuía a suavidade do miolo e que a adição destes compostos em baixas concentrações melhorava a suavidade e aumentava substancialmente a qualidade do produto final (Farvili *et al.*, 1995; Toufeili *et al.*, 1995). O modo como actuam os emulsionantes foi estudado utilizando várias técnicas (reflexão de infravermelhos (IR); espectroscopia infra-vermelha de alta resolução), que evidenciaram a especificidade com que os emulsionantes reagem com os diferentes componentes da farinha de trigo (Hähnel *et al.*, 1995).

Os surfactantes

Os surfactantes, usados sózinhos ou em combinação, melhoram a qualidade das farinhas e do pão correspondente, uma vez que funcionam como agentes de flocculação. Certos surfactantes como a triestearina têm efeitos semelhantes aos da adição de gordura, provocando o aumento do volume panar; a sua forma mais eficaz é a de monoglicerídeo hidratado, que reduz a firmeza do miolo ao contrário do que acontece com a adição de gordura, levando a supor que é diverso o modo como actuam estes dois lípidos na referida firmeza (Roach e Hosenev, 1995). Há ainda outros trabalhos que indicam que a incorporação de gorduras e combinações de gordura-surfactante podem ter efeitos diversos: a adição de gordura não afecta nem a capacidade de ligar água, nem o conteúdo de amilose do amido solúvel. No entanto, ambas as propriedades ficam minoradas na presença de surfactantes (Toufeili *et al.*, 1995).

3.2. A MASSA PANAR E O SEU DESENVOLVIMENTO

A amassadura corresponde à etapa em que farinha e água juntamente com incorporantes que aí se dissolvem ou dispersam são trabalhados, originando uma mistura com características próprias. As substâncias que são normalmente incorporadas são o sal e o fermento. Este último tanto pode provir de pasta de levedura prensada como de um isco, também conhecido por fermento ou levedo. As leveduras seleccionadas especificamente para a panificação industrial são culturas puras, quase exclusivamente de estirpes de *S. cerevisiae*. São crescidas em meios com oxigenação eficiente durante a duplicação, com adição de uma fonte de carbono, originando uma produção rendível quer no que respeita à qualidade quer no que se refere à quantidade (Oda e Ouchi, 1989).

Logo que se inicia o processo de mistura que precede a amassadura entram em acção as enzimas amilolíticas da farinha. O amido é decomposto em dextrinas pela α -amilase e estas em maltose em resultado da presença da β -amilase. Cada molécula de maltose pode ser decomposta em duas de glucose na presença da α -glucosidase, processo que deve ocorrer, mesmo em escala reduzida, na massa panar. A levedura não tem poder amilolítico, apesar de, no caso de adaptação, poder atacar dextrinas. Aceita-se, no entanto, que as bactérias apresentem actividade amilolítica sobre a massa panar, podendo deste modo auxiliar a fermentação (Burrows, 1970). De um modo sucinto podemos dizer que os fenómenos que ocorrem na massa panar são causados, em grande parte, pelos microrganismos nela contidos e/ou têm origem na composição da farinha.

A libertação gasosa na massa decorre da fermentação alcoólica. Ocorre, desde o início da formação da massa, por acção das leveduras provenientes da pasta comercial ou do isco, sobre os açúcares da farinha, libertando-se CO_2 que fica retido no interior da massa e lhe confere uma estrutura esponjosa. A retenção do gás na massa deve-se à tenacidade do glúten, provocando um aumento do volume da massa à medida que a quantidade de gás produzido vai aumentando. Atingido o limite de

elasticidade do glúten, os alvéolos gasosos rebentam, o dióxido de carbono começa a escapar-se, a massa cessa de crescer mas a produção de CO₂ continua. Gastos os açúcares mais simples existentes na farinha (glucose, frutose, sacarose e maltose), produz-se-á maltose a partir de dextrinas e amido, impedindo a paragem da fermentação por esgotamento dos açúcares iniciais (Akdogan e Özilgen, 1992). Sendo o objectivo da fermentação panar a produção de dióxido de carbono, facilmente se deduz que quanto maior for a razão gás libertado/açúcar consumido, melhor será a levedação e consequentemente a levedura usada para esse propósito.

Embora a taxa de fermentação de cada açúcar assimilável seja semelhante na maior parte das leveduras de panificação, ocorre uma lenta diminuição dessa taxa nos casos em que a quantidade de maltase constitutiva é insuficiente para permitir uma transição rápida do uso de monossacarídeos como a glucose, presentes desde o início na massa, para a maltose produzida mais tarde. Durante o período de adaptação ao açúcar mais recente, pode ocorrer uma diminuição considerável na taxa de fermentação, seguida de um regresso à taxa normal.

A panificação propriamente dita baseia-se no aquecimento e simultânea transferência de massa que causa um aumento progressivo da temperatura e desidratação do produto. Estes fenómenos determinam a cinética de uma série de reacções químicas complexas (aumento de volume, gelatinização do amido, desnaturação do glúten e aquisição da cor acastanhada à superfície) responsáveis pela formação do miolo e da crosta do pão, que apresenta características sensíveis na textura, fragilidade, coloração da superfície e aroma (Zanoni *et al.*, 1995).

Existem vários métodos utilizados na produção de pão, que vão desde os industriais até aos mais tradicionais. Referiremos de seguida alguns dos principais processos industriais de fabrico do pão. Quanto aos métodos tradicionais serão descritos em pormenor no Capítulo 2.

3.3. PROCESSOS INDUSTRIAIS DE PRODUÇÃO DE MASSA PANAR

3.3.1. MASSA POROSA OU ESPONJOSA ("sponge dough")

Este método foi introduzido durante os anos 20 e é hoje um dos mais usados na indústria de panificação. A sua rápida aceitação deve-se, em parte, ao facto de produzir um aroma e paladar no pão, geralmente considerados superiores quando comparados com pães fabricados através de outros métodos (Ponte e Reed, 1982). De acordo com os autores citados este processo envolve etapas distintas a referir:

a. A primeira corresponde à mistura de um "starter", constituído por alguma farinha, água, levedura e nutrientes com cerca de 65% do total da farinha necessária ao fabrico. Este período é curto e tem como objectivo a uniformização dos ingredientes. Esta massa, já esponjosa, vai então ficar sujeita a fermentação em ambiente controlado (passando-se de 25°C para perto de 31°C), aumentando quatro ou cinco vezes o volume, em resultado da produção de CO₂.

b. Finalizada a fermentação, a massa é transferida para um misturador e a farinha e água restantes são adicionados. No misturador, origina-se uma massa macia e coesa, caracterizada por um aspecto brilhante. Após a adição da água e fornecimento de energia, as proteínas do trigo e os lípidos formam o glúten, que corresponde à fase contínua da massa e possui propriedades como a de formar uma película e reter o gás. Como as leveduras libertam CO₂, este gás difunde-se para as vesículas já formadas; a massa, função da natureza particular do glúten, é capaz de reter este gás e portanto levedar. A massa já misturada é deixada a repousar durante 20 a 30 minutos. Durante este período, recupera do "stress" mecânico, para ser capaz de continuar as etapas seguintes.

c. Logo em seguida a massa é dividida em porções com o peso e volume desejados e é deixada a repousar durante alguns minutos, período designado por permeabilização intermédia, cujo objectivo é compensar a perda de algum gás na fase anterior.

d. Segue-se a moldagem das porções da massa, e a sua colocação em unidades de fermentação (caixas de impermeabilização), a que corresponde o último período de fermentação anterior à cozedura.

e. Os pães impermeabilizados são então colocados no forno, verificando-se uma expansão no interior do próprio forno ("oven spring"). O vapor de água e os vapores de álcool contribuem para esta expansão. As enzimas estão activas até que o pão atinja cerca de 75°C; a esta temperatura o amido gelatiniza e a estrutura da massa solidifica. Quando a superfície do pão atinge 130°C-140°C, os açúcares e as proteínas solúveis reagem quimicamente, produzindo uma crosta de cor atractiva.

f. As etapas seguintes da panificação incluem o arrefecimento do pão acabado de cozer, corte (se necessário), acondicionamento e distribuição, chegando assim aos consumidores.

3.3.2. MASSA DE MISTURA DIRECTA ("straight dough")

Ao contrário do que foi descrito para a preparação da massa porosa ou esponjosa todos os ingredientes para elaborar uma massa contínua são combinados e misturados numa única operação. Após a mistura esta massa é deixada a levedar por um período de 2 a 4 horas, sendo então trabalhada de um modo semelhante ao descrito anteriormente. Estas massas requerem menos trabalho, tempo e equipamento quando comparadas com as primeiras, mas apresentam menor tolerância às variações que podem ocorrer ao longo da manipulação. Hoje, estas massas são usadas principalmente em pequenas padarias ou para a produção de pães especiais em grandes unidades de panificação (Hsu *et al.*, 1979; Ponte e Reed, 1982).

3.3.3. MASSA DE MISTURA CONTÍNUA ("continuous mix")

O objectivo do uso deste método, introduzido nos anos 50 nos Estados Unidos, era obter em termos industriais, pão a baixo custo de produção e de maior uniformidade. A massa obtida por este método é muito

mais macia e morna (cerca de 38°C) do que a massa esponjosa. O pão obtido por este método difere do pão "tradicional", pois tem um miolo com uma estrutura muito mais fina e frágil. Estes factores somados ao paladar referido por alguns consumidores, torna este tipo de pão menos desejável do que o feito a partir de massa porosa (Ponte e Reed, 1982). Também aqui se podem definir algumas etapas principais:

a. Um fermento (com ou sem alguma farinha), é colocado a fermentar num tanque confinado, durante cerca de uma hora.

b. Numa segunda etapa, água, sal e açúcar são adicionados ao sistema, continuando a fermentação. No fim da fermentação o produto é transferido para um pré-misturador e arrefecido. A farinha e a água restantes, açúcar, gordura, oxidante e outros ingredientes opcionais são igualmente adicionados no pré-misturador.

c. Depois destes ingredientes estarem misturados, a massa é transportada para uma câmara de desenvolvimento onde fica sob pressão e sujeita a intensa energia mecânica. Nestas condições, a massa desenvolve-se rapidamente e é então posta em recipientes da própria câmara (Ponte e Reed, 1982).

3.3.4. UTILIZAÇÃO DE FERMENTOS LÍQUIDOS ("liquid ferment")

São conhecidos desde longa data métodos de fabrico de pão em que se usam fermentos líquidos ou semi-líquidos. Estes sistemas combinam o equipamento padrão de mistura e processamento das massas, com bombas e tanques para manusear os líquidos fermentados. As vantagens mais frequentemente referidas destes sistemas sobre o método tradicional de panificação incluem: economia no espaço de equipamento e de trabalho, maior flexibilidade no processamento e aumento da higiene. Neste sistema é preparado um fermento líquido que é deixado a fermentar, de modo idêntico ao descrito para as massas de mistura contínua. Após a fermentação, o fermento é bombeado para um misturador de massa, onde se combina

com os restantes ingredientes. A massa é misturada e posteriormente sujeita às mesmas etapas de tratamento descritas para a massa esponjosa (Hsu *et al.*, 1979; Ponte e Reed, 1982).

4. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE LEVEDURA

A levedura de panificação pode ser correctamente considerada um dos mais antigos produtos da fermentação industrial. E, embora o seu ciclo de vida como um produto industrial ultrapasse uma centena de anos, continua a ter um papel insubstituível na panificação. Desempenha aí pelo menos quatro importantes funções: aumenta o volume da massa, pela libertação de CO₂ durante a fermentação dos hidratos de carbono disponíveis na farinha; desenvolve a estrutura e textura da massa, através da elasticidade provocada pela expansão das bolhas de gás; melhora o aroma e paladar dos produtos resultantes; contribui (em menor grau) para o valor nutritivo do pão (Ponte e Reed, 1982; Beudeker *et al.*, 1990; Evans, 1990).

Como já foi referido anteriormente as leveduras seleccionadas especificamente para a panificação industrial são culturas puras, quase exclusivamente de estirpes de *S. cerevisiae*, uma vez que, até ao momento, só se conhece a comercialização de uma estirpe de *Torulaspota delbrueckii* SANK 50268, no Japão (Ohshima *et al.*, 1987). São crescidas em meios com oxigenação eficiente durante a duplicação (técnica de "fed-batch"), com adição de uma fonte de carbono originando uma produção rendível quer no que respeita à qualidade quer no que se refere à quantidade (Oda e Ouchi, 1989).

As características das leveduras de panificação produzidas hoje em dia são a súmula de requisitos impostos quer pelos padeiros quer pelos produtores de levedura. O padeiro necessita de uma levedura que seja razoavelmente tolerante a uma grande variedade de condições de armazenamento e apresente boa capacidade fermentativa em vários tipos de

massas, fabricadas em diferentes condições. O produtor necessita de uma levedura que, por razões económicas, cresça rapidamente e se multiplique sem qualquer alteração nas suas características essenciais (Ponte e Tsen, 1987).

Desde 1920 que o melaço tem sido a matéria prima bruta para a produção de levedura de panificação. Quer o melaço de beterraba quer o de cana são usados, separadamente ou em mistura, de modo a fornecer açúcares fermentáveis, como as principais fontes de carbono e energia, juntamente com minerais, elementos-traço, vitaminas e algum nitrogénio orgânico (aminoácidos). Adicionalmente, nitrogénio sob a forma de amónia, sais de amónia ou ureia e fósforo (sob a forma de ácido fosfórico ou fosfatos) devem ser sempre adicionados. Com frequência, algum magnésio e/ou zinco tem também de ser fornecido. Quando uma mistura de melaço de beterraba com pelo menos 20% de melaço de cana é utilizada, não há necessidade de um suplemento extra de biotina; se é utilizado melaço de cana puro, a adição de pantotenato pode ser necessária. Embora a maioria dos melaços contenha tiamina suficiente para um crescimento óptimo das leveduras, esta vitamina é frequentemente adicionada, uma vez que estimula a actividade fermentativa da levedura na massa (Beudeker *et al.*, 1990; Menz *et al.*, 1995).

Poder-se-ia concluir que o melaço não está longe de ser o substrato ideal para a produção de leveduras de panificação. Apesar de existir alguma verdade neste facto, o melaço pode também conter compostos perniciosos para o crescimento e/ou qualidade das leveduras. Dentro destes compostos podem referir-se os coloides e os sólidos em suspensão, as substâncias corantes, ácido sulfuroso, nitratos e nitritos, bem como fungicidas e produtos sanitários (usados nas fábricas de açúcar), ácidos gordos de cadeia curta (especialmente ácido butírico, que é altamente tóxico para as leveduras), hidroximetilfurfural e um vasto número de compostos em quantidades inaceitáveis. Tendo em conta estes problemas, o efeito inibidor da fermentação pode ser consideravelmente reduzido ou até totalmente eliminado se a solução acídica do melaço for sujeita a arejamento prévio (Fattohi, 1994a; 1994b).

Nas várias fontes de carbono, hoje utilizadas no crescimento de leveduras de panificação, incluem-se, entre outras, a lactose, proveniente do soro do queijo, pentoses e hexoses oriundas dos sulfitos das águas residuais da indústria do papel, o amido e a linhocelulose. Para que estas fontes de carbono possam ser utilizadas, devem sofrer um pré-tratamento, de modo a produzirem açúcares assimiláveis, ou então, as leveduras em causa terão de geneticamente manipuladas, de modo adequado. De qualquer modo, em todos os casos, as novas fontes de carbono terão de ser suplementadas com compostos, como por exemplo as vitaminas, antes de serem utilizadas no meio de crescimento de *S. cerevisiae* (Evans, 1990). Nos países mais desenvolvidos, a grande maioria dos produtores de levedura de panificação pesquisam continuamente estirpes de *S. cerevisiae* com elevada capacidade fermentativa.

A produção de levedura de panificação inicia-se com uma pequena amostra de uma cultura pura. Esta amostra é em seguida usada para inocular o primeiro de uma série de fermentadores de tamanho sucessivamente maior. Nos primeiros ocorrem fermentações mediantemente arejadas. Nestes estádios, as condições são tais, que ocorre formação de etanol. Somente os últimos dois, às vezes três estádios são levados a cabo com pleno arejamento e aumento do fornecimento de melaço. Estas fermentações em "fed-batch" são levadas a cabo em fermentadores de grande capacidade, conforme está ilustrado na Fig. 1.1..

É sabido que a formação aeróbia de etanol na presença de elevadas concentrações de açúcar, conhecido como o efeito de Crabtree ou "efeito da glucose" é perfeitamente distinto do efeito de Pasteur, em que o etanol é formado em condições de ausência de oxigénio. O processo de "fed-batch" tem sido empregue na produção industrial de levedura. Neste processo, se o açúcar está em excesso, a sua acumulação no meio permitirá a produção de etanol, mesmo na presença de oxigénio suficiente. A produção de etanol é a maior responsável pela diminuição do rendimento celular do açúcar. Por outro lado, se o provimento de açúcar é diminuto, a produtividade volumétrica de massa celular não atinjará o máximo.

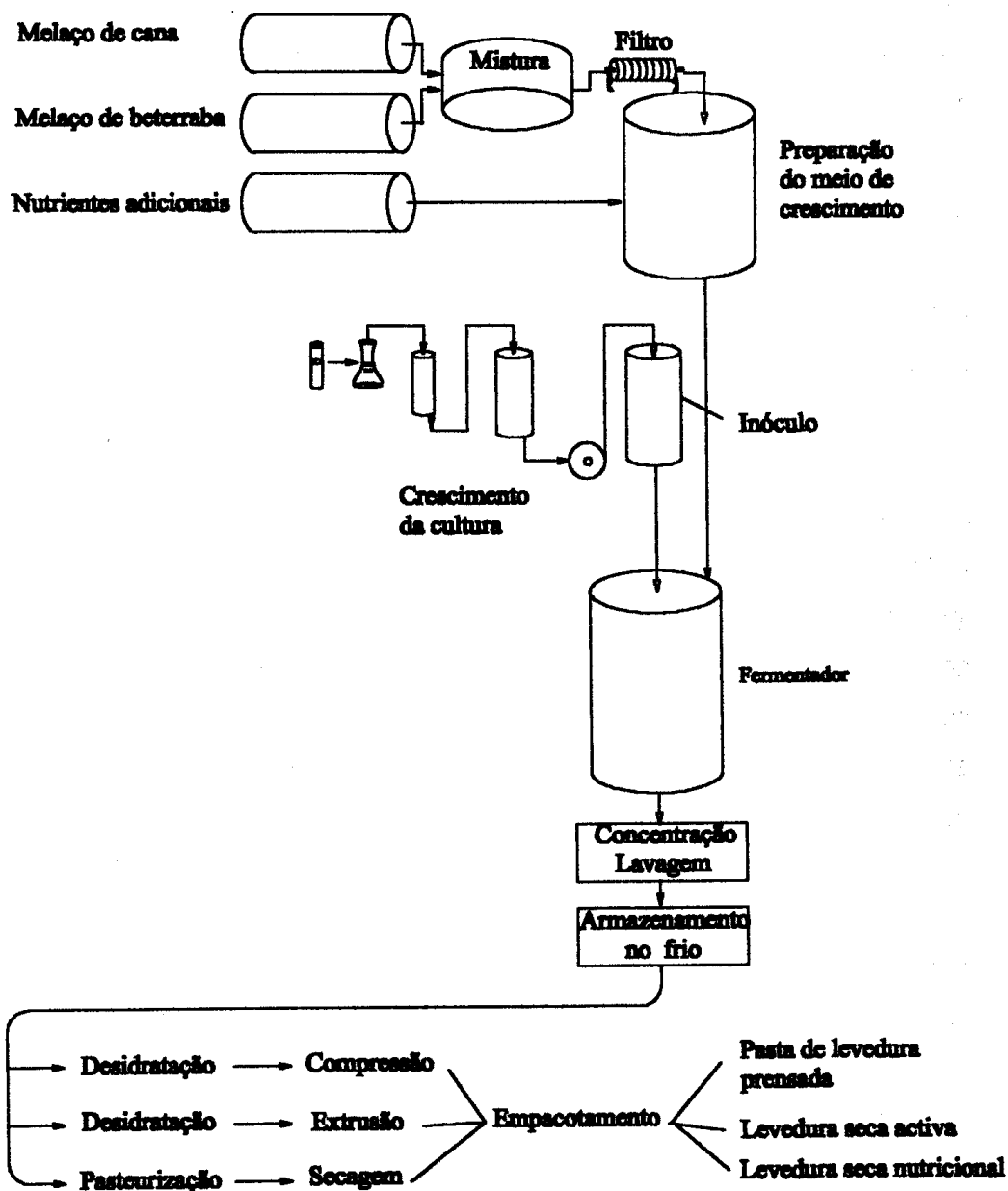


Fig. 1.1. As diferentes etapas de produção comercial de levedura de panificação.

(Adaptado de Atlas, 1988).

Na produção de leveduras de panificação é importante que em cada momento a concentração de açúcar se mantenha a um nível baixo mas óptimo (Dairaku *et al.*, 1981). Pode então inferir-se que a produção de levedura de panificação através de "fed-batch" implica o controlo da concentração de etanol, de modo a obterem-se rendimentos elevados. O tempo de fermentação é normalmente da ordem das 12-20 horas, nas quais são produzidas à volta de 20 a 30 toneladas de levedura fresca. Logo que o fornecimento de substratos cessa, o arejamento normalmente continua a um nível reduzido por mais cerca de meia hora, de modo a que as células de levedura atinjam maturidade e uniformidade (Beudeker *et al.*, 1990).

Os passos seguintes incluem a separação do meio por centrifugação, lavagem e filtração. A pasta de levedura fresca obtida a partir dos filtros é relativamente estável e pode ser guardada durante alguns dias em ambiente refrigerado sem perda de qualidade. A pasta de levedura pode posteriormente ser concentrada através de filtros sujeitos a prensagem ou a rotação sob vácuo. A pasta de levedura pode ser preparada para ser embalada, por mistura inicial com pequenas quantidades de água (para ajustar o nível dos sólidos a um valor de cerca de 30%), emulsionantes e gorduras. Os emulsionantes melhoram a aparência da levedura, enquanto as gorduras facilitam a operação de corte. A mistura de levedura é separada dos aditivos de modo contínuo, e em seguida é dividida em blocos com o peso desejado. Os blocos de levedura são então embrulhados em papel vegetal e selados pelo calor. Uma temperatura de 4°C ou mesmo mais baixa é usada para conservar a levedura. Posteriormente, a levedura é rapidamente transportada em vagões refrigerados até aos centros de distribuição, e daí até aos consumidores.

Em termos comerciais, as leveduras podem apresentar-se ao público de dois modos distintos: em pasta prensada, também conhecida por levedura fresca, e levedura dessecada.

4.1. A LEVEDURA PRENSADA

A levedura fresca prensada é o modo mais comum de apresentação das leveduras de panificação. É vendida em blocos de levedura previamente filtrada de cerca de 1Kg, embalados em papel vegetal e/ou celofane ou então sob a forma de grânulos de forma irregular normalmente embalados em sacos de polietileno de 25Kg. A levedura prensada apresenta um conteúdo de cerca de 24 - 34% (p/p) e um conteúdo proteico (definido por Kjeldahl-6,25) de 42 - 56% (sob a forma de peso seco). Está pronta a ser usada de imediato e se tiver sido produzida correctamente deverá apresentar bons resultados em qualquer tipo de massa. Este tipo de levedura é deteriorável, devendo ser guardada a baixas temperaturas (0 - 4°C). A estas temperaturas pode durar 3 a 4 semanas, com um ligeiro decréscimo na capacidade fermentativa. Para massas congeladas é recomendado o uso de levedura prensada tão fresca quanto possível (Beudeker *et al.*, 1990).

Esta levedura pode facilmente ser misturada com água, formando uma suspensão que se pode adicionar a farinha quando se desejar.

O uso da levedura nesta forma conquistou a indústria de panificação por se tratar de um processo simples, originar um trabalho uniforme e uma qualidade do produto final constante.

4.2. A LEVEDURA SECA OU DESSECADA

A levedura dessecada pode aparecer sob duas formas: levedura seca activa (ADY) e levedura seca instantânea (IDY). A ADY é conhecida desde os anos 20, mas foi só após a 2ª Guerra Mundial que a sua produção comercial se desenvolveu (Biltcliffe, 1972). É vendida em pacotes selados sob vácuo ou contendo um gás inerte como o nitrogénio. O seu tempo de duração nestas condições é de cerca de um ano. Para melhores resultados, antes de ser utilizada, a ADY deve ser re-hidratada com água a 35 - 45°C.

A levedura dessecada instantânea foi a última a aparecer, por volta de 1970. Para obter uma IDY de elevada qualidade, a levedura prensada

com elevado conteúdo em proteína deve ser preparada através de um processo rápido de dessecação. A capacidade fermentativa da IDY, em condições óptimas de aplicação é muito próxima da levedura prensada. A duração em embalagens sob vácuo é comparável à da ADY. A IDY apresenta-se correntemente sob a forma de pequenas varetas, altamente porosas e fáceis de re-hidratar, permitindo o seu uso imediato, sem prévia re-hidratação. Ao contrário da ADY, a IDY contém sempre um qualquer tipo de emulsionante, que é adicionado à pasta de levedura antes da desidratação; ésteres de monoglicérideos do ácido cítrico e ésteres de poliglicerol são usados com frequência (Beudeker *et al.*, 1990).

5. SELECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS PARA PANIFICAÇÃO

Muitas das características estudadas nas estirpes de leveduras para panificação e, provavelmente, determinadas pela interacção de muitos genes têm ainda de ser profundamente analisadas em termos genéticos. A fermentação da massa é obviamente um processo complexo, embora muitos aspectos (*i.e.* transporte e hidrólise de alguns dissacarídeos, particularmente a sacarose e a maltose), sejam hoje muito bem compreendidos em termos de mecanismos moleculares. No que diz respeito ao desenvolvimento de estirpes de panificação, muito do trabalho conhecido é ainda empírico, e depende essencialmente de testes bem adaptados e de processos de selecção capazes de avaliar, em termos industriais as características consideradas importantes (Evans, 1990).

5.1. MÉTODOS DE SELECÇÃO

A execução de testes em pequena escala para selecção das principais características comerciais é essencial para todos os programas de

desenvolvimento de novas estirpes de panificação, especialmente quando os métodos correntemente usados para a sua obtenção, principalmente a hibridização, geram um grande número de estirpes para avaliação. Os testes microbiológicos comuns em placa de Petri, são úteis apenas para a identificação das características genéticas mais simples, como a fermentação dos açúcares. Os processos ainda hoje utilizados em muitos laboratórios industriais para medição da capacidade fermentativa das leveduras nas massas utilizando o fermentómetro baseiam-se nos introduzidos por Burrows e Harrison (1959) mas são muito lentos e caros.

Actualmente, muitos produtores de levedura procuram estirpes que fermentem de um modo eficiente e rápido a maltose, em massas doces, no "sour-dough" e em todos os tipos de massas que contenham ácidos que funcionem como agentes fungistáticos. De um modo geral, porque a fermentometria se torna claramente impossível, o caminho seguido para a escolha de, por vezes, vários milhares de estirpes obtidas por hibridização, é a utilização de pelo menos cinco testes, que evitam medidas de libertação gasosa e que foram patenteados como o procedimento a seguir para o desenvolvimento de uma estirpe (Clement e Loiez, 1983). O primeiro teste mede a taxa de crescimento, através do aumento da absorbância de uma cultura em balão agitado, eliminando deste modo as estirpes de crescimento lento e de baixo rendimento. O segundo teste, do mesmo modo que o primeiro é um teste de crescimento, mas conduzido na presença de ácido acético ou de uma mistura de ácido acético e ácido láctico. Este teste informa sobre a tolerância das leveduras aos ácidos e tem o benefício de poder apresentar uma correlação entre a tolerância aos ácidos e o desempenho em massas doces. O terceiro teste mede a capacidade fermentativa da maltose, na presença de glucose, determinando a quantidade de maltose que resta, quando a glucose inicialmente presente foi completamente consumida. A actividade da invertase é medida no quarto teste e informa sobre a osmotolerância, completando-se com a quinta prova, que determina o tempo de latência da estirpe no meio de crescimento usado no primeiro teste, mas ajustado para 20% de sacarose. Os testes em placa

podem ser usados, como testes preliminares, na determinação do consumo da maltose e na actividade da invertase, depois da mutagénese, mas não permitem uma total confiança não podendo substituir os testes quantitativos acabados de descrever. Recorrendo a estes testes foram escolhidos milhares de híbridos, obtidos por cruzamento entre estirpes que fermentavam rapidamente a maltose e outras que apresentavam baixos níveis de invertase. Os testes de larga escala em híbridos seleccionados, são uma etapa essencial após uma primeira escolha; rendimentos e propriedades fermentativas, após propagação em fermentadores de volumes maiores, só são utilizados para um pequeno grupo de estirpes que sofreram uma selecção prévia (Evans, 1990). Utilizando estes testes, Clement e Loiez (1983) patentearam dois híbridos, seleccionados de entre os milhares por eles testados, que apresentavam uma rápida fermentação da maltose, osmotolerância, alta produção de biomassa em meio de melaço e boa capacidade de produção de levedura seca activa com uma tolerância melhorada à re-hidratação.

É possível que outros testes para selecção e avaliação de estirpes possa ser desenvolvido tendo em conta outro tipo de características se, por exemplo, parâmetros bioquímicos simples forem identificados. Alguns estudos mostraram existir correlações entre as actividades da α -glucosidase e da α -D-glucopermease e ambas com a capacidade fermentativa na massa e o tempo requerido para a massa atingir um volume determinado (Rychtera e Ticha, 1983). Igualmente, examinando a actividade das enzimas envolvidas no metabolismo respiratório e fermentativo em culturas aérobias com uma concentração de glucose limitada, verificaram que a actividade da piruvato descarboxilase apresentava uma boa correlação com a taxa de fermentação (Van Dijken *et al.*, 1983).

Apesar de termos ao nosso dispor uma vasta gama de métodos que nos permitem alterar as propriedades genéticas das estirpes de leveduras, há razões para se crer que todas as estirpes, correntemente utilizadas na fermentação da massa panar, foram obtidas pelas mais antigas técnicas disponíveis, nomeadamente a hibridização. Apesar disso, especialmente durante as últimas décadas, outras técnicas, como o uso do DNA

recombinante, têm vindo a ser utilizadas na introdução de informação genética em estirpes de leveduras. No entanto, nenhuma das leveduras de panificação actualmente produzida comercialmente, foi manipulada através de técnicas de DNA recombinante. Este facto reflecte o conhecimento limitado das bases genéticas de muitas propriedades comercialmente importantes, como a existência de dúvidas sobre a legalidade e possível resistência dos consumidores a leveduras de panificação contendo DNA heterólogo (Rose e Vijayalakshmi, 1993).

Capítulo 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA FLORA ZIMOLÓGICA DE ISCOS
CASEIROS

1. INTRODUÇÃO

Enquanto que a microflora dos "sour-dough" e as bases da sua produção têm sido relativamente bem estudadas (Kline *et al.*, 1970; Sugihara *et al.*, 1970, 1971; Kline e Sugihara, 1971; Martínez-Anaya *et al.*, 1994; Gobbetti *et al.*, 1995b), no caso do pão tradicional português fabricado à base de milho e centeio, pouco se sabe sobre a flora zimológica envolvida na sua fermentação. Adicionalmente, as possíveis interações entre as leveduras e outros microrganismos aí presentes, principalmente as bactérias lácticas, são também desconhecidas. O único estudo que se conhece sobre iscos de pão tradicional português remonta aos anos 50 (Monteiro, 1950) e é omissivo no que respeita à região do Minho.

Assim, numa primeira etapa deste trabalho o nosso objectivo foi a recolha dos iscos ou fermentos no local da sua utilização, verificando-se a sua constituição no que diz respeito aos tipos de farinha utilizados e aos processos de conservação. Procedeu-se depois ao isolamento e identificação das leveduras presentes bem como à sua caracterização no que diz respeito à ocorrência de actividade "killer".

Referiremos em seguida alguns dos tipos de pão tradicional mais comuns dando particular ênfase ao fabrico da broa, vulgarmente consumida na região Norte de Portugal. Serão também referidos alguns aspectos relacionados com a caracterização do fenómeno "killer" em leveduras e a sua presença em sistemas naturais.

2. ALGUNS MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRODUÇÃO DE PÃO

São conhecidos vários tipos de pão tradicional. A maioria desses pães têm origem em fermentos ou iscos constituídos por uma pasta ou massa

cuja composição pode variar. Nalguns casos trata-se de uma mistura de farinha(s) de cereal(ais) e água, à qual se pode adicionar ou não cloreto de sódio. É aí que frequentemente se insere uma microflora variável, onde podem coexistir uma ou mais estirpes de levedura, fungos filamentosos e mesmo bactérias. As leveduras desempenham algumas funções relevantes: não só produzem CO₂ para levedar a massa, originando uma boa textura no pão quando convenientemente cozido, mas também uma mistura complexa de compostos químicos que contribuem para o seu aroma e paladar (Oda e Tonomura, 1994).

2.1. O PÃO ACHATADO

Existem mais do que 60 tipos de pão achatado feitos no mundo inteiro que em muitos casos foram o suporte alimentar das populações durante muitos séculos. Este tipo de pão apresenta constituição diferente de região para região, mas os ingredientes básicos são a farinha, água, sal e naturalmente um fermento "starter" que possui ou bicarbonato de sódio e/ou levedura de panificação (Farvili *et al.*, 1995; Hashmi e Wootton, 1995). Ocasionalmente, outros ingredientes podem ser adicionados para melhorar o paladar e o aroma.

Na região Mediterrânea e no Norte de África, uma espécie de trigo (*Triticum turgidum* var. *durum*) é usada na formulação de alguns tipos deste pão. Estudos feitos com base nestas pastas indicam a grande importância do glúten, tornando-as capazes para o fabrico de pão; o seu conteúdo em proteína e a composição das subunidades de glutenina, são os factores chave na determinação das propriedades do pão feito à custa de tal massa. Certas sub-unidades de gluteninas de alta ou baixa massa molecular relativa (M_r) contribuem para a variação das propriedades reológicas e panificáveis da farinha feita à custa dessa variedade de trigo (Boggini *et al.*, 1995).

2.2. O PÃO ÁCIDO — " SOUR-DOUGH"

O "sour-dough" é caracterizado pela presença de bactérias lácticas e leveduras, coexistindo em condições associativas complexas e regulado por algumas interações bioquímicas (Gobbetti *et al.*, 1994). O seu fabrico é ainda um processo empírico, longo e difícil de controlar: um iniciador retirado de uma massa já desenvolvida é activado com água e farinha que, depois de devidamente fermentada, é cozida. O processo de fermentação demora vulgarmente algumas horas (Mascarós *et al.*, 1994; Gélinas *et al.*, 1995).

O "sour-dough" é um bom exemplo de um pão saboroso e aromático e o interesse no fabrico de pão de trigo com "sour-dough" aumentou em muitos países da Europa nos últimos anos. As vantagens do seu uso são, nomeadamente, o melhoramento das propriedades das massas que se tornam de mais fácil manuseamento e a obtenção de um pão melhor, mais apaladado e aromático. Adicionalmente, o tempo de duração do pão após o fabrico torna-se maior, uma vez que se retarda o processo de secagem (Hansen e Hansen, 1994; Gélinas *et al.*, 1995).

O paladar do pão ácido feito à base de trigo é mais rico e mais aromático do que o pão de trigo mais vulgar, facto que se pode atribuir ao longo período de fermentação da massa ácida. Os produtos de fermentação, ácido acético e ácido láctico são compostos importantes no aroma do pão ácido e é suposto que o ácido acético aumente o efeito de outros compostos aromáticos no pão de trigo (Hansen e Hansen, 1994).

A microflora constitutiva do "sour-dough" feito à base de trigo foi estudada, identificando-se várias espécies de bactérias lácticas homo- e heterofermentativas e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. exiguus* e *S. inusitatus*) (Sugihara *et al.*, 1971; Gobbetti *et al.*, 1995). As bactérias lácticas homofermentativas são responsáveis pelo desenvolvimento de um pão ácido com boa textura e miolo elástico, enquanto as bactérias lácticas heterofermentativas melhoram o paladar e contribuem para o processo de levedação. Este processo é fundamentalmente determinado pelo CO₂ produzido através da actividade fermentativa das leveduras presentes. O

CO₂ fica retido no glúten do trigo que sendo extensível se transforma num filme visco-elástico, que influencia o volume do pão e a densidade do miolo. A fermentação do "sour-dough" é fortemente influenciada pela composição da farinha usada e pelas interações metabólicas entre as bactérias lácticas e as leveduras (Stolz *et al.*, 1993; Gobbetti *et al.*, 1995). Dependendo do tipo, género, espécies, estirpes e proporção da microflora presente, é possível encontrar indiferença, antagonismo, competição ou associações comensais entre os microrganismos para os substratos fermentáveis disponíveis, como ocorre no pão ácido de San Francisco, onde a levedura predominante, *Saccharomyces exiguus* não fermenta a maltose, mas esta por sua vez é fermentada pelo *Lactobacillus sanfrancisco*. A levedura *Candida boidinii* não fermenta a maltose (Lodder e Van Rij, 1967); como se trata de um microrganismo relevante no farelo das massas de trigo, torna-se importante compreender a sua inter-relação com os outros microrganismos presentes (Barber *et al.*, 1989).

Os aspectos mais relevantes no "sour-dough" são por um lado a fermentação que influencia o paladar e textura do pão de trigo e centeio e por outro, o metabolismo dos hidratos de carbono das bactérias lácticas (Mascarós e Collar, 1994). Neste complexo ecossistema, o metabolismo destes compostos é afectado, quer pela composição da farinha, quer pelas interações das leveduras. A concentração de hidratos de carbono solúveis (maltose, sacarose, glucose e frutose) da farinha de trigo é inferior a 1% e varia com o tipo (claro ou escuro) da farinha e com a acção da α - e β -amilase nos grânulos de amido. A actividade da invertase e a capacidade fermentativa da maltose, sacarose, glucose e frutose das leveduras, reduz rapidamente a concentração dos hidratos de carbono solúveis e interagem com a fermentação das bactérias lácticas, durante a levedação do "sour-dough" (Gobbetti *et al.*, 1984).

Culturas congeladas ou dessecadas de *L. sanfrancisco*, que fazem encurtar o tempo de fabrico do pão, bem como o uso de bases comerciais dessecadas que fazem diminuir o tempo de fermentação, têm vindo a ser utilizadas na produção deste tipo de pão, apesar de poder ocorrer perda de

aroma. Como também já foi referido, este pão ácido pode ser melhorado através de substâncias diversas, conforme os objectivos distintos que se pretendem atingir, pelo enriquecimento em produtos vários. Assim, podemos referir: (i) Culturas dessecadas ou congeladas de *Lactobacillus sanfrancisco*; (ii) Bases dessecadas; (iii) Vinagre; (iv) Produtos lácteos, substâncias de um modo geral utilizadas com o objectivo de diminuir o tempo de fermentação (Gélinas *et al.*, 1995). Apesar de uma aturada investigação demorou quase uma centena de anos para se definir uma cultura de arranque para a preparação dos fermentos ácidos, patenteada como "San Francisco starter" (Röcken e Voysey, 1995).

3. O PÃO TRADICIONAL DO NORTE DE PORTUGAL

Em Portugal o fabrico industrial de pão também recorre ao uso de levedura de panificação prensada mas, além dos diversos pães existentes no mercado, ainda hoje a variedade de "pães caseiros" e broas que se fabricam no país é relevante. Nas áreas rurais principalmente do Norte do País, prepara-se um tipo especial de pão à base de milho e centeio, utilizando um isco ou fermento, que não é mais do que uma porção da massa guardada do fabrico anterior e que funciona como iniciador do processo ("starter"). Este isco iniciador é um sistema biológico natural, caracterizado pela presença de leveduras e bactérias lácticas, vivendo em associações complexas, num sistema de algum modo similar ao existente no pão ácido ("sour-dough"), menos conhecido porque menos estudado e portanto com algumas características interessantes (Almeida e Pais, 1996a). Parte-se assim de uma cultura de iniciação que depois de prévia fermentação é adicionada à farinha e a outros produtos (água, cloreto de sódio) para, após a amassadura e novo período de fermentação, ser dividido em porções menores que ulteriormente sofrerão cozedura. Trata-se assim, como no "sour-dough", de um sistema longo e descontínuo.

Podemos, à partida, dizer que há fermentos resultantes da mistura de diversos constituintes que a seguir a um curto repouso, são incluídos nas farinhas que formarão massas e após cozimento originarão o pão; outros, partindo de alguns ingredientes e de uma cultura de iniciação, necessitam de uma prévia e mais longa fermentação, antes de serem adicionados à farinha e aos outros produtos para formarem uma massa panificável e se poder igualmente obter pão.

O interesse que o processo de panificação tradicional do Norte de Portugal nos despertou, aliado à possibilidade da sua documentação em imagens, fez com que deixássemos aqui registados alguns aspectos interessantes da sua manufactura.

O fabrico do pão inicia-se a partir de um isco, pequena porção de massa da fabricação anterior (Fig. 2.1). A este isco ou fermento é adicionada farinha e água bem quente, que após amassadura origina uma cultura de iniciação (Fig. 2.2 A; B) que é deixada algum tempo a levedar. É esta cultura que em seguida servirá de inóculo à massa, por adição da restante farinha e água quase fervente e sal, que depois de devidamente amassada é "arrumada" na masseira (Fig. 2.3 A) e deixada a levedar durante algumas horas (Fig. 2.3 B). Após a levedação, a massa apresenta o aspecto que se pode constatar na Fig. 2.4.A. É então que a massa é dividida em porções que são devidamente padejadas numa gamela de madeira e vertidas numa pá, que as introduzirá num forno previamente aquecido e varrido. É nesta altura que uma porção da massa é posta de lado para servir de isco à fornada seguinte. Quando toda a massa está enfornada, a porta do forno é barrada com uma mistura de cinza e água conforme a Fig. 2.4 (B e C). Após a cozedura, a porta do forno é aberta e quando a temperatura o permite, as broas podem ser retiradas, apresentando o aspecto que se observa na Fig. 2.5. Todos estes registos foram feitos na freguesia de Cantelães, Vieira do Minho.



Fig.2.1. Aspecto de um isco. A massa apresenta uma mistura de milho e centeio numa razão de 2,7:1, respectivamente



Fig.2.2. O isco é misturado com nova farinha (A) e água bem quente (B).



Fig.2.3. Pronta, a massa é "arrumada" na masseira (A) e deixada a levedar durante algumas horas (B).



Fig.2.4. Aspecto da massa já levedada (A). A massa depois de fermentada é dividida em pequenas porções, que após serem padejadas, são colocadas numa pá de madeira que as introduz num forno de tijolo previamente aquecido (B) e depois tapado com uma porta de madeira ou ferro que é barrada com uma mistura de cinza e água (C).



Fig.2.5. Aspecto das broas após terem saído do forno.

4. IMPORTÂNCIA DO FENÓMENO "KILLER" EM LEVEDURAS

Algumas estirpes de leveduras são capazes de matar ("kill") outras leveduras. Foram determinados três fenótipos desta propriedade: "killer", "sensível" e "neutro". Células de fenótipo "killer" são capazes de matar as estirpes "sensíveis", enquanto células de tipo "neutro" são incapazes de matar e são insensíveis à acção de culturas "killer" (Radler, 1980; Vondrejs, 1987; Rosini, 1989).

O factor "killer" das leveduras foi identificado pela primeira vez por Bevan e Makower em 1963. Tratava-se de uma substância tóxica produzida

por certo tipo de leveduras e que se encontrava com pouca frequência. O mecanismo "killer" era, até certo ponto, comparável à secreção de toxinas (bacteriocinas) por certas bactérias, graças à intervenção de plasmídeos. Defendeu-se que a secreção de toxinas pelas leveduras se devia à presença de partículas semelhantes a vírus no interior das células e que eram provenientes do citoplasma. Essas partículas eram constituídas por dois tipos de ácido ribonucleico, apresentando-se cada um dos tipos separadamente envolvido por uma camada de proteína idêntica (Wickner, 1976; Radler, 1980); dois tipos desse RNA de dupla hélice foram descritos: "L" e "M". Os RNA de tipo L estão presentes quer nas leveduras "killer" quer nas não-"killer". É o RNA de tipo M que codifica a toxina "killer", sendo portanto responsável pelo fenótipo "killer" (Vondrejs, 1987). Em 1980, Radler refere que Woods e Bevan tinham demonstrado em 1968 que não era necessário o contacto directo entre células "killer" e células de tipo sensível para a acção da toxina. No mesmo trabalho indica também que Palfree e Bussey tinham purificado parcialmente a toxina "killer" e tinham constatado que na sua composição entravam proteínas (cerca de 10%) e que o resto (aproximadamente 90%) eram polissacarídeos contendo sub-unidades de manose.

A produção da toxina ou factor "killer" foi estudada em leveduras de vários géneros, tendo-se detectado 13 tipos "killer" distintos (K1—K13), com base na sua gama de actividade "killer" e da sua imunidade. O mecanismo de acção da toxina "killer", também denominada zimocina, foi estudado, tendo-se verificado que o processo de acção da toxina K1 envolvia uma rápida ligação a um receptor da parede celular contendo (1-6)- β -D-glucano como componente essencial (Vondrejs, 1987).

Três peculiares tipos "killer" diferentes foram descritos: K1, K2 e K3. K1 é particularmente encontrado entre as estirpes de laboratório, enquanto K2 e K3 se encontram entre as leveduras do vinho, cerveja e em geral nas estirpes selvagens. As estirpes K1 e K2 são sensíveis à toxina que a outra estirpe produz, enquanto K2 e K3 são mutuamente imunes (Wickner, 1976). Estirpes "killer" pertencentes ao género *Pichia* são capazes de matar leveduras dos géneros *Saccharomyces* e *Candida* mas não do género

Hanseniaspora. Por outro lado, leveduras deste último género e *Saccharomyces* são mortas pelas estirpes de *Kluyveromyces*, enquanto estirpes do género *Candida* parecem ser imunes (Rosini, 1989).

A ocorrência diminuta de leveduras "killer" na natureza é refutada por trabalhos de vários autores. Destacam-se: (a) estirpes isoladas a partir de mostos de uva e de vinhos franceses Cuinier e Gros, referidos por Rosini em 1989; (b) leveduras do género *Saccharomyces* associadas à fermentação espontânea de vinhos de Ribeiro, onde se identificaram estirpes "killer" do tipo K2 com percentagens de isolamento mais elevadas em fases intermédias do que em fases finais de fermentação (Cansado *et al.*, 1989; 1991); (c) leveduras "killer" como leveduras contaminantes encontradas em processos fermentativos industriais para a produção de cerveja, saqué e de leveduras de panificação, conforme refere Rosini em 1989; (d) estirpes de *Pichia anomala* isoladas de salmouras de azeitonas (Marquina *et al.*, 1992).

O estudo da actividade "killer" tem sido mais aturado na espécie *S. cerevisiae*, dada a sua importância em termos de utilização industrial, apesar de estudos feitos em 1975 indicarem uma maior frequência de leveduras "killer" no género *Pichia*; No género *Saccharomyces* a propriedade "killer" foi encontrada numa percentagem muito inferior, mesmo mais baixa do que nos géneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis* (Rosini, 1989).

A compreensão do fenómeno "killer" reveste-se de particular interesse podendo ser explorado com benefício na indústria. Na fermentação industrial a pureza microbiológica é essencial, uma vez que qualquer contaminação pode modificar rapidamente a economia da transformação, especialmente se estão envolvidas fermentações em contínuo. O uso de culturas capazes de prevalecer sobre leveduras sensíveis selvagens pelo facto de possuírem actividade "killer" pode impedir ou minorar a possibilidade de contaminação. Este aspecto é particularmente relevante para as indústrias de cerveja e de produção de levedura para panificação, nas quais, mesmo sob estritas condições de esterilização, é importante promover a segurança, usando estirpes "killer" (Rosini, 1989).

MATERIAL E MÉTODOS

I. RECOLHA DOS FERMENTOS

Os fermentos ou iscos, a partir dos quais se isolaram as leveduras utilizadas ao longo deste trabalho, foram recolhidos *in loco*, predominantemente na região norte de Portugal: uma amostra em Vila Real, uma em Viana do Castelo, quinze amostras na região de Vieira do Minho, oito na zona de Amares, duas na região de Póvoa de Lanhoso e duas na região de Braga (Fig. 2.7). Fermentos de outras zonas do país foram também analisados (dois de Coimbra e um de Porto de Lagos, Portimão), de modo a poder ter-se uma panorâmica mais generalizada da população microbiológica presente neste tipo de iscos. Recolheram-se ainda duas amostras de pasta de fermento industrial utilizada nas padarias, proveniente da empresa Gist-Brocade: uma na região da Póvoa de Lanhoso e outra na zona de Braga.

Um ano mais tarde fizeram-se novas recolhas de iscos exactamente nos mesmos locais, procurando saber-se, em cada local de amostragem, se nesse espaço de tempo o fermento tinha sofrido algum tipo de alteração, quer no que respeitava à sua constituição quer no que se referia ao modo de armazenamento.

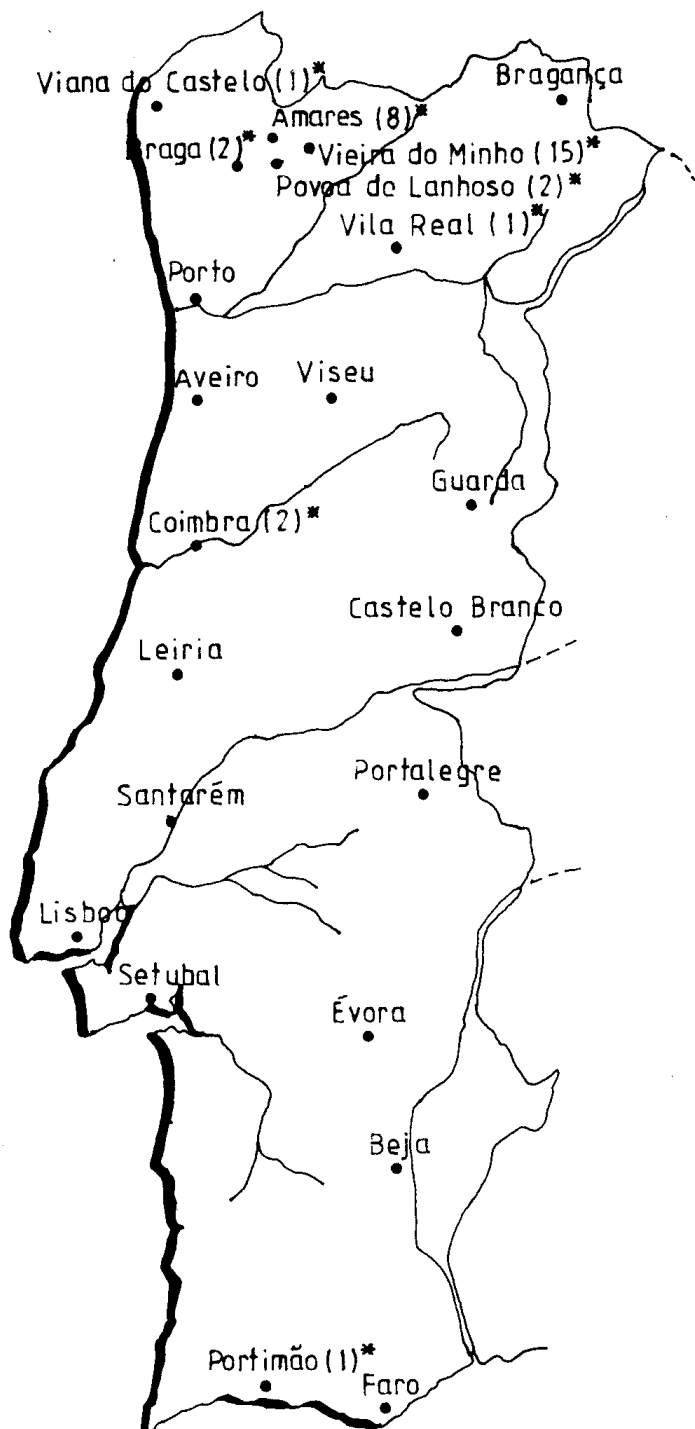


Fig. 2.7. Localização geográfica dos locais de amostragem dos fermentos caseiros recolhidos.

* Número de iscos recolhidos na localidade.

Cerca de 50g do isco, de idade compreendida entre zero e dois dias, foram embrulhados em folha de alumínio, devidamente identificados (conforme ficha representada na Fig. 2.8.) e colocados numa mala térmica refrigerada até chegarem aos nossos laboratórios. Aí, foi medido o valor do pH de cada uma das amostras, usando um eléctrodo de pH modelo 91 WTW (Wissenschaftlich Technische Werkstätten) e imediatamente a seguir foram colocadas num frigorífico.

Fermento N°: UM	Data da colheita:
Local de colheita:	
Idade :	
Modo de armazenamento:	
Composição da farinha:	
milho	
centeio	
outros	
Característica(s) que mereça(m) referência:	

Fig. 2.8. Modelo da ficha preenchida na altura da recolha de cada um dos iscos.

2. ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO, MANUTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE CADA ISCO

2.1. ISOLAMENTO

Uma vez que os microrganismos presentes na Natureza se apresentam como populações mistas, para o seu estudo é necessário isolar

estirpes e mantê-las em cultura pura. Para se proceder ao isolamento das leveduras dos fermentos foi utilizado meio Y.M.A. (Apêndice I). O pH do meio foi corrigido para 3,5 com ácido clorídrico 1N e, posteriormente, este meio foi suplementado com cloranfenicol (500 mg/l) com o objectivo de inibir o crescimento de bactérias. O meio liquefeito, foi autoclavado durante 20 minutos a 120°C e a 1 atm. de pressão, sendo depois vertido em placas de Petri estéreis e deixado a solidificar.

No dia seguinte à recolha das amostras uma pequena porção de cada isco (± 1 g) foi ressuspensa em 20ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril, seguida de agitação vigorosa até se obter uma mistura homogénea. O isolamento das leveduras, foi feito por inoculação de placas de Y.M.A. previamente preparadas, por espalhamento, em triplicado, de 0,3ml da suspensão referida (volume adequado à especificidade do inóculo em questão), directamente e após sucessivas diluições até se obterem colónias isoladas. As placas foram deixadas à temperatura ambiente e procedeu-se à repicagem de placa para placa até se obterem colónias isoladas e morfológicamente distintas.

Isolaram-se também, do mesmo modo, as leveduras presentes nas pastas de fermentos industriais.

2.2. QUANTIFICAÇÃO

Para quantificar a população de leveduras presente em cada fermento, utilizou-se o meio Y.P.G. (Apêndice I). Após liquefação do meio, procedeu-se à sua esterilização em autoclave (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão). No final o meio foi vertido em placas de Petri estéreis, aguardando-se que solidificasse.

A partir da suspensão inicial (2.1.) fizeram-se diluições sucessivas, até se obterem entre 30 e 300 unidades formadoras de colónias (UFC) por cada placa do referido meio, em que se espalharam 0,1ml da citada suspensão. Após incubação à temperatura ambiente durante 4 a 5 dias, procedeu-se à contagem das UFC nas respectivas placas.

2.3. MANUTENÇÃO

Para a manutenção das leveduras isoladas foi usado o mesmo meio utilizado na quantificação das UFC, meio de manutenção sólido, em tubo inclinado, o Y.P.G. (Apêndice I). O meio foi liquefeito e vertido em tubos de ensaio (± 5 ml/tubo) que foram autoclavados nas condições já descritas e, posteriormente, deixados inclinados até completa solidificação.

Para cada fermento, as colónias seleccionadas e isoladas com base nas suas características macro e micromorfológicas foram repicadas para este meio e aí mantidas à temperatura ambiente, para posterior utilização.

Nos casos em que se pretendeu manter as leveduras durante períodos de tempo mais longos, optou-se pelo seu congelamento a -70°C numa solução aquosa de glicerol 30% (p/v) estéril. Volumes de 1,5ml desta solução foram distribuídos por criotubos de 2ml também estéreis, a cada um dos quais se adicionou, com auxílio de um palito, igualmente estéril, uma pequena porção de cada uma das leveduras isoladas.

2.4. IDENTIFICAÇÃO

Para a identificação das estirpes de leveduras isoladas foi utilizada a metodologia descrita por Van der Walt e Yarrow (1984).

- Utilização de algumas fontes de carbono em anaerobiose: fermentação

Por se tratar de um método de simples preparação e de fácil leitura, para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras foram usados tubos de Durham. Os tubos de ensaio, munidos de tubos de Durham invertidos, com o respectivo meio base e solução aquosa das fontes de carbono preparadas conforme descrito no Apêndice I foram inoculados com 0,1ml de uma suspensão aquosa concentrada de levedura e incubados à temperatura ambiente. De acordo com o método, procedeu-se a registos diários durante a primeira semana (quantidade de gás libertada e contida no tubo de Durham

e alteração na cor do indicador), seguindo-se o registo em dias alternados até ao 21^o dia.

- Utilização de compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia

O meio base utilizado para avaliar a capacidade de assimilação de compostos orgânicos como fonte única de carbono e energia foi o *Yeast Nitrogen Base* (Y.N.B.) numa solução aquosa, cuja concentração era de 6,7% (p/v).

As soluções das fontes de carbono (num total de 39 fontes) foram preparadas conforme consta do Apêndice I.

A cada tubo de ensaio com o respectivo meio foi adicionado 0,1ml de uma suspensão aquosa fraca de inóculo. Do mesmo modo, para cada estirpe de levedura inoculou-se um tubo de ensaio contendo o meio base sem qualquer fonte de carbono, o branco, usado como controlo.

Os tubos foram colocados à temperatura ambiente durante três semanas, sendo com frequência, agitados manualmente. Durante este período, a avaliação do crescimento foi feita de acordo com a escala de Wickerham : os tubos de ensaio vigorosamente agitados foram sujeitos a leitura efectuada contra um cartão branco marcado com linhas horizontais negras; quando tais linhas eram visíveis à transparência, o crescimento foi considerado negativo. O valor 2+ foi atribuído aos crescimentos verificados em tubos em que as referidas linhas não eram observados de forma nítida, enquanto a atribuição do valor 3+ foi conferido aos casos em que as linhas eram invisíveis. Os crescimentos classificados como lentos "D" corresponderam aos que só se apresentaram positivos (2+ ou 3+) ao fim de 14 a 21 dias. Os resultados verificados, foram registados no fim da primeira e terceira semanas.

- Utilização de fontes de nitrogénio

Para avaliar a capacidade das leveduras isoladas crescerem em meios em que foi fornecida uma única fonte de nitrogénio, o meio base usado foi o *Yeast Carbon Base* (Y.C.B.), também numa solução aquosa com a concentração de 11,7% (p/v), ao qual se adicionou cada uma das fontes de nitrogénio a experimentar.

As soluções das fontes de nitrogénio, num total de oito fontes, foram preparadas conforme descrito no Apêndice I.

Para cada estirpe foi também preparado um branco contendo o meio base mas sem qualquer fonte de nitrogénio, para funcionar como controlo. Os tubos foram colocados nas condições já descritas para as fontes de carbono, durante três semanas. Ao longo deste período, o crescimento foi avaliado de acordo com a escala de Wickerham conforme descrito anteriormente e os resultados verificados ao fim da primeira e terceira semanas foram igualmente registados.

- Crescimento em meio mineral base sem de vitaminas

Para verificação do crescimento das leveduras isoladas em meio desprovido de vitaminas, optou-se pelo meio mineral base contendo somente os oligoelementos A e B (Apêndice I). Inocularam-se então tubos com 0,1ml da suspensão celular pretendida. O registo dos resultados foi feito no fim da primeira e terceira semanas respectivamente. Nos tubos em que se verificou o crescimento 1+ ao fim da primeira semana, procedeu-se à transferência de 0,1ml da suspensão desses tubos para novos tubos preparados conforme descrito anteriormente.

- Morfologia em meio líquido

Para observação do crescimento das células utilizou-se um meio rico em cuja composição entrava glucose, extracto de levedura e peptona,

conforme descrito no Apêndice I. Os tubos de ensaio contendo o meio foram inoculados com 0,1ml de uma suspensão de cada estirpe de levedura e deixados à temperatura ambiente. Num intervalo de tempo, compreendido entre um e cinco dias foi-se observando macroscopicamente a presença ou ausência de anel, película, ilhas e sedimento. Microscopicamente (microscópio óptico Leitz-Biomed) observou-se o aspecto das células das leveduras, o tipo de gemulação, a ausência ou a presença de ascos (e neste caso a forma e número dos ascósporos), e a existência ou não de micélio ou de pseudomicélio. O registo destas observações, sob a forma de esquemas, foi feito em caderno próprio de modo a poderem fazer-se posteriores comparações dos diversos aspectos.

- Crescimento a diferentes temperaturas

Apesar das temperaturas óptimas de crescimento da maioria das espécies se encontrar entre os 25°C e os 30°C, existem numerosas excepções, nomeadamente em espécies provenientes de habitats restritos e específicos. Para determinação da capacidade de crescimento das leveduras a diferentes temperaturas, utilizou-se um meio rico com glucose 2% (p/v) e seguiu-se a metodologia já descrita (Apêndice I). Os tubos com o inóculo foram deixados a crescer até um máximo de cinco dias, em banhos termostatizados, às seguintes temperaturas: 30°C, 35°C, 37°C e 42°C. A presença ou ausência de crescimento a cada temperatura foi registada.

- Tolerância osmótica

As leveduras isoladas de substratos com elevadas concentrações de cloreto de sódio ou de açúcar, são geralmente resistentes a pressões osmóticas elevadas. Com o objectivo de se avaliar a tolerância a 10% (p/v) de cloreto de sódio, inocularam-se tubos preparados conforme o Apêndice I e inoculados com 0,1ml de uma suspensão de levedura.

No sentido de se verificar a tolerância osmótica a 50% (v/v) de glucose, as leveduras, provenientes de uma cultura jovem (24 a 48 horas), foram inoculadas em tubos contendo glucose e extracto de levedura agarizados conforme consta do Apêndice I.

Cinco dias após a inoculação destes tubos, mantidos à temperatura ambiente, verificou-se se ocorreu ou não crescimento.

- Hidrólise da arbutina e teste da urease

Com o objectivo de confirmar a presença da β -glucosidase inocularam-se tubos de meio agarizado de arbutina (Apêndice D). Nos casos em que a levedura hidrolisa a arbutina, liberta-se hidroxiquinona que combinada com sais férricos do meio, lhe confere uma cor acastanhada.

Para realizar o teste da urease, as estirpes foram inoculadas no meio agar de ureia de Christensen (Apêndice D) à temperatura ambiente. A actividade desta enzima é detectada pelo aparecimento de uma coloração rosa-carmim.

Após inoculação por estria a partir de um pré-inóculo em Y.P.G., a actividade da β -glucosidase e a actividade da urease, foram verificadas cinco dias após a inoculação.

- Resistência à cicloheximida

A tolerância ao antibiótico actidiona foi verificada inicialmente por Whiffen (1948) referido por Van Der Walt e Yarrow (1984). A avaliação da sensibilidade a este antibiótico foi detectada através do crescimento ao fim da primeira e da terceira semanas, tanto para os tubos de ensaio que continham 100 ppm como 1000 ppm de cicloheximida, preparados conforme o Apêndice I, após terem sido inoculados com 0,1ml de suspensão de levedura.

- Observação das características sexuais

Com o objectivo de se verificar a capacidade de produção de esporos sexuados, prepararam-se meios pobres, propícios à esporulação, uma vez que ou não possuíam na sua constituição qualquer fonte de carbono ou então, se presente, tratava-se da glucose numa concentração que não ultrapassou 0,1% (p/v), como os que se referem no Apêndice I.

A presença de esporos produzidos pelas leveduras, foi verificada ao longo do tempo (a partir do segundo dia até dois a três meses após a inoculação) por observações ao microscópio óptico (Leitz-Biomed). Em caso de dúvida, procedeu-se à coloração diferencial dos esporos, pela técnica de Wirtz modificada por Schaeffer-Fulton's (Van Der Walt e Yarrow, 1984) em que, após fixação pelo calor, se cobriu a preparação com uma solução aquosa de verde-malaquite 5% (p/v) durante 60 segundos e se removeu o excesso de corante. Logo em seguida revestiu-se com uma solução de safranina 0,25% (p/v) durante 30 segundos, lavou-se em água corrente e secou-se com papel de filtro. Se presentes, os esporos vistos ao microscópio óptico, apresentavam cor esverdeada ou azulada.

A identificação de cada uma das 95 estirpes de leveduras isoladas foi feita integrando todas as informações obtidas nos testes descritos, com base num programa de computador, "Yeast Identification PC Program: Version 1" (Barnett *et al.*, 1990).

3. DETECÇÃO DA SENSIBILIDADE E ACTIVIDADE "KILLER" DAS LEVEDURAS ISOLADAS

As estirpes utilizadas para a determinação da actividade "killer" foram fornecidas pela Colecção Portuguesa de Leveduras, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

No sentido de se obter uma panorâmica mais geral, quer da sensibilidade das estirpes seleccionadas aos factores "killer" de outras leveduras, quer da sua própria capacidade "killer", e portanto da sua susceptibilidade de destruição de leveduras reconhecidamente resistentes, utilizou-se o meio Y.M.A. e tampão citrato de sódio pH 4 contendo uma concentração final de azul de metileno de 0,1% (v/v), procedendo-se conforme descrito no Apêndice I.

O meio contendo uma solução aquosa de azul de metileno foi vertido em placas estéreis que se deixaram solidificar. Estas placas foram inoculadas por espalhamento de 0,2ml de uma suspensão de células de levedura cuja sensibilidade a factores "killer" se pretendia conhecer. Após este procedimento, em cada uma foram inoculadas, por ansada, em zonas concentradas (± 1 cm de diâmetro), em locais perfeitamente definidos da própria placa, leveduras que supostamente apresentavam actividade "killer". Nestas condições, as placas foram colocadas numa câmara à temperatura de 15 - 20°C, durante um período máximo de dez dias. Passado o referido tempo (nalguns casos ao fim de três dias) pôde verificar-se um halo delimitado por uma linha azul mais escura que circundava a colónia da levedura possuidora de actividade "killer". Tal halo corresponderia ao local onde ocorreu morte ou ligeiro crescimento da levedura espalhada na placa, por interdição da levedura com actividade "killer" (Sampaio, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS E SUA CARACTERIZAÇÃO

Foram isoladas, a partir dos 34 iscos recolhidos, um total de 95 estirpes de leveduras, pertencentes aos seguintes géneros: *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. Através dos métodos de taxonomia clássica utilizados para a sua identificação, só nos foi possível identificar com clareza 75 dessas estirpes, dado o número de testes discrepantes em relação à estirpe tipo, nomeadamente no que respeita à assimilação de compostos de carbono e de nitrogénio (Barnett *et al.*, 1990).

Não foram detectadas quaisquer leveduras com afinidade basidiomiceta. As leveduras identificadas incluíam-se no grupo das ascomicetas, comportando 50 estirpes asporogénicas pois não evidenciaram a presença de esporos, e 45 estirpes ascospogénicas, distribuídas no conjunto por nove espécies diferentes. Assim, cerca de 36% das estirpes de leveduras isoladas eram de *S. cerevisiae*, sendo esta a espécie predominante, imediatamente seguida por *T. delbrueckii*, *P. membranaefaciens* e *I. orientalis*, conforme se pode verificar no diagrama da Fig.2.9. em que se apresenta a percentagem relativa das espécies de leveduras presentes nas 75 estirpes identificadas. Recorrendo apenas a testes de taxonomia clássica torna-se muito difícil distinguir as estirpes de *P. membranaefaciens* e *P. cactophila* ou *pseudocactophila*. O único parâmetro que pode ser utilizado para a sua distinção é a respectiva capacidade de não crescerem (no caso das primeiras estirpes) ou crescerem (as duas últimas estirpes referidas) a 40°C. De igual forma, referimos sempre *P. cactophila* ou *pseudocactophila* uma vez que a sua distinção só é possível através de testes de reassociação de DNA e/ou electroforese das enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase, hexocinase e fosfoglucomutase (Barnett *et al.*, 1990). Sendo características de habitats muito específicos, é interessante verificar a presença destas estirpes

em massas panares. No entanto, a sua presença noutros tipos de substratos, como nas salmouras de azeitonas, já foi anteriormente referida (Marquina *et al.*, 1992; Rodrigues, 1994).

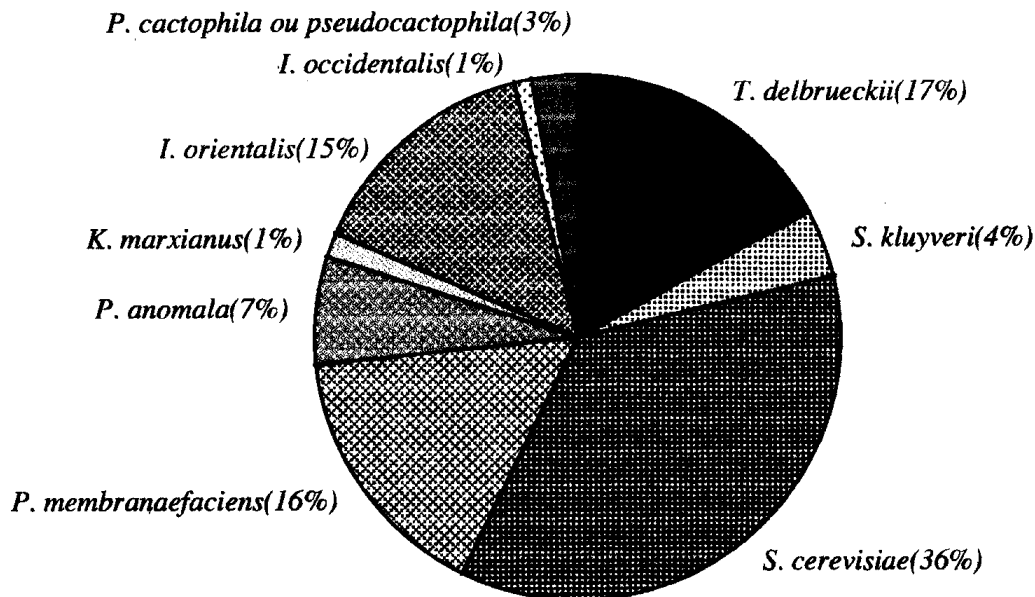


Fig. 2.9 Percentagem de ocorrência das espécies de leveduras em relação ao total de estirpes isoladas e identificadas nos iscos.

Em relação a cada um dos diferentes iscos estudados, a espécie predominante foi *S. cerevisiae*, isolada em cerca de 80% das amostras. Outras espécies apareceram também com alguma frequência: *I. orientalis*, *P. membranaefaciens* e *T. delbrueckii* foram as espécies mais abundantes, ocorrendo em cerca de 40% dos iscos analisados. As espécies menos frequentes nos iscos foram *I. occidentalis*, *K. marxianus*, *P. anomala*, *P. cactophila ou pseudocactophila* e *S. kluyveri*, conforme se pode observar na Fig. 2.10.

O número total de UFC . g⁻¹ nos diversos iscos, esteve sempre compreendido entre 10⁵ e 10⁶. Estes valores eram aparentemente independentes da composição dos fermentos, quer no que respeita à

quantidade e variedade das farinhas de que eram constituídos, quer no que concerne ao número e tipo de espécies de leveduras presentes.

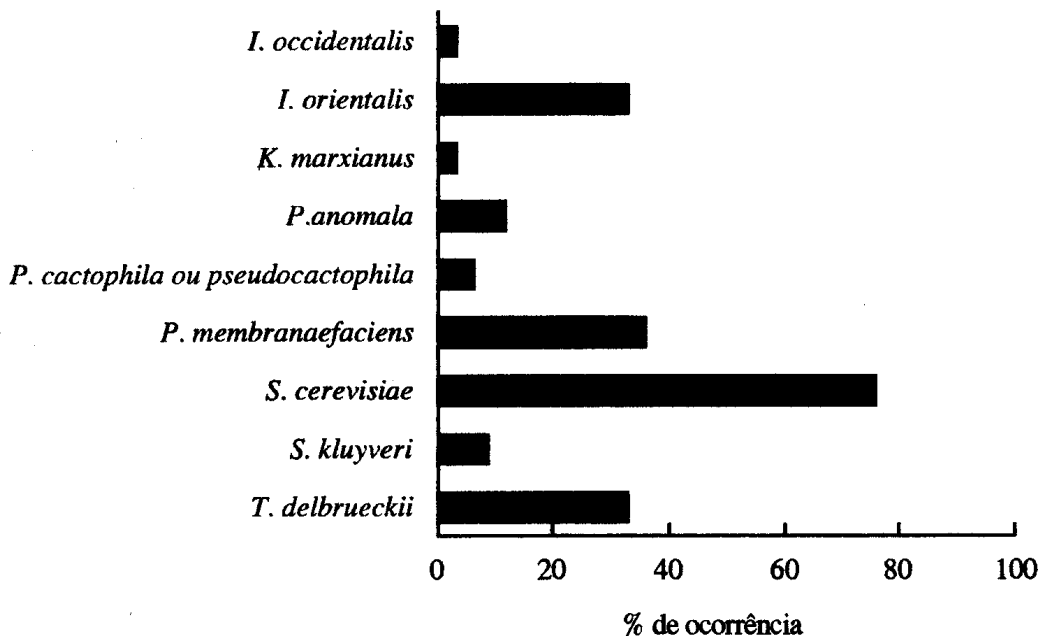


Fig. 2.10. Percentagem de ocorrência das diversas espécies isoladas e identificadas em relação à totalidade dos iscos estudados.

De entre os parâmetros utilizados para a caracterização das leveduras, as propriedades fisiológicas consideradas mais relevantes tendo em conta a sua origem e a sua potencial aplicação na panificação, encontram-se resumidas na Tabela 2.I. Cerca de 90% das leveduras isoladas utilizavam o ácido láctico, do mesmo modo que a maioria crescia bem a 42°C. Esta incidência de leveduras capazes de crescer a elevadas temperaturas é provavelmente o resultado da selecção natural, relacionada com as condições ambientais que rodeiam a preparação destas massas e, consequentemente, dos iscos. De facto, a broa tradicional, feita de milho e centeio, de onde recolhemos os iscos, é preparada a partir destes, com água e farinha, funcionando como iniciadores. Tanto estes iniciadores, quanto a massa onde vão ser incorporados, são preparados com água a pelo menos 70°C, de tal modo que a temperatura no interior da massa é sempre elevada e nunca inferior a 40°C.

Tabela 2.1. Espécies de leveduras isoladas a partir dos iscos de pão e comparação de algumas características selecionadas.

Espécies isoladas	Número de estirpes	Fermentação da glicose	Fermentação da maltose	Assimilação da galactose	Assimilação da sacarose	Assimilação da rafinose	Assimilação da trealose	Crescimento em ácido láctico	Crescimento em glicose 50%	Crescimento a 42°C
<i>Issatchenkia occidentalis</i> Kurtzman et al.	1	D	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i> Kudryavtsev	11	+	-	-	-	-	V	+	-	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Hansen) van der Walt	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Pichia anomala</i> (Hansen) Kurtzman	5	+	+	+	+	+	+	+	-	V
<i>Pichia cactophila</i> Starnet et al. / <i>Pichia pseudocactophila</i> Holzschu et al.	2	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Pichia membranifaciens</i> (Hansen) Hansen	12	+	-	-	-	-	V	+	-	V
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex Hansen	27	+	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>Saccharomyces kluyveri</i> Phaff et al.	3	+	D	+	+	+	+	+	V	+
<i>Torulopsisora delbrueckii</i> (Lindner) Lindner	13	+	V	V	V	+	+ / D	V	V	V

V - variável; D - demorado, (positivo apenas após uma semana ou mais).

2. ASSOCIAÇÕES DE LEVEDURAS PRESENTES NO MESMO ISCO

O número de espécies de leveduras presentes nos iscos estudados não se mostrou constante, nem tão pouco, para os casos em que esse número se mantinha, as associações de leveduras encontradas eram as mesmas.

É ainda importante referir que nalgumas massas o número de espécies presentes não coincide com o número de estirpes encontradas, já que em várias situações se identificaram várias estirpes da mesma espécie num mesmo isco; assim pudemos constatar que o número máximo de espécies distintas num mesmo isco foi de quatro, mas casos houve em que se isolaram seis estirpes de leveduras.

A Tabela 2.II evidencia a distribuição da população de leveduras nas 34 amostras examinadas. Somente 21% dos iscos apresentava uma única espécie de levedura. Associações de duas espécies foram encontradas em 47% dos fermentos, 29% apresentavam três diferentes espécies e uma única amostra (3%) exibia quatro espécies de leveduras.

As associações de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, *I. orientalis* e /ou *P. membranaefaciens* foram as mais frequentes. É de notar que na população existente em cada isco, se encontrava incluída pelo menos uma espécie tipicamente fermentativa, quer *S. cerevisiae*, quer *T. delbrueckii*, com excepção da associação entre *P. anomala*, *P. membranaefaciens* e *I. orientalis*, encontrada num dos fermentos. Aparentemente, este isco é de algum modo semelhante à massa ácida de San Francisco, na qual é predominante a levedura *S. exiguus*, não fermentativa da maltose, enquanto a fermentação desse açúcar é levada a cabo por bactérias lácticas (Sugihara *et al.*, 1971). A presença dominante de *S. cerevisiae* pode, nalguns casos, ser explicada pela reintrodução periódica de levedura prensada de panificação, com o objectivo de acelerar a levedação da massa panar.

Tabela 2.II. Associações de espécies de leveduras presentes nas 34 amostras de iscos e respectiva frequência.

Associações	Frequência (Número de iscos)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Torulaspora delbrueckii</i>	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i>	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia anomala</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Pichia cactophila/pseudocactophila</i>	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Pichia cactophila/pseudocactophila</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces kluyveri</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i>	1
<i>Saccharomyces kluyveri</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> e <i>Issatchenkia occidentalis</i>	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	1
<i>Pichia anomala</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	1

3. COMPOSIÇÃO E pH DOS ISCOS

Em relação à composição dos iscos verificou-se que a grande maioria tinha sido preparada à custa de uma mistura, em proporções variáveis e quantificadas de farinha de milho e de centeio e só esporadicamente apresentavam quantidades vestigiais de trigo. Os valores de pH de cada amostra, bem como a respectiva razão milho/centeio determinados, estão apresentados na Tabela 2.III.

Pode verificar-se que os valores mais elevados de pH registados, correspondiam a um isco exclusivamente feito à custa de farinha de trigo (4,25) ou então a pasta de levedura comercial prensada (Gist-Brocade). Todos os outros valores de pH encontrados eram inferiores, compreendendo-se entre 3,0 e 3,5.

Aparentemente não nos pareceu ser possível estabelecer alguma correlação entre os valores de pH dos iscos e a sua composição em termos de tipos de farinhas que entravam na sua composição, apesar de numerosos autores referirem a necessidade de valores mais baixos de pH, para panificar massas com mais de 20% de farinha de centeio (Röcken *et al.*, 1992; Hansen e Hansen, 1994; Meuser *et al.*, 1994; Röcken e Voysey, 1995). Também é importante referir que tais autores se referiam a valores de pH determinados para uma pasta em que intervinha como agente levedante uma única estirpe de levedura. É bem possível que nestes iscos em que a população microbiológica é tão variada dentro de cada isco, o valor do pH não esteja única e exclusivamente dependente do tipo e quantidade de farinhas envolvidas no seu fabrico, mas também do tipo e variedade dos microrganismos presentes e até mesmo das interacções metabólicas que eventualmente se possam estabelecer entre eles.

Adicionalmente, estes resultados parecem indiciar que existe uma população de leveduras característica deste tipo substratos, uma vez que se encontraram as mesmas associações de leveduras em fermentos provenientes

de locais geograficamente distintos e feitos à custa de diferentes tipos e quantidades de farinhas.

Tabela 2.III. Valores de pH encontrados para os 34 iscos recolhidos e a razão milho centeio existente em cada um deles.

<i>Identificação do isco</i>	<i>pH da amostra</i>	<i>razão milho/centeio</i>
UM 28 (VM)	3,45	2,70
UM 33 (PL _g)	4,25	(1)
UM 34 (VM)	3,49	2,66
UM 35 (VM)	3,30	5,00
UM 36 (VM)	3,23	4,50
UM 37 (VM)	3,40	4,33
UM 38 (VM)	3,49	3,30
UM 39 (VM)	3,47	2,40
UM 40 (VM)	3,52	2,00
UM 41 (VM)	3,16	4,00
UM 42 (B)	3,45	4,50
UM 43 (B)	3,48	3,97
UM 44 (VM)	3,33	2,5
UM 45 (B)	3,51	3,75
UM 46 (PL)	4,22	(2)
UM 47 (VC)	3,29	3,40
UM 48 (A)	3,50	4,60
UM 49 (A)	3,55	5,00
UM 50 (A)	3,13	5,00
UM 51 (A)	3,49	2,00
UM 52 (A)	3,23	6,50
UM 53 (A)	3,49	6,00
UM 54 (A)	3,36	12,00
UM 55 (C)	3,21	3,00
UM 56 (C)	3,34	3,78
UM 57 (A)	3,22	5,89
UM 58 (VR)	3,08	1,00
UM 59 (VM)	3,27	2,00
UM 60 (VM)	3,28	3,33
UM 61 (VM)	3,44	2,00
UM 62 (VM)	3,23	3,56
UM 63 (VM)	3,07	2,75
UM 64 (PL)	3,51	4,65
UM 65 (B)	4,20	(2)

(A), Amares; (B), Braga; (C), Coimbra; (PL_g), Porto de Lagos; (PL), Póvoa de Lanhoso; (VM), Vieira do Minho; (VR), Vila Real.

(1): isco contendo somente farinha de trigo.

(2): correspondente a pasta de levedura industrial (Gist-Brocade).

O facto de nos iscos estudados encontrarmos predominantemente associações de diferentes espécies de leveduras, presença de bactérias e um pH ácido, fez com que de algum modo os comparássemos às denominadas culturas "starter", também características do pão ácido conhecido por "sour-dough".

O "sour-dough" é um sistema biológico complexo no que respeita à composição microbiológica dos "starters" (Sugihara *et al.*, 1971). Na panificação, o "sour-dough" melhora as propriedades do pão, induz um miolo mais coeso, com estrutura uniforme e promove um paladar mais agradável dos produtos feitos à custa de farinhas de trigo e centeio, ao mesmo tempo que aumenta a sua duração porque retarda o aparecimento de fungos, conforme vários autores referidos por Esteve *et al.*, (1994).

Os mesmos autores citam também que a utilização do "sour-dough" no pão de trigo se faz, porque funciona como um agente que promove o aumento de volume da massa, a sua acidificação e o seu aroma. Também o uso de farinha de centeio no fabrico de pão obriga a uma acidificação das massas, acidificação essa que pode ser feita, nomeadamente, por incorporação de uma porção adequada de "sour-dough" (Röcken e Voysey, 1995). Estas propriedades atribuídas ao "sour-dough" fazem-nos pensar em hipotéticas aplicações similares dos iscos do pão tradicional português. Um conhecimento mais detalhado, através de estudos sistemáticos, dos efeitos da inclusão destes iscos nas massas de pão de trigo, dar-nos-ão a oportunidade de obter também diferentes tipos do referido pão.

4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E CAPACIDADE "KILLER"

Pareceu-nos que seria importante avaliar a sensibilidade e a capacidade "killer" das leveduras isoladas, tanto mais que a importância prática deste efeito é particularmente significativa nas indústrias em que as

leveduras são, como no caso da panificação, produto do processo, e que além de competirem pelo substrato são capazes de matar a estirpe comercial.

Quando pretendemos conhecer a resistência das estirpes que isolámos em relação a estirpes "killer" fornecidas pelo IGC, os resultados obtidos foram os que referimos na Tabela 2.IV. Pode desde logo verificar-se que um grande número das estirpes que isolámos (aproximadamente 40%) são sensíveis a factores "killer". Em relação aos outros cerca de 60%, não podemos afirmar a sua total resistência aos referidos factores, dado que não foram avaliadas para todos os factores "killer" conhecidos.

Torna-se também evidente, que são essencialmente as estirpes de *S. cerevisiae* as mais sensíveis a factores "killer" de leveduras da mesma espécie. É também notório que em ordem de grandeza se seguem as estirpes de *T. delbrueckii*, demonstrando-se sensíveis às duas estirpes de *S. cerevisiae* com factores "killer". Para além destas duas espécies sensíveis, só duas estirpes da espécie *I. orientalis* examinadas demonstraram sensibilidade à estirpe de *P. anomala* IGC 4121.

Estudos feitos em células de leveduras, levaram alguns autores a concluir que as leveduras do género *Saccharomyces* com características "killer" não eram muito frequentes e que um armazenamento prolongado destas estirpes de levedura em laboratório, causava a perda da actividade "killer" (Rosini, 1989).

A constatação da existência de associações de leveduras num mesmo isco, induziu-nos alguma curiosidade acerca da existência de leveduras "killer" no conjunto de estirpes isoladas, tanto mais que, como decorre da literatura mais recente, as leveduras "killer" são mais frequentes nas estirpes recentemente isoladas da natureza, situação onde se enquadravam as que tinham sido por nós isoladas. Os resultados obtidos no que respeita à actividade "killer" das estirpes que isolámos apresentam-se sintetizados na Tabela 2.V..

Tabela 2.IV. Sensibilidade "killer" das leveduras isoladas de iscos de pão caseiro feito essencialmente à custa de milho e centeio em função de estirpes de coleção reconhecidas como leveduras "killer".

Leveduras isoladas	Número de estirpes	ESTIRPES "KILLER"						
		<i>Rhodotorula glutinis</i> IGC 4615	<i>Pichia anomala</i> IGC 4121	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4612	<i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 4619	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4620	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IGC 4617	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	11	-	+ (2)*	-	-	-	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	-	-	-	-	-	-	
<i>Pichia anomala</i>	5	-	-	-	-	-	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	12	-	-	-	-	-	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27	-	-	+ (24)*	-	+ (23)*	-	
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	3	-	-	-	-	-	-	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	13	-	-	+ (9)*	-	+ (9)*	-	

+ , Estirpes sensíveis; - , estirpes resistentes.

* , Número de estirpes sensíveis.

Conforme se pode observar, só cerca de um quarto das leveduras que isolámos se comportam como estirpes "killer", nas condições experimentais referidas. As estirpes de *Pichia anomala* apresentam o efeito mais marcante e o espectro mais largo, matando leveduras do género *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*. É bem possível que o número de estirpes "killer", nas estirpes que isolámos, esteja subestimado em função do meio utilizado, uma vez que começa a ser corrente na literatura a referência da importância do cloreto de sódio no meio, como factor que influencia a produção de toxina nos alimentos fermentados (Suzuki *et al.*, 1989; Marquina *et al.*, 1992). A presença de estirpes "killer" entre as leveduras que isolámos pode ser importante para evitar o crescimento de estirpes contaminantes e para estabelecer uma população de leveduras que contribua para as características organolépticas desejáveis no pão.

O estudo da actividade "killer" tem sido mais intenso em *S. cerevisiae*, devido ao papel industrial que desempenha. Tal facto não nos pode levar a concluir que se trata do género em que essa actividade é mais frequente. De facto, de acordo com Rosini (1989) esta actividade é relativamente diminuta no género *Saccharomyces* sendo maior no género *Pichia*. De igual forma, a ideia inicial de que as leveduras "killer" não eram abundantes na natureza, tem vindo a ser refutada pela própria realidade uma vez que estudos efectuados em mostos revelaram que o fenótipo "killer" está largamente distribuído nos diversos géneros de leveduras presentes neste tipo de fermentações, incluindo *Saccharomyces* (Cansado *et al.*, 1989; 1991). Foi igualmente detectada actividade "killer" em cerca de metade das leveduras isoladas a partir de fermentações espontâneas de salmouras de azeitonas (Marquina *et al.*, 1992).

Tabela 2.V. Actividade "killer" de leveduras isoladas de iscos de pão caseiro contra estirpes seleccionadas de colecção.

ESTIRPES SENSÍVEIS									
Leveduras isoladas	Número de estirpes	<i>Issatchenkia orientalis</i> IGC 3806	<i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC 3886	<i>Pichia anomala</i> IGC 4380	<i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 4619	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4612	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4620	<i>Torulaspota delbrueckii</i> IGC 4978	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	11	-	-	-	+DB 51C DB 55D	-	-	+DB 33A	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	+DB 44C	-	-	+DB 44C	-	-	-	
<i>Pichia anomala</i>	5	-	+DB 50A	+DB 50A DB 50D DB 64B	-	-	+DB 50A	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	12	-	+DB 48A DB 50C DB 58B DB 60B	+DB 48A DB 50C DB 58B DB 60B DB 62B	-	+DB 33D	-	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27	-	-	+DB 61C	-	-	-	-	
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	13	-	+DB 59C DB 61B	+DB 59C DB 61B	+DB 34D	-	-	-	

+, Actividade "Killer"; -, Sem actividade "Killer".

O crescente interesse pelas leveduras "killer" está associado ao seu papel na indústria: nas fermentações industriais, onde a pureza microbiológica é determinante, o uso de leveduras "killer", capazes de sobreviver em relação às leveduras selvagens sensíveis, pode tornar pouco relevante a possibilidade de contaminação (Rosini, 1989).

Este olhar relativamente abrangente sobre as leveduras "killer" que isolámos, tem a ver com a necessidade estrita de segurança nas indústrias e consequentemente com a obtenção de estirpes selvagens de leveduras possuidoras de factores "killer", de modo a que as indústrias funcionem nas mais rigorosas condições de esterilização.

Capítulo 3

CARACTERIZAÇÃO E SELECÇÃO DAS ESTIRPES DE LEVEDURAS
ISOLADAS COM VISTA AO SEU POTENCIAL USO EM PANIFICAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nesta fase de desenvolvimento do trabalho foi nosso objectivo seleccionar estirpes de acordo com as características desejáveis numa boa levedura de panificação. Assim, em primeiro lugar, foram seleccionadas, de entre as estirpes isoladas, aquelas que fermentavam rapidamente a maltose. Em seguida, foram determinadas as taxas específicas de crescimento e a produção de biomassa em diferentes meios de cultura de forma a eliminar as estirpes de crescimento lento e baixa produtividade. As leveduras assim seleccionadas foram então experimentadas em relação à sua capacidade de produção de CO₂ na massa, tendo igualmente sido estudada a influência do meio de crescimento na sua capacidade fermentativa.

Uma vez que se conhece o papel preponderante da maltase durante o processo fermentativo e é comumente aceite que a actividade da invertase é elevada nas estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas em processos fermentativos, pareceu-nos também importante avaliar a actividade destas enzimas tanto nas estirpes seleccionadas como numa estirpe proveniente da panificação industrial. Finalmente a estrutura da massa bem como as alterações ocorridas no seu interior após a fermentação, foram examinadas recorrendo à microscopia electrónica de varrimento.

Apresentamos de seguida uma breve introdução sobre aspectos considerados relevantes para os objectivos propostos.

2. CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO

Na maior parte dos países a definição de levedura de panificação restringe-se a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura pertencente à classe Ascomycotina. As estirpes comerciais de *S. cerevisiae* possuem muitas características comuns mas também distintas, uma vez que não apresentam

as mesmas propriedades conforme se destinam à produção de cerveja, do vinho ou de pão. Oda e Ouchi (1989) referem um conjunto de propriedades importantes que uma levedura deve possuir para uma fermentação rápida da massa: (i) elevada actividade glicolítica; (ii) capacidade de adaptação rápida à alteração de substratos; (iii) elevada actividade da invertase; (iv) elevado potencial de fermentação da maltose e (v) capacidade de sintetizar enzimas e coenzimas em condições anaeróbicas. A estabilidade osmótica na presença de elevadas concentrações de açúcar é também desejável em países como o Japão, já que aí são usados produtos de panificação mais doces do que no Norte da América ou na Europa. Assim, para avaliar as potencialidades de uma nova levedura de panificação, deve-se, em primeiro lugar, avaliar simultânea e quantitativamente, as propriedades acabadas de mencionar (Oda e Ouchi, 1989).

A taxa de fermentação em *S. cerevisiae* é controlada por um conjunto de enzimas, permeases e proteínas reguladoras. No que respeita à sacarose e, uma vez hidrolisada nas suas hexoses constituintes (glucose e frutose), através da invertase periplasmática, segue-se a entrada destes produtos nas células através de proteínas transportadoras. Por sua vez, em *S. cerevisiae*, a entrada de maltose na célula da levedura ocorre através de um sistema de transporte mediado e, uma vez no citosol, é hidrolisada em glucose. As hexoses são então intracelularmente metabolizadas via Embden-Meyerhof, originando etanol e dióxido de carbono. Crê-se que a taxa de fermentação de *S. cerevisiae*, nas massas, parece ser controlada pelas velocidades às quais ocorrem estas etapas iniciais do metabolismo dos açúcares (hidrólise e transporte membranar).

Actividades elevadas da maltase e da maltose-permease são particularmente importantes nas estirpes de leveduras de panificação, para catabolizar a maltose libertada a partir da acção das amilases dos cereais. A família dos genes da maltose inclui cinco *loci*, designados *MAL1-4* e *6*. Trabalhos de Cohen *et al.*, (1984) mostraram que cada *MAL locus* incluía pelo menos três genes envolvidos na utilização da maltose, nomeadamente para a maltase, para a proteína transportadora da maltose e para a proteína

reguladora. Algumas destas proteínas são constitutivas, outras indutíveis e as actividades relativas destes dois tipos são críticos, dependendo da composição da massa e da velocidade da fermentação. Uma actividade apreciável das enzimas induzidas pode retardar a fermentação da maltose numa massa. O uso por vários autores de técnicas de hibridização permitiram a construção de estirpes de panificação em que este processo deixa de ocorrer.

- Funções

Têm vindo a ser consideradas funções importantes das leveduras de panificação as que a seguir se referem:

α- Aumentar o volume panar, através da libertação de dióxido de carbono resultante da fermentação dos hidratos de carbono disponíveis na farinha. O ambiente na massa é anaeróbio, ou pelo menos microaerofílico, em contraste absoluto com o ambiente em que se propagaram as células. Os açúcares disponíveis na farinha (glucose, frutose, sacarose e maltose) são essencialmente fermentados através da via glicolítica. Os oligo e polissacarídeos, também presentes, compostos por glucose e frutose (glucofrutanos ou levosinas) podem ser parcialmente hidrolisados pela invertase. Logo após a hidratação da farinha, maior quantidade de maltose se torna acessível a partir do amido, por acção das α - e β -amilases (Burrows, 1979). Os açúcares mais rapidamente fermentáveis, glucose, frutose e sacarose (cerca de 1,4% dos açúcares fermentáveis) presentes na farinha, suportam apenas a fermentação inicial da massa. Os glucofrutanos e especialmente a maltose são os substratos que mantêm a maior parte da fermentação numa massa e aumentam a velocidade da fermentação da maltose, essencialmente por darem lugar a um processo adaptativo constitutivo conforme é referido por Evans (1990).

Muitas massas são fortemente açucaradas com glucose ou sacarose, contrastando assim com as massas normais, desprovidas de açúcar ("lean").

Nestas condições, a pressão osmótica na massa é extremamente elevada. O cloreto de sódio, frequentemente incluído nas massas como retardante do crescimento de fungos, também contribui para a hipertonicidade das massas. O efeito do "stress" osmótico nas leveduras leva à redução da taxa de fermentação que pode ser incrementada pela presença de ácidos gordos de cadeia curta adicionados à farinha, que também funcionam como inibidores do desenvolvimento de fungos (Evans, 1990).

b- Desenvolver uma estrutura e textura na massa através do estiramento causado pela expansão do CO₂ libertado. A principal função da levedura durante a fermentação é libertar dióxido de carbono, através de um processo fermentativo, provocando assim o estiramento mecânico das proteínas da massa conhecidas como glúten. O processo do "desenvolvimento" da massa, ainda imperfeitamente compreendido, altera as suas propriedades reológicas, tornando a massa mais elástica e mais capaz de aprisionar as pequenas bolhas de gás. O pão proveniente de massas assim fermentadas apresenta uma textura muito mais leve e é mais apaladado do que seria se fosse produzido doutro modo. Embora as células de levedura sejam responsáveis pela expansão do gás na massa em desenvolvimento, são incapazes de iniciar o processo de aparecimento de alvéolos gasosos na mesma: os núcleos de gás são formados durante a mistura (amassadura) preliminar, antes de serem expandidos pelo processo fermentativo (Evans, 1990).

c- Melhorar o paladar. Os produtos de fermentação, nomeadamente ácido acético e ácido láctico são compostos importantes no aroma e paladar do pão, sendo mesmo de supor que o próprio ácido acético potencie o efeito de outros compostos aromáticos do pão de trigo. O uso de selecções específicas de culturas de bactérias lácticas favorece o paladar e o aroma do pão. O uso de concentrações adequadas de certos aditivos podem incrementar o paladar do pão mas, em contrapartida, podem apresentar efeitos negativos no volume panar (Gélinas e Lachance, 1995; Gélinas *et al.*,

1995). Segundo Hansen e Hansen (1994), o paladar do pão ácido, feito à base de trigo, é mais rico e aromático do que o pão de trigo de fabrico vulgar, devido ao longo período de fermentação que ocorre no primeiro caso. O aroma e paladar do pão advêm não só, como se disse, da fermentação da massa mas também da cor da sua própria crosta. Durante a panificação alguns compostos aromáticos evoluem-se, enquanto outros reagem com aminoácidos e outros constituintes da massa, determinando algumas das propriedades organolépticas do pão (Ponte e Reed, 1982).

d- Acrescentar (de um modo secundário) valor nutritivo ao pão. É por vezes referido que a levedura também contribui para o valor nutricional do pão. Embora as leveduras contenham proteínas e outros compostos de valor nutritivo, a sua contribuição para o valor nutritivo do pão não é muito significativa unicamente porque a levedura é utilizada nas massas panares em baixas proporções.

3. A MASSA PANAR

3.1. ESTABILIZAÇÃO E RETENÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO NA MASSA

Se no processo de fabrico do pão cotejarmos a posição única do trigo, quando comparada com a de outros cereais, verificamos que o facto se deve à capacidade da massa feita à custa de farinha de trigo ser capaz de reter o gás em expansão. Para se obter um pão leve, com boa textura do miolo, a massa deve ser capaz de reter os gases produzidos pelas leveduras durante a fermentação, sob a forma de pequenos alvéolos, durante um período relativamente longo. Estes alvéolos desempenham um papel crucial na retenção gasosa, mas o modo como se formam e especialmente o que lhes acontece durante a fermentação da massa está ainda pouco esclarecido.

Hoje, muitos investigadores reconhecem ser necessário o conhecimento da dinâmica reológica dos ingredientes que são utilizados, de modo a garantirem a melhor massa, bem como o de técnicas que permitam estudar tais propriedades, de modo a que o processo seja também eficiente (Baker, 1939; 1941; Baker e Mize, 1941; Petrofsky e Hosenev, 1995; Ruan *et al.*, 1995).

A estrutura esponjosa de uma massa durante o processo fermentativo era considerada uma discreta dispersão de alvéolos gasosos numa matriz contínua amilo-proteica (Baker, 1939; Baker e Mize, 1941). Hoje considera-se que as rupturas da matriz durante a panificação, provocam o aparecimento de uma fase gasosa contínua e, conseqüentemente, levam a uma rápida perda de gás. Mecanismos que controlam a retenção gasosa dão relevância ao glúten (Hosenev e Rogers, 1990) e aos lípidos polares não amídicos (MacRitchie e Gras, 1973). Outros autores referem o envolvimento de filmes de interface gás/líquido na massa em processo de fermentação. Os componentes responsáveis pela estabilidade dos filmes não são ainda conhecidos, mas parece não dependerem nem das proteínas nem dos lípidos polares não amídicos, mas possivelmente de pentosanos dissolvidos na fase aquosa da massa (Gan *et al.*, 1995).

3.2. OS ALVÉOLOS GASOSOS E A EXPANSÃO DA MASSA

A fase gasosa de uma massa existe dispersa sob a forma de pequenos alvéolos gasosos, numa fase semi-sólida que compreende amido, glúten e outros componentes de menor importância. Os "núcleos" dos alvéolos gasosos, que mais tarde expandirão dióxido de carbono, produzido pela fermentação das leveduras, são aí incorporados pela oclusão de ar durante a fase de mistura (Baker, 1941; Akdogan e Özilgen, 1992). As leveduras são incapazes de produzir novos alvéolos gasosos na massa, embora possa ocorrer subdivisão dos alvéolos pré-existentes, durante as operações de trabalho da massa e moldagem (Baker, 1941).

Em condições normais de panificação, a perda inicial de gás é lenta (uma vez que se deve à difusão para a superfície externa da massa, seguida

de evaporação) mas um acentuado aumento na taxa de perda ocorre no início da cozedura, atribuído à ruptura da matriz amilo-proteica que delimita os alvéolos gasosos; pensa-se que é o resultado da interconecção de alvéolos gasosos adjacentes, que convertem a massa de estrutura esponjosa numa outra, em que os alvéolos se rompem e permitem a saída directa de gás (Gan *et al.*, 1995). Por sua vez, a ruptura da matriz tem sido atribuída à gelatinização do amido, que provoca um aumento da viscosidade da massa (Eynard *et al.*, 1995; Roach e Hosenev, 1995; Shomer *et al.*, 1995).

Torna-se então difícil de conciliar o aumento da qualidade do pão devida ao uso de melhorantes oxidantes, que aumentam a resistência da massa à deformação com o facto da gordura e da água diminuírem essa mesma resistência (MacRitchie e Gras, 1973; Dennis *et al.*, 1994; Chen e Hosenev, 1995). Estes factos não explicam a razão da grande importância das proteínas no fabrico do pão: são cruciais na determinação da capacidade de manutenção do gás na massa. A polimerização das moléculas de glutenina como resultado da alteração sulfidril-dissulfureto (Gupta *et al.*, 1995; Weegels *et al.*, 1995) pode contribuir para o grande aumento da tensão elástica que ocorre na matriz amilo-proteica durante o aquecimento, levando à ruptura na massa e à perda da retenção gasosa (Gan *et al.*, 1995). Há autores que sugerem que o glúten contribui para a manutenção do gás diminuindo a sua difusão através da massa (Hosenev e Rogers, 1990).

O dióxido de carbono produzido pelas leveduras durante a fermentação encontra-se na fase aquosa da massa; daí difunde-se para os alvéolos gasosos, de onde se evapora, para concomitantemente gerar um excesso de pressão que fornece a energia conducente à expansão da massa. O CO₂ não se difunde dos alvéolos para o exterior porque a fase aquosa que os rodeia está saturada. A saturação desta fase é mantida à custa do CO₂ que continua a ser produzido pelas leveduras. Só uma pequena porção de gás se difunde para a superfície da massa e se evapora para a atmosfera circundante, originando uma lenta perda de gás a partir da massa. Perto do fim da cozedura ocorre, no entanto, um grande aumento na perda de gás. Embora alguns investigadores atribuam o facto a um aumento da taxa de

difusão através da fase aquosa da massa (Gan *et al.*, 1995), outros argumentam que esta enorme perda se deve à ruptura da matriz amilo-proteica (Ponte e Reed, 1982).

3.3. QUANTIFICAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO

O crescente aumento na procura dos diversos tipos de pão, aliado ao consumo por parte de países que até à 2ª Guerra Mundial o não faziam, fez desenvolver investigação e técnicas, de modo a encontrarem-se métodos para uma fácil e eficiente determinação da actividade das leveduras de panificação, quando inseridas na massa. O teste de panificação que estimava a actividade fermentativa das leveduras na massa, através da medição do tempo necessário para que uma determinada quantidade padrão de massa atingisse uma altura fixa, sob condições padronizadas, está sujeito a erros de cerca de 2,0 minutos em 70 minutos. Se adicionarmos os erros sistemáticos associados aos dias, operadores e estações experimentais, o erro é apreciável. Estes erros são devidos essencialmente às variações da pressão atmosférica e às dificuldades de controlar a temperatura durante o período de mistura, manuseamento e incubação de grandes volumes de massa (Burrows e Harrison, 1959). Uma análise crítica dos métodos publicados que se baseavam na medida, a pressão ou volume constante, da formação de dióxido de carbono, demonstrou que nenhum era suficientemente eficaz para ser usado como método de rotina nas fábricas de produção de levedura. O método denominado teste do fermentómetro baseia-se na medida do gás produzido a partir de uma pequena porção de massa, mantida a temperatura constante ao longo da experiência. Após numerosas determinações, este método acabou por ser adoptado como um método padrão para a determinação da actividade fermentativa da levedura na massa (Burrows e Harrison, 1959).

A tecnologia pôs hoje ao nosso alcance numerosos aparelhos, mais ou menos dirigidos ao estudo das massas e/ou da actividade das leveduras nessas massas. Tendo em conta que as qualidades fermentativas da massa

dependem da qualidade da farinha, da qualidade das leveduras e dos diferentes ingredientes adicionados e que as fases necessárias ao desenvolvimento da massa são: fermentação, retenção do gás, estabilidade da massa e equilíbrio entre as suas propriedades viscosas e elásticas, tem sido utilizado o reofermentómetro cujo funcionamento se encontra descrito na secção de Material e Métodos.

Para os produtores de levedura com fim industrial, a utilização do reofermentómetro é incontornável dada a necessidade de avaliar as suas leveduras ou mesmo avaliar novas estirpes, uma vez que este aparelho é considerado um dos mais completos para estudar as características fermentativas das farinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Tendo em conta os resultados dos testes de fermentação efectuados como descrito na secção de Material e Métodos do capítulo anterior, seleccionaram-se para o desenvolvimento experimental desta parte do trabalho, de entre as estirpes de levedura isoladas, 56 que apresentavam uma rápida fermentação da maltose.

1. DETERMINAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E BIOMASSA MÁXIMA DAS ESTIRPES SELECIONADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

1.1. MEIOS DE CULTURA

As leveduras foram inicialmente crescidas em meios onde se incorporou melaço de cana (Meio de Melaço de Cana [I] e Meio de Melaço de Cana [II]), conforme VI- 3 e 4 do Apêndice I. Dadas as características destes meios, e nas condições experimentais utilizadas, a avaliação do crescimento por turbidometria revelou-se impossível, levando-nos à utilização de outros meios de cultura de composição tanto quanto possível aproximada. Assim, os meios experimentados foram os seguintes:

1. meio mineral base com 2% de glucose (Y.P.D.).
2. meio mineral base com 2% de sacarose.
3. meio rico com 2% de sacarose (Y.P.S.).

A composição de cada um dos meios referidos encontra-se descrita na secção VI- 1, 2 e 6 do Apêndice I.

Todos os crescimentos foram efectuados à temperatura de 28°C e a pH 4 e 6. Uma vez que os crescimentos decorreram em "batch" para que o arejamento não se tornasse um factor limitativo da quantidade de biomassa formada no decorrer das experiências, fez-se borbulhar ar no interior dos balões utilizando bombas de aquário, através de tubos estéreis munidos de um filtro descartável também estéril (Fig. 3.1.).



Fig. 3.1. Aspecto da montagem utilizada no crescimento das leveduras mantendo o arejamento constante.

1.2. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MÁXIMA

A biomassa máxima foi determinada em células crescidas no meio Y.P.S. e estimada em termos de peso seco. As células foram deixadas a

crescer até à fase estacionária de crescimento (nas nossas condições experimentais, durante 24 horas) até uma densidade óptica compreendida no intervalo [3,5 - 5,5], medida a 640 nm (Espectrofotómetro Spectronic 21 Bausch & Lomb). Foram retirados triplicados de amostras de 5ml de suspensão de células que foram filtradas em membranas Schleicher & Schuell de 47mm de diâmetro e poro de 0,45µm, previamente pesadas, pré-lavadas e lavadas duas vezes com 10ml de água ultra-pura. O conjunto foi colocado numa estufa a 80°C por um período de 18-24 horas até ser novamente pesado. O valor encontrado para cada situação foi corrigido, uma vez que previamente determinámos o valor médio correspondente à desidratação das referidas membranas, por pesagem de oito membranas antes e depois de estarem o mesmo tempo na referida estufa. A biomassa corrigida foi expressa em mg de peso seco por ml de suspensão (mg . ml⁻¹).

Para confirmar se toda a sacarose tinha sido consumida, foram retiradas amostras ao longo do período de crescimento. Essas amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 12000 rpm (1400 g) e a concentração de sacarose determinada no sobrenadante utilizando um sistema "Boheringer Mannheim GmbH Sucrose/D-Glucose UV method test kit". Este método baseia-se na determinação da concentração da D-glucose antes e depois da hidrólise enzimática: a pH 7,6 a hexocinase catalisa a fosforilação da D-glucose pela adenosina-trifosfato, com formação simultânea de adenosina-difosfato. Na presença da glucose-6-fosfato desidrogenase, a glucose-6-fosfato formada é especificamente oxidada pela nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato a gluconato-6-fosfato, com formação de nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido. O composto formado nesta reacção é estequiométrico com a quantidade de D-glucose e pode determinar-se através da sua absorvância a 340 nm (Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS). A inversão enzimática ocorre quando, a pH 4,6, a sacarose é hidrolisada em D-glucose e D-frutose na presença da enzima β-frutosidase (invertase). O conteúdo em sacarose é calculado a partir da diferença entre as concentrações de D-glucose antes e depois da inversão enzimática.

1.3. DETERMINAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO

Calculámos as taxas específicas de crescimento (k_c) utilizando os valores da densidade populacional (x), obtidos durante o crescimento exponencial, quer utilizando o método turbidimétrico (D.O._{640nm}) quer determinando os valores da biomassa (peso seco de células expresso em g . l⁻¹). Deste modo, cada um dos valores de k_c foi calculado a partir do declive da recta (crescimento exponencial), definido pela equação:

$$\ln x_t = \ln x_{t_0} + k_c (\Delta t),$$

e,

$$k_c = (\ln x_t - \ln x_{t_0}) \cdot (\Delta t)^{-1},$$

em que x e x_0 representam os valores da densidade populacional em termos de peso seco ou de turbidimetria, respectivamente para os tempos t e t_0 .

2. PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO NAS MASSAS

Das leveduras experimentadas, foram seleccionadas cinco estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* (DB 52A; DB 55A; DB 55B; DB 56A e DB 56 B) e três de *Torulaspota delbrueckii* (DB 42B; DB 48B e DB 62A), em virtude da sua grande capacidade de fermentar a maltose, da sua elevada produção de biomassa e da sua taxa específica de crescimento. Para podermos ter padrões para comparação, além destas estirpes foram utilizadas também três de *S. cerevisiae*, duas provenientes da panificação industrial (F 46 e F 65) e uma originalmente isolada a partir de levedura seca activa, utilizada em vinificação (IGC 4072). Foi igualmente utilizada uma estirpe de *T.*

delbrueckii (IGC 4478), proveniente de mosto. As duas últimas estirpes referidas foram fornecidas pela Coleção Portuguesa de Leveduras (PYCC), Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal.

O registo, na Coleção Portuguesa de Leveduras, das leveduras que isolámos e com que trabalhamos, fez com que, a partir deste momento o código referente a cada estirpe por nós isolada venha precedido do código atribuído pelo IGC evitando possíveis confusões.

A totalidade das estirpes utilizadas para avaliação da produção de CO₂ nas massas e nas experiências seguintes estão sintetizadas na Tabela 3.I.

Tabela 3.I. Estirpes seleccionadas para avaliação da produção de CO₂ nas massas.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>
Estirpes isoladas a partir de iscos de broas caseiras	IGC 5317 (DB 52A)	IGC 5321 (DB 42B)
	IGC 5318 (DB 55A)	IGC 5322 (DB 48B)
	IGC 5319 (DB 55B)	IGC 5323 (DB 62A)
	IGC 5320 (DB 56A)	
	IGC 5324 (DB 56B)	
Estirpes isoladas a partir de pasta de fermento industrial	IGC 5325 (F 46)	
	IGC 5326 (F 65)	
Estirpes com outras proveniências	IGC 4072	IGC 4478

2.1. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE LEVEDURA

As leveduras foram crescidas no meio Y.P.S. e nas condições referidas (Apêndice I). O crescimento processou-se em "erlenmeyer", num volume útil de cerca de metade do mesmo, permitindo assim eficiente

arejamento e homogeneização, numa incubadora orbital (Certomat R HK, B. Braun) a 160 rpm. Os "erlenmeyer" foram inoculados com células provenientes de um inclinado de Y.P.G., com idade compreendida entre dois e quatro dias.

As células, crescidas durante um período de 24 horas a 30°C (D.O. [3,5 - 5,5]), foram colhidas e centrifugadas (centrífuga Sigma 4K10 - B. Braun) a 7000 rpm (800 g) durante 2 minutos, a 4°C. Estas células foram lavadas duas vezes com água desionizada fria. Rejeitado o sobrenadante, o sedimento obtido foi mantido em gelo até ser utilizado.

Para verificarmos o efeito do meio de crescimento e da adição de NaCl sobre a produção de CO₂ nas massas, as leveduras foram crescidas em meios com as seguintes alterações nas fontes de carbono:

a - 1,9% de sacarose e 0,1% de maltose.

b - 1,5% de sacarose e 0,5% de maltose.

c - 2% de maltose (Y.P.M.).

d - 2% sacarose e 3% NaCl.

2.2. PREPARAÇÃO DAS MASSAS

As massas foram preparadas seguindo o protocolo "Chopin" ligeiramente modificado. A farinha de trigo utilizada proveio da Moagem Harmonia e era de tipo 75 corrigida, com as seguintes características: cinzas totais: 0,63; alveograma: W=190 erg; T/L= 1; glúten: 10,5%; proteína: 11,0%; humidade: 13,7%. Apresentava as seguintes correcções: 20 ppm de ácido ascórbico e 130 ppm de enzimas amilolíticas e fúngicas. Pesaram-se 250g de farinha de trigo, 5g de NaCl [Merck], 7,5g do sedimento de levedura já obtido e, de acordo com o grau de humidade da farinha, mediram-se 130 ml de água da torneira.

Num copo de vidro dissolveu-se a levedura na água. Em seguida adicionou-se esta suspensão à farinha e amassou-se manualmente durante

um minuto. Ao fim deste tempo juntou-se o sal e continuou-se a amassar do mesmo modo, até perfazer oito minutos. Pesaram-se então 315g da massa resultante que, de imediato foram colocados no reofermentómetro aguardando aí, a uma temperatura de cerca de 27-28°C, cerca de 5 minutos de modo a homogeneizar a temperatura no interior da cuba de fermentação. Findo este período, a cuba foi tornada estanque e o botão de activação dos ciclos foi ligado. No interior da cuba de fermentação o processo decorreu 3 horas e 3min. O registo dos diversos resultados foi compilado para posterior análise, sendo a capacidade fermentativa expressa em ml de dióxido de carbono produzidos durante três horas por 100g de massa ($\text{ml CO}_2 \cdot 3\text{h}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ massa).

2.3. UTILIZAÇÃO DO REOFERMENTÓMETRO

Neste trabalho o aparelho utilizado para avaliar a libertação gasosa (libertação total de CO_2 e quantidade de CO_2 retida na massa) bem como algumas das propriedades reológicas da massa foi o reofermentómetro (Rheofermentometer Chopin F2, Tripette & Renaud, Villeneuve-la-Garenne, France).

O reofermentómetro é um aparelho formado no essencial por duas unidades, a unidade gasométrica e o registador, conforme se mostra na Fig. 3.2..

A unidade gasométrica compreende: uma cavidade que pode ser hermeticamente fechada e que possui controlo de temperatura; uma tampa com sensor óptico, cujo deslocamento, em função dos pesos a que fica sujeita, permite avaliar o aumento do volume da massa; uma cuba móvel perfurada, que recebe a massa e que permite a condução rápida dos gases produzidos até ao sensor de pressão; um suporte com quatro discos amovíveis de 500g cada; um programador electrónico que permite determinar as variações sequenciais de pressão, graças a um conjunto de quatro electroválvulas.

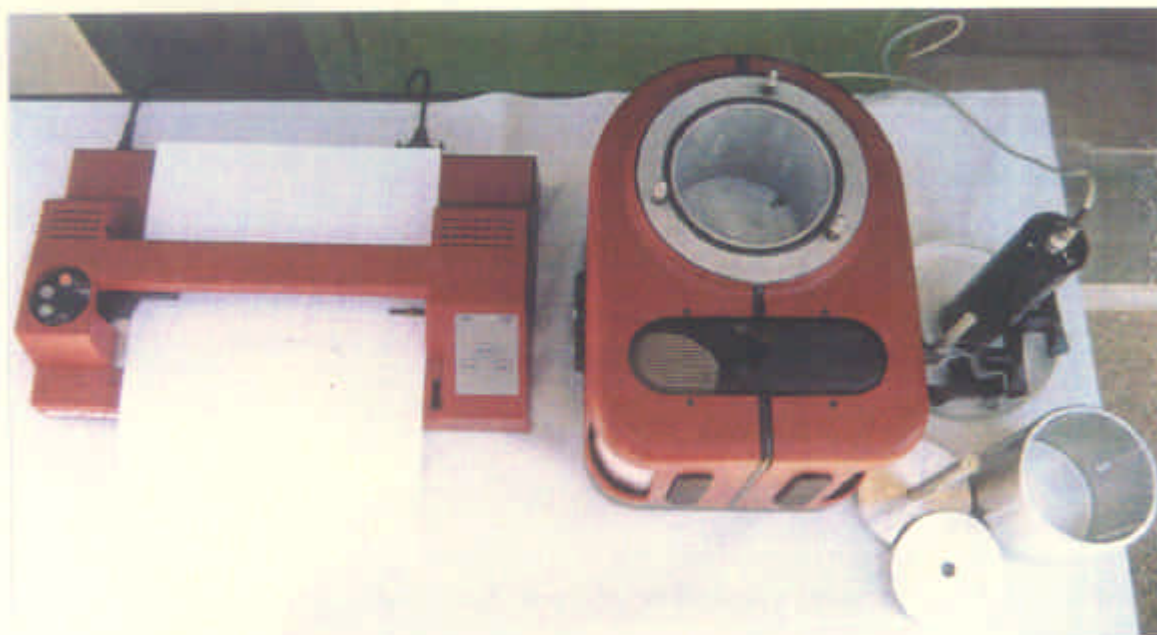


Fig.3.2. O reofermentómetro de "Chopin" e alguns dos seus acessórios.

O registador, ligado à unidade gasométrica, apresenta seis canetas e permite o traçado das curvas e o registo dos resultados. É importante ter em conta que a interpretação linear dos resultados só deve ser feita no caso de se utilizar o protocolo que acompanha o manual de instruções.

Os registos obtidos permitem em termos comparativos avaliar, por exemplo, a capacidade fermentativa na massa das leveduras utilizadas (Figs. 3.3., 3.4. e 3.5).

É também importante referir que de tais registos consta não só a libertação gasosa, onde se encontra referido o número total de ml de CO_2 libertado durante o ensaio, mas ainda os valores de parâmetros relacionados com o desenvolvimento panar.

CHOPIN REOFERMENTOMETRO	
DATA : 6.1.75	
OBJECTIVO: 65A	
TEMPO DE CICLO: 45s	DURAÇÃO DO ENSAIO: 3h03m
DESENVOLVIMENTO PANAR :	
Hm : 45,3 mm	T1 : 3h00m
h : 43,4 mm	T2 : -----
(Hm-h) / Hm : 4,1 %	
VOLUME PANAR MEDIO	
TOLERANCIA PANAR MUITO BOA	
QUALIDADE DA REDE PROTEICA MUITO BOA	
VELOCIDADE DO DESENVOLVIMENTO FRACA	
LIBERTAÇÃO GASOSA :	
H'm : 48,1 mm	T'1 : 2h27m
Tx : 2h25m	
VOLUME TOTAL : 1059 ml	
VOLUME CO2 PERDIDO : 45 ml	
VOLUME DE RETENÇÃO : 1013 ml	
COEFICIENTE DE RETENÇÃO : 95,8 %	
PRODUÇÃO TOTAL DE CO2 FRACA	
PROLONG. ACTIVID. FERMENT. MUITO BOM	
PODER DE RETENÇÃO MUITO BOM	
APARICAO DA POROSIDADE TARDIA	
VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE CO2 FRACA	
COMENTARIOS : γ_{P_2} 1400127.	
ZY2 82-2.12	

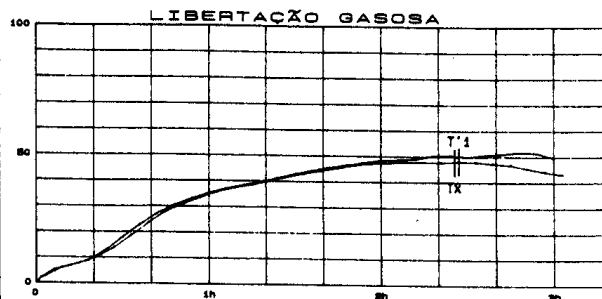
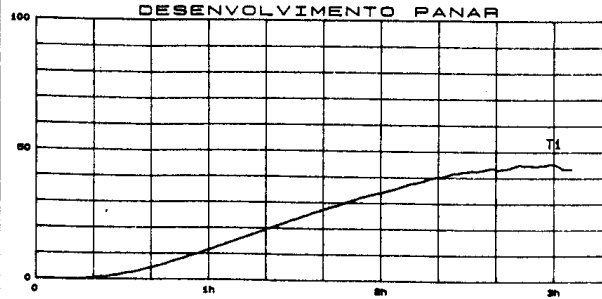
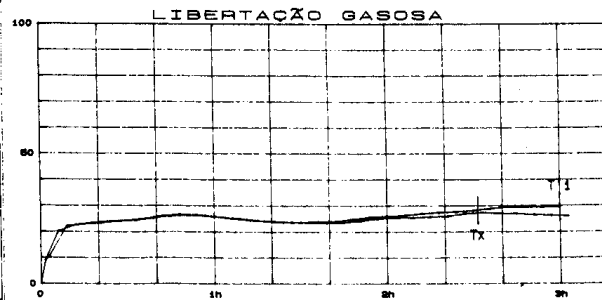
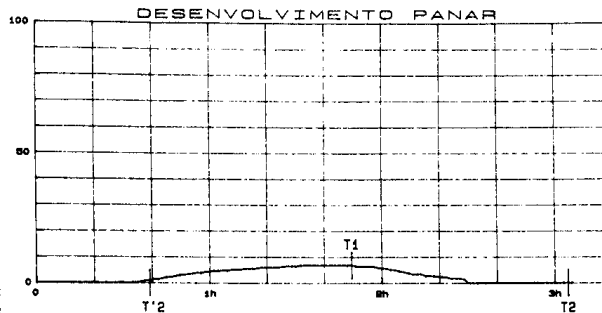


Fig. 3.3. Registo obtido no reofermentómetro para uma massa fermentada por uma levedura comercial (IGC 5326 [F 65]).

CHOPIN REOFERMENTOMETRO	
DATA :	
OBJECTIVO:	
TEMPO DE CICLO: 45s	DURAÇÃO DO ENSAIO: 3h03m
DESENVOLVIMENTO PANAR : (*)	
Hm : 6,9 mm	T1 : 1h49m
h : , mm	T2 : 3h04m
(Hm-h) / Hm : 100,0 %	
VOLUME PANAR NÃO PANIFICAVEL	
TOLERANCIA PANAR BOA	
QUALIDADE DA REDE PROTEICA MUITO BOA	
VELOCIDADE DO DESENVOLVIMENTO FRACA	
LIBERTAÇÃO GASOSA : (*)	
H'm : 29,5 mm	T'1 : 3h00m
Tx : 2h31m	
VOLUME TOTAL : 729 ml	
VOLUME CO2 PERDIDO : 28 ml	
VOLUME DE RETENÇÃO : 700 ml	
COEFICIENTE DE RETENÇÃO : 96,1 %	
PRODUÇÃO TOTAL DE CO2 INSUFICIENTE	
PROLONG. ACTIVID. FERMENT. BOM	
PODER DE RETENÇÃO MUITO BOM	
APARICAO DA POROSIDADE TARDIA	
VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE CO2 FRACA	
COMENTARIOS : (*) INTERPRETAÇÕES VÁLIDAS NO CASO DE UTILIZAÇÃO DO PROTOCOLO CHOPIN.	
ZY2 84-2.15	



Figs. 3.4. Aspecto do registo obtido no reofermentómetro num ensaio em que se verificou produção total de CO₂ insuficiente.

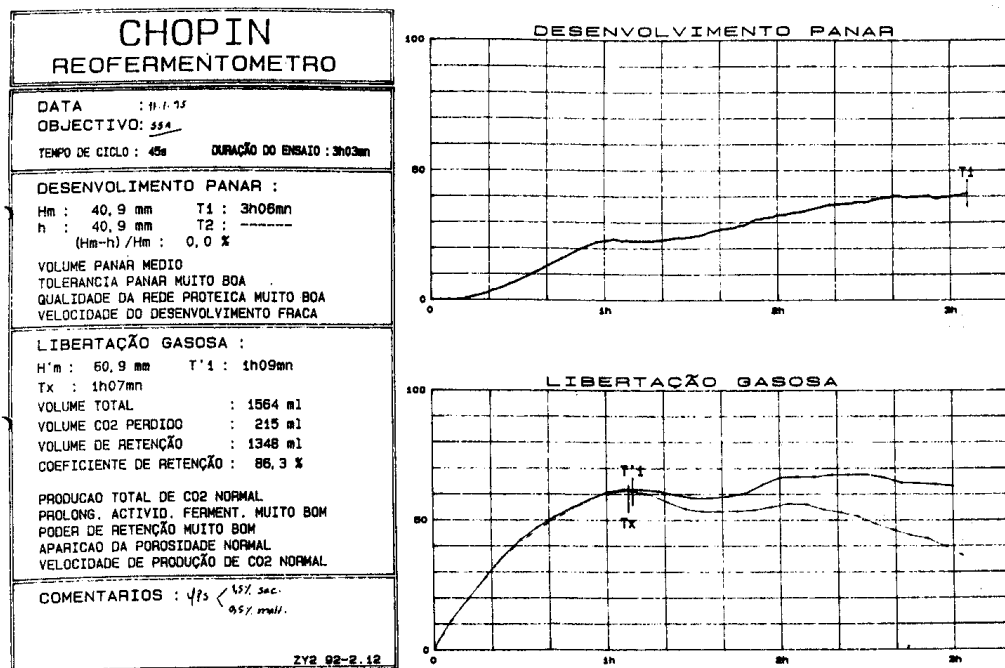


Fig. 3.5. Aspecto do registo obtido no reofermentómetro num ensaio em que se verificou uma produção total de CO₂ normal.

2.4. ESTUDOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

Algumas amostras de massas imediatamente após a preparação ou após 3 horas de fermentação foram observadas e fotografadas num microscópio electrónico de varrimento (M.E.V.), Leica S 360, com uma voltagem de aceleração de 10 Kv, pertencente à Universidade do Minho.

Para a preparação do material procedeu-se do seguinte modo: pequenas porções das amostras que se pretendiam observar foram directamente montadas em porta-amostras metálicos apropriados a M.E.V. ("stubs"). Os porta-amostras foram previamente preparados colando à sua superfície fita auto-adesiva dupla de modo a cobri-la em toda a sua extensão. Nestas condições procedeu-se ao congelamento a -70°C dos conjuntos, durante 24 horas. Decorrido este tempo o material foi liofilizado [liofilizador Christ-Alpha 2-4, B. Braun] durante 24 horas e de imediato

transferido para um exsiccador até ser metalizado. A metalização, feita com uma camada de ouro de cerca de 200 Å de espessura, efectuou-se imediatamente antes de se proceder às observações.

3. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA INVERTASE E DA α -GLUCOSIDASE

Avaliou-se a actividade específica destas duas enzimas em células crescidas durante 24 horas a 30°C nos mesmos meios referidos na secção 2.1. e preparados conforme consta do Apêndice I.

3.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS CELULARES

Obtidos os sedimentos celulares conforme foi descrito em 2.1., procedeu-se do seguinte modo: a cada sedimento correspondente a 2ml de suspensão celular adicionaram-se 2ml de tampão imidazol [Sigma] 20 mM, pH7 e 1,5g de esferas de vidro de diâmetro compreendido entre 425 e 600 μ m [Sigma]. O conjunto foi fortemente agitado num "vortex" durante um minuto, seguindo-se um minuto de repouso em gelo; este procedimento foi repetido 20 vezes, no sentido de se obter o maior número de células reventadas. De imediato, o extracto foi sujeito a uma centrifugação de 25 min a 14000 rpm (1700 g) e a 4°C, de modo a separar-se quer das esferas de vidro quer dos restos celulares. Este extracto foi então utilizado para os doseamentos enzimáticos.

3.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA INVERTASE

O método utilizado (Sumner e Sommers, 1944) foi implementado do seguinte modo: num banho termostatzado a 30°C colocaram-se dois "erlenmeyer" contendo cada um 8ml de sacarose [Sigma] 10% (p/v) em

tampão imidazol [Sigma] 0,1M, pH7; decorridos cerca de cinco minutos, de modo a homogenizar a temperatura, adicionou-se a um deles 0,08ml de extracto celular (a que correspondeu o início da reacção), enquanto o outro serviu de controlo.

A partir do tempo zero e minuto a minuto, até um máximo de cinco, foram retiradas amostras de 0,5ml que se adicionaram a 0,5ml de ácido dinitrossalicílico (DNS) [Merck] previamente colocado em tubos de ensaio. Preparou-se ainda um branco a que se juntou 0,5ml de DNS a 0,5ml da mistura reaccional.

Estes tubos, devidamente vedados, de modo a evitar a evaporação, foram colocados num banho de água fervente durante cinco minutos e seguidamente em gelo. Adicionou-se então a cada tubo 10ml de água ultra-pura fria, agitou-se e leu-se a densidade óptica (D.O.) a 540 nm (Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS, munido de controlo de temperatura e ligado a uma impressora Epson II) contra o branco preparado.

Previamente tinham sido preparados padrões nas mesmas condições das amostras, a partir de soluções aquosas de sacarose [Sigma] com as seguintes concentrações: 0,0g/ml; 0,2g/ml; 0,4g/ml; 0,6g/ml; 0,8g/ml e 1,0g/ml. A partir dos resultados obtidos foi feita uma curva de calibração da glucose em equivalentes de açúcar redutor pelo método do DNS.

A partir da curva de calibração e tendo em conta os valores das velocidades iniciais da reacção, determinou-se a quantidade de glucose formada em equivalentes de açúcar redutor. A unidade de actividade enzimática foi definida como o número de μ moles formados (ou consumidos) de um substrato, por unidade de tempo (minuto), em condições definidas de temperatura e pH por g de peso seco.

A determinação da actividade enzimática foi repetida para três diferentes concentrações de extracto celular.

3.3. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA α -GLUCOSIDASE

A actividade da α -glucosidase foi determinada a 30°C pelo método descrito por Operti *et al.*, (1982). Num banho de temperatura controlada a 30°C colocaram-se dois "erlenmeyer" contendo cada um 7ml de uma mistura reaccional constituída por uma solução de *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo (PNPG) [Sigma] 10mM em tampão imidazol [Sigma] 20mM, pH 7; após cinco minutos iniciou-se a reacção, adicionando-se a um deles 0,5ml de extracto celular; o outro "erlenmeyer" serviu de controlo.

A partir do tempo zero e minuto a minuto até um máximo de cinco minutos, foram retiradas amostras de 1ml que se adicionaram a 1ml de Na₂CO₃ [Merck] 1M previamente colocado em tubos de ensaio. Preparou-se ainda um branco onde se adicionou a 1ml de Na₂CO₃ 1M, 1ml da mistura reaccional.

A cada um destes tubos de ensaio adicionaram-se 10ml de água ultra-pura e foi lida a D.O. a 400nm contra o branco previamente preparado.

Anteriormente foram preparados padrões nas mesmas condições das amostras, utilizando concentrações de *p*-nitrofenol [Sigma] que variaram de 0,00mM a 1,00mM. Com os resultados obtidos foi elaborada uma curva de calibração do *p*-nitrofenol.

Tendo em conta os valores das velocidades iniciais da reacção, e a curva de calibração obtida, determinou-se a quantidade de *p*-nitrofenol formado por unidade de tempo. Definiu-se a unidade de actividade enzimática do modo previamente descrito para a determinação da actividade da invertase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E CAPACIDADE FERMENTATIVA

Com o objectivo de avaliar a potencial utilização na panificação das estirpes indígenas isoladas dos fermentos tradicionais uma prévia crivagem foi levada a cabo, baseada na sua capacidade fermentativa da maltose, na produção de biomassa e da respectiva capacidade fermentativa na massa. Como é comumente conhecido, nas massas desprovidas de um hidrato de carbono edulcorante, o principal açúcar fermentável pelas leveduras é a maltose, libertada a partir do amido das farinhas pelas amilases, sendo vulgarmente aceite que uma boa levedura para panificação deve ser capaz de fermentar rapidamente a maltose (Burrows e Harrison, 1959; Evans, 1990).

Das 95 estirpes previamente isoladas, 56 fermentavam a maltose. Destas últimas, 32 pertenciam ao género *Saccharomyces*, 16 ao género *Torulaspota*, seis ao género *Pichia* e duas ao género *Kluyveromyces*. Estas estirpes foram então estudadas no que respeita às suas taxas de crescimento e produção de biomassa de modo a eliminar as estirpes de crescimento lento e de baixo rendimento.

Como já foi referido, os substratos mais apropriados para o crescimento são os que envolvem o melaço de cana ou de beterraba, uma vez que são os vulgarmente usados na indústria para propagar as leveduras de panificação. No entanto, de acordo com alguns autores (Oda e Tonomura, 1993) há uma variação considerável na qualidade do melaço causada por uma flutuação imprevisível da sua composição química, que pode influenciar os resultados experimentais, enquanto outros referem o seu papel inibidor no processo fermentativo levado a cabo pelas leveduras (Fattohi, 1994a; 1994b) ou ainda como responsável pela inactivação reversível da invertase de *S. cerevisiae* (Zech e Görisch, 1995). Por outro lado, constatámos

que, nas nossas condições laboratoriais, o crescimento de leveduras em meios com melação era difícil de fixar e determinar. Para ultrapassar estes problemas utilizaram-se outros meios de composição tanto quanto possível semelhante à do meio de melação e frequentemente referidos por outros investigadores na mesma área (Oda e Ouchi, 1990a; Clemént *et al.*, 1993; Oda e Tonomura, 1993).

Os resultados que obtivemos levaram-nos a inferir que para a maioria das leveduras experimentadas, o meio mais adequado para obter elevados rendimentos em biomassa era o meio Y.P.S. (pH 6,0). Assim, foi possível seleccionar cinco estirpes de *S. cerevisiae* e três de *T. delbrueckii* que apresentavam, em relação aos parâmetros estudados, valores altamente satisfatórios.

Na Tabela 3.II apresentam-se as taxas específicas de crescimento e biomassa máxima bem como a capacidade fermentativa, em massas desprovidas de açúcar, das estirpes seleccionadas. Como termos de comparação foram igualmente estudadas duas estirpes de *S. cerevisiae* (IGC 5325 [F 46] e IGC 5326 [F 65]) isoladas de pasta de levedura comercial, bem como as estirpes IGC 4072 e IGC 4478, respectivamente de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, isoladas a partir de outros tipos de substratos, como já foi anteriormente referido. Podemos constatar que os valores estimados para a taxa específica de crescimento variavam entre 0,51 e 0,70 h⁻¹, tendo os mais baixos sido verificados genericamente nas estirpes de *T. delbrueckii*. O valor mais elevado foi registado numa estirpe de *S. cerevisiae* proveniente de fermento comercial. Os valores da biomassa máxima apresentaram-se de um modo geral elevados, detectando-se um único valor inferior a 10g . l⁻¹ na estirpe *S. cerevisiae* IGC 5317 (DB 52A). Valores superiores a 12g . l⁻¹ e mais elevados do que os obtidos, nas mesmas condições, para as estirpes comerciais verificaram-se em duas estirpes de *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B] e IGC 5323 [DB 62A]), pertencentes ao grupo de leveduras que isolámos.

Tabela 3.II. Taxa específica de crescimento, biomassa máxima e capacidade fermentativa na massa das leveduras seleccionadas, quando crescidas no meio Y.P.S. (pH 6, 28°C).

Estirpes de leveduras	Taxa específica de crescimento (h ⁻¹)	Biomassa máxima (g . l ⁻¹)	Capacidade fermentativa (ml CO ₂ . 3h ⁻¹ . 100g ⁻¹ massa)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5317 (DB 52A)	0.56	9,3	229
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5318 (DB 55A)	0.67	10,6	414
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5319 (DB 55B)	0.61	11,9	402
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5320 (DB 56A)	0.64	10,0	429
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5324 (DB 56B)	0.62	10,0	352
<i>Torulaspora delbrueckii</i> IGC 5321 (DB 42B)	0.51	12,3	427
<i>Torulaspora delbrueckii</i> IGC 5322 (DB 48B)	0.62	10,2	233
<i>Torulaspora delbrueckii</i> IGC 5323 (DB 62A)	0.53	13,2	429
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5325 (F 46A)	0.60	10,6	476
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 5326 (F 65A)	0.70	11,6	447
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4072	0.63	10,4	223
<i>Torulaspora delbrueckii</i> IGC 4478	0.53	10,3	270

Em relação à capacidade fermentativa na massa, cerca de metade das estirpes estudadas produziam entre 400 e 500 ml CO₂ . 3h⁻¹ . 100g⁻¹ massa, sendo os valores mais elevados encontrados nas estirpes provenientes da panificação industrial. Pelo contrário três das estirpes, incluindo as estirpes de colecção, apresentavam uma capacidade fermentativa baixa, com valores compreendidos entre 200 e 300 ml CO₂ . 3h⁻¹ . 100g⁻¹ massa. As estirpes IGC 5318 (DB 55A), IGC 5319 (DB 55B) e IGC 5320 (DB 56A) de *S. cerevisiae* e IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) de *T. delbrueckii* possuíam elevada

produção de biomassa, associada a grande capacidade fermentativa das massas, evidenciando valores muito próximos dos encontrados para as estirpes industriais de *S. cerevisiae* (Tabela 3.II.).

2. EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS NA MASSA

Para verificar se a adição de NaCl ao meio de crescimento das estirpes tinha algum efeito sobre a sua capacidade fermentativa na massa, estas foram crescidas durante 24 horas a 30°C no meio Y.P.S. com 3% de NaCl. Os resultados obtidos em relação à biomassa máxima produzida nessas condições de crescimento bem como à capacidade fermentativa das leveduras na massa estão apresentadas na Tabela 3. III. Podemos verificar que a biomassa obtida ao fim desse tempo e, para qualquer das estirpes, diminuiu consideravelmente, sendo esse decréscimo da ordem dos 25% a 30% em relação aos valores obtidos no meio sem adição de NaCl. No que diz respeito à capacidade fermentativa, verifica-se em duas estirpes de *S. cerevisiae* isoladas dos fermentos tradicionais tendência para um aumento da ordem dos 8% a 10%. Quando analisámos os valores encontrados para as estirpes de *T. delbrueckii* isoladas, o sentido da constatação pode considerar-se, de algum modo, invertido: nestes casos, e nas mesmas condições a actividade fermentativa tende a diminuir, numa ordem de grandeza que não difere em muito da referida para o aumento verificado para as estirpes de *S. cerevisiae*. Comportamento idêntico ao que acabámos de descrever para a generalidade das estirpes de *T. delbrueckii* isoladas, encontra-se nas estirpes de *S. cerevisiae* de proveniência comercial. No que respeita às estirpes laboratoriais e apesar de apresentarem já valores baixos de produção de CO₂ no meio Y.P.S., os resultados que obtivemos parecem indicar que a presença de NaCl provoca também um pequeno decréscimo da capacidade fermentativa.

Tabela 3.III. Efeito da adição de NaCl ao meio Y.P.S. sobre a produção de biomassa e capacidade fermentativa das leveduras.

Estirpes de leveduras	Adição de 3% de NaCl	Biomassa máxima g.l ⁻¹	Capacidade fermentativa ml CO ₂ . 3h ⁻¹ .100g ⁻¹ massa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	10,6	414
IGC 5318 (DB 55A)	+	7,8	467
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	11,9	402
IGC 5319 (DB 55B)	+	9,2	424
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	10,0	429
IGC 5320 (DB 56A)	+	7,5	364
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	12,3	427
IGC 5321 (DB 42B)	+	9,1	404
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	13,2	389
IGC 5323 (DB 62A)	+	9,6	425
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	10,6	476
IGC 5325 (F 46)	+	8,0	365
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	11,6	447
IGC 5326 (F 65)	+	8,5	342
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	10,4	223
IGC 4072	+	7,7	219

Nota: Os resultados apresentados representam os valores médios de três experiências distintas.

Estes resultados, obtidos para as estirpes que isolámos de fermentos de broas portuguesas, diferem em alguns aspectos dos obtidos por Oda e Tonomura (1993a; 1993b). De acordo com estes autores, a presença de 3% de NaCl no meio Y.P.S. e em massas desprovidas de açúcar, estimulava a capacidade fermentativa da maioria das estirpes de *S. cerevisiae* por eles estudadas, enquanto se observava um decréscimo do referido efeito nas estirpes quer de *T. delbrueckii* quer de *T. pretoriensis*. Curiosamente, se compararmos os resultados destes investigadores obtidos para *S. cerevisiae*, com os que obtivemos para a mesma espécie e provenientes de levedura prensada comercial, os resultados são discordantes: no nosso caso, pode dizer-se que a presença de 3% de NaCl fez diminuir consistentemente a capacidade fermentativa das estirpes experimentadas. Independentemente do

possível estímulo que a presença de NaCl no meio de crescimento possa induzir na capacidade fermentativa das leveduras na massa, a sua utilização não é desejável, pois a redução na produção de biomassa é notória, o que inviabiliza uma eventual produção industrial de levedura.

3. EFEITO DA FONTE DE CARBONO DO MEIO DE CRESCIMENTO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS NA MASSA

Como já foi referido, nas massas preparadas sem adição de açúcar, é a maltose a principal fonte de carbono para as leveduras, proveniente do amido da farinha, por acção das amilases (Harrison, 1971; Beudeker *et al.*, 1990; Evans, 1990). No entanto, a propagação comercial das leveduras de panificação (*S. cerevisiae*) faz-se em meio de melaço de cana ou de beterraba, em que a quantidade de maltose é negligível. Uma vez que a presença de maltose no meio de crescimento induz o transportador deste açúcar (Lagunas, 1993), fomos averiguar o efeito de concentrações crescentes de maltose no meio de crescimento (Y.P.S.) ou mesmo a total substituição da sacarose por maltose no referido meio, sobre a capacidade fermentativa das leveduras. A Tabela 3.IV. sumariza os resultados obtidos para a capacidade fermentativa das leveduras experimentadas, quando crescidas em sacarose, em maltose e em misturas destas duas fontes de carbono e energia. Pode verificar-se que a presença de maltose no meio de crescimento contribuiu, na maioria dos casos, para um aumento da capacidade fermentativa da levedura na massa, observando-se um ligeiro incremento nos casos em que a concentração de maltose foi superior (0,5%). No entanto, quando toda a sacarose foi substituída por maltose (Y.P.M.), a capacidade fermentativa das leveduras nas massas diminuiu, sendo comparável às situações em que se usaram concentrações inferiores de maltose em combinação com a sacarose.

Tabela 3.IV. Efeito da fonte de carbono na capacidade fermentativa das leveduras seleccionadas, nas massas.

Estirpes de leveduras	Fonte de Carbono no Meio de Crescimento			
	2% sacarose	1,9% sacarose +0,1% maltose	1,5% sacarose +0,5% maltose	2% maltose
	Capacidade fermentativa (ml CO ₂ .3h ⁻¹ .100g ⁻¹ massa)			
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5317 (DB 52A)	229	ND	217	ND
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5318 (DB 55A)	414	457	505	408
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5319 (DB 55B)	402	477	480	ND
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5320 (DB 56A)	429	442	467	ND
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5324 (DB 56B)	352	ND	416	ND
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5321 (DB 42B)	427	391	367	382
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5322 (DB 48B)	233	ND	251	ND
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5323 (DB 62A)	389	ND	363	ND
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5325 (F 46)	476	460	457	390
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5326 (F 65)	447	ND	438	ND
<i>S. cerevisiae</i> IGC 4072	223	ND	230	ND
<i>T. delbrueckii</i> IGC 4478	270	ND	268	ND

ND - não determinado.

Nota: os resultados apresentados representam os valores médios determinados para três experiências distintas.

É interessante notar o caso da estirpe *S. cerevisiae* IGC 5318 (DB 55A) que, quando crescida num meio com 1,5% de sacarose e 0,5% de maltose aumentou de forma bastante significativa a sua produção de CO₂ (cerca de 100ml CO₂.3h⁻¹.100g⁻¹ massa) e quando crescida num meio com 2% de maltose, apresentou valores inferiores aos obtidos em Y.P.S.. Ao contrário

do verificado para as estirpes de *S. cerevisiae*, nas estirpes de *T. delbrueckii* estudadas a capacidade fermentativa ou não sofreu alterações apreciáveis ou, como é o caso de *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) decresceu. À semelhança do verificado quando da adição de NaCl ao meio, a biomassa máxima produzida em meio com maltose apresentou uma diminuição da ordem dos 25% para a generalidade das estirpes estudadas (resultados não apresentados).

4. EFEITO DA FONTE DE CARBONO DO MEIO DE CRESCIMENTO NAS ACTIVIDADES DA α -GLUCOSIDASE E DA INVERTASE

4.1. ACTIVIDADE DA α -GLUCOSIDASE

Os resultados respeitantes à actividade da α -glucosidase nos meios referidos na secção anterior bem como em Y.P.S. com 3% de NaCl estão sumariados na Tabela 3.V.. Para a totalidade das estirpes experimentadas, verificou-se que concentrações crescentes de maltose no meio induziam maior actividade da α -glucosidase, sendo esse aumento menos significativo para as estirpes de *S. cerevisiae* isoladas dos fermentos tradicionais. No que diz respeito à presença de 3% de NaCl no meio Y.P.S. registou-se um aumento da actividade enzimática para todas as estirpes, mas muito inferior ao verificado nos meios com maltose. Tal aumento foi mais notório nas estirpes de *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A] e IGC 5325 [F 46]. Os valores encontrados para a actividade desta enzima na estirpe proveniente da panificação industrial, qualquer que tivesse sido o meio de crescimento utilizado, foram sempre superiores aos encontrados para as estirpes de *S. cerevisiae* por nós isoladas e inferiores aos determinados para as estirpes de *T. delbrueckii*. Em estudos efectuados por Oda e Tonomura (1993b) utilizando uma estirpe de *S. cerevisiae* de proveniência industrial e estirpes de *T. pretoriensis*, estes autores verificaram também que o meio com maltose

induzia a actividade da α -glucosidase, tendo encontrado valores 16 vezes superiores na presença de maltose no caso de *S. cerevisiae* e cerca de oito vezes para *T. pretoriensis*.

Apesar da actividade da α -glucosidase aumentar com a concentração crescente de maltose no meio de crescimento, verificou-se que a capacidade fermentativa, no caso das estirpes de *S. cerevisiae* que isolámos, só aumentava na presença de 0,1% e 0,5% de maltose. Nas estirpes de *T. delbrueckii* e na estirpe de proveniência comercial IGC 5321 (F 46) ocorreu, para os diversos meios de crescimento com maltose, uma diminuição da capacidade fermentativa destas leveduras nas massas.

Tabela 3.V. Actividade da α -glucosidase das leveduras seleccionadas, quando crescidas no meio Y.P. em que se fez variar a concentração da fonte de carbono e em Y.P.S. na presença de 3% de NaCl.

Estirpes de leveduras	Fonte de Carbono no Meio de Crescimento				
	2% sacarose	1,9% sacarose + 0,1% maltose	1,5% sacarose + 0,5% maltose	2% maltose	2% sacarose + 3% NaCl
	Actividade da α -glucosidase $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco				
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5318 (DB 55A)	20,87	96,23	146,10	223,68	24,38
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5319 (DB 55B)	13,01	73,99	133,90	179,96	14,07
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5320 (DB 56A)	22,83	182,24	247,78	406,77	50,74
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5325 (F 46)	29,13	239,94	336,11	460,93	53,17
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5321 (DB 42B)	435,57	565,77	665,10	886,58	530,87
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5323 (DB 62A)	452,60	626,51	657,88	1004,28	578,05

Nota: os resultados patentes representam os valores médios determinados a partir de três experiências distintas.

A capacidade fermentativa de massas sem adição de açúcar é uma das propriedades mais importantes das leveduras de panificação e está estreitamente relacionada com a sua capacidade fermentescível da maltose (Oda e Ouchi, 1989). Nas estirpes de *S. cerevisiae* maltose-fermentativas, um ou mais de cinco genes estão envolvidos e a expressão quer da α -glucosidase quer da permease da maltose são induzidas pela maltose no meio de crescimento. Em *S. cerevisiae*, a maltose exógena é transportada para o interior das células pela permease da maltose e sucessivamente hidrolisada em glucose pela α -glucosidase (Oda e Tonomura, 1995). Estudos feitos por estes autores sugerem que a permease da maltose e a α -glucosidase determinam especialmente a velocidade da fermentação da maltose. Algumas maltases são constitutivas, outras induzidas e as actividades relativas destes dois tipos de maltase dependem da constituição e da velocidade da fermentação, uma vez que uma actividade elevada das enzimas induzidas pode provocar uma diminuição da velocidade de fermentação da maltose na massa (Rose e Vijayalakshmi, 1993).

Esta constatação pode explicar o facto de as estirpes crescidas em maltose apresentarem uma elevada actividade específica da α -glucosidase mas, no entanto, a sua capacidade fermentativa nas massas ser significativamente reduzida.

Observando os resultados obtidos para a actividade da α -glucosidase em três das estirpes estudadas, uma de *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 62A] e duas de *S. cerevisiae*, uma de proveniência comercial IGC 5325 [F 46] e outra isolada a partir de iscos tradicionais IGC 5320 [DB 56A], em diferentes meios de crescimento, verifica-se que qualquer que seja o meio de crescimento é a estirpe de *T. delbrueckii* que apresenta a maior actividade enzimática, sendo máxima para o meio com 2% de maltose (aproximadamente $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco) (Fig. 3.6.). Apesar de para as outras duas estirpes experimentadas os valores não serem tão elevados, é ainda para este meio que se observa maior actividade. Para todos os meios em cuja composição entra maltose, existe uma correlação positiva entre a quantidade de maltose no meio e a actividade da α -glucosidase, sendo superior a actividade da

estirpe comercial quando comparada com a estirpe que isolámos. Não deixa de ser curioso verificar que, mesmo nos meios desprovidos de maltose, é sempre a estirpe de *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 62A]) que apresenta maior actividade enzimática.

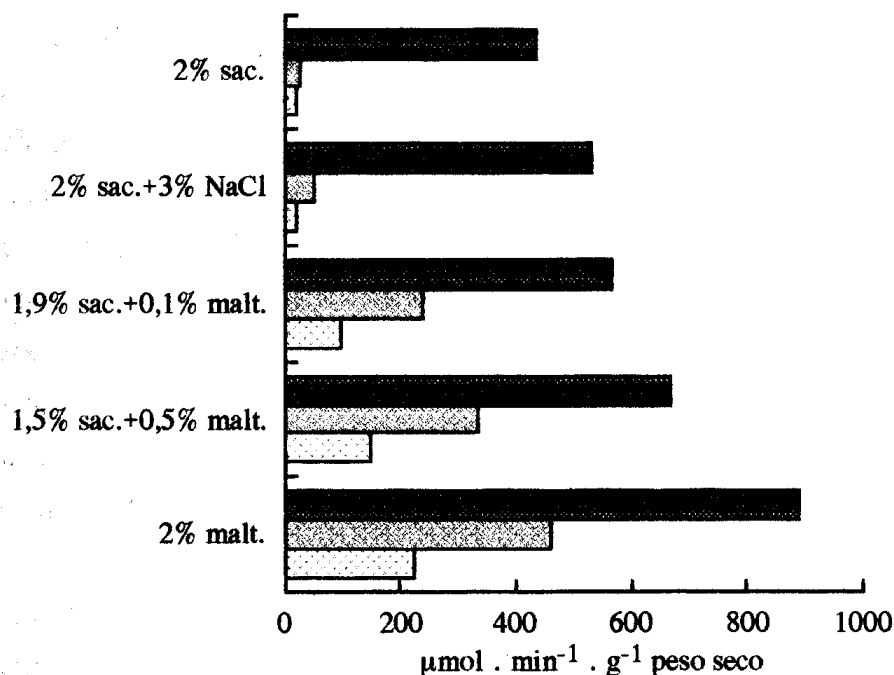


Fig.3.6. Actividade da α -glucosidase para três estirpes distintas *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B] (■), *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46] (◐) e *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 55A] (○), em diversas fontes de carbono.

Comparando os resultados da actividade da α -glucosidase nesses meios, parece-nos legítimo referir que a presença de 3% de NaCl estimula ligeiramente a actividade da referida enzima nas estirpes representadas.

4.2. ACTIVIDADE DA INVERTASE

Em relação à actividade da invertase os resultados obtidos são os que constam da Tabela 3.VI.. Tendo em conta estes resultados, pudemos verificar que a actividade da invertase, de um modo geral, tendia a aumentar na presença de maltose no meio de crescimento. Parece-nos, no entanto, que

se podem desenhar dois comportamentos distintos: nas estirpes de *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B] e IGC 5323 [DB 62A]) e na estirpe isolada a partir de pasta comercial prensada (IGC 5325 [F 46]) a actividade da invertase aumenta substancialmente à medida que a percentagem de maltose no meio também aumenta. No entanto, se relacionarmos estes resultados com os obtidos para a capacidade fermentativa verifica-se um decréscimo como se pode observar na Tabela 3.IV.. No que respeita às estirpes de *S. cerevisiae* (IGC 5318 [DB 55A]; IGC 5319 [DB 55B]; IGC 5320 [DB 56A]) que isolámos a partir de iscos verifica-se um aumento da actividade da invertase nos meios que contêm 0,1% e 0,5% de maltose, mas esses valores decrescem em relação aos anteriores se a percentagem de maltose no meio for de 2%. Nestas condições, a capacidade fermentativa das referidas estirpes nas massas sofre um ligeiro aumento (Tabela 3.IV.).

Tabela 3.VI. Actividade da invertase das leveduras seleccionadas quando crescidas no meio Y.P. em que se fez variar a concentração da fonte de carbono e em Y.P.S. na presença de 3% de NaCl.

Estirpes de leveduras	Fonte de carbono				
	2% sacarose	1,9% sacarose + 0,1% maltose	1,5% sacarose + 0,5% maltose	2% maltose	2% sacarose + 3% NaCl
	Actividade da invertase $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco				
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5318 (DB 55A)	194,68	373,66	213,15	343,37	129,48
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5319 (DB 55B)	153,73	307,04	393,82	233,26	117,70
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5320 (DB 56A)	498,94	449,47	702,75	463,85	273,15
<i>S. cerevisiae</i> IGC 5325 (F 46)	276,93	729,54	513,64	1156,26	438,74
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5321 (DB 42B)	1046,98	826,85	991,95	1051,01	1539,60
<i>T. delbrueckii</i> IGC 5323 (DB 62A)	1156,81	1315,75	1437,63	2300,07	997,86

Nota: os resultados patentes representam os valores médios determinados a partir de três experiências distintas.

A presença de NaCl no meio também apresenta aspectos diversos conforme as estirpes de levedura em questão: nas estirpes de *S. cerevisiae* isoladas de fermentos de pão tradicional a actividade da enzima é inferior quando comparada com a obtida no mesmo meio desprovido de NaCl. Se nos reportarmos à estirpe *S. cerevisiae* IGC 5325 (F 46) e às de *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B] e IGC 5323 [DB 62A]) detectamos um aumento significativo da actividade enzimática em relação aos valores encontrados para as mesmas estirpes em Y.P.S.. Resumindo, a presença de cloreto de sódio no meio não parece ser marcadamente significativo, para a maioria das estirpes isoladas.

Segundo Oda e Ouchi (1989), uma elevada actividade da invertase extracelular pode reduzir a capacidade fermentativa das células de levedura, uma vez que a hidrólise da sacarose em glucose e frutose duplica a pressão osmótica no ambiente circundante. Esta opinião era na mesma altura veiculada por outros autores, já que defendiam que leveduras com elevada actividade da invertase são mais facilmente inibidas por elevadas concentrações de sacarose do que leveduras que apresentam baixa actividade da mesma enzima, facto provavelmente devido ao aumento da pressão osmótica decorrente da hidrólise da sacarose por esta enzima. O efeito da actividade da invertase na capacidade fermentativa de massas em cujas composições entram concentrações variáveis de sacarose é notório, verificando-se que a capacidade fermentativa das estirpes de *S. cerevisiae* incluídas em massas mais doces parecia ser muito superior à actividade da invertase determinada para estirpes normalmente utilizadas em massas com baixa concentração de glucose (Oda e Ouchi, 1990). Verificou-se ainda que o efeito da adição de NaCl ao meio de crescimento de estirpes de *S. cerevisiae* variava conforme a concentração de cloreto de sódio adicionado ao meio. Assim, a presença de 1% de NaCl induzia um aumento da actividade da invertase, mas valores de 2 e 3% faziam-na diminuir consideravelmente. Os resultados por nós obtidos estão de acordo com os apresentados para três das estirpes de *S. cerevisiae* experimentadas, mas para a estirpe comercial de *S. cerevisiae* (IGC 5325 [F 46]) e para a estirpe IGC 5321 (DB 42B) de *T. delbrueckii* a situação é inversa.

A partir dos resultados expressos no gráfico da Fig.3.7. pode-se verificar que a máxima actividade da invertase continua a verificar-se para a estirpe de *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 62A] nos meios em cuja composição entra a maltose, sendo tanto maior quanto maior for a percentagem desse açúcar no meio. Para estes mesmos meios verifica-se uma actividade enzimática considerável para a estirpe de *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46] proveniente da panificação industrial, quer tenha sido crescida num meio com 2, 0,5 ou 0,1% de maltose, apesar do valor mais baixo corresponder ao meio que apresenta 0,5% desse hidrato de carbono. Verifica-se ainda que a actividade enzimática da estirpe de *S. cerevisiae* (IGC 5320 [DB 56A]) foi inferior à da *T. delbrueckii*, mas superior à estirpe comercial quando crescidas no meio com 0,5% de maltose.

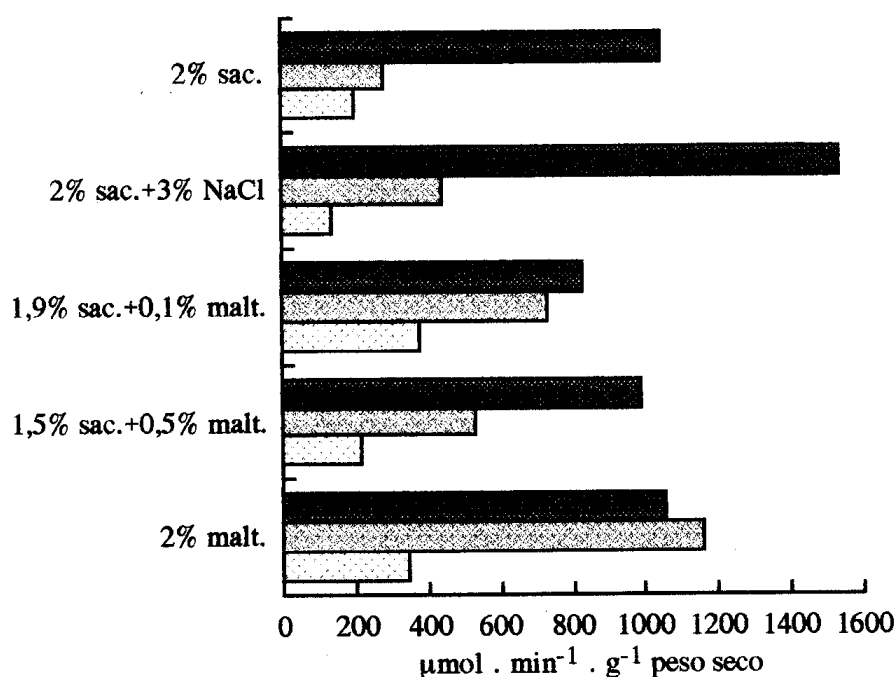


Fig.3.7. Actividade da invertase para três estirpes distintas *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B] (■), *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46] (▨) e *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 55A] (□), em diversas fontes de carbono.

Nos casos em que as estirpes de levedura foram crescidas em meios desprovidos de maltose, a actividade máxima da invertase continua a

verificar-se para a estirpe *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 62A]. A estirpe comercial de *S. cerevisiae* apresenta maior actividade invertática do que a outra estirpe de *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A]. Comparando novamente estas duas últimas estirpes, quando crescidas na ausência de cloreto de sódio, pudemos constatar que os resultados são inversos aos descritos para a situação anterior.

De um modo geral, podemos dizer que a estirpe de *T. delbrueckii* apresenta, para qualquer dos meios em que foi crescida, a actividade da α -glucosidase e da invertase máximos, quando comparados, nas mesmas circunstâncias, com as outras estirpes experimentadas. Os valores mais elevados para a actividade de ambas as enzimas verificaram-se para o meio de crescimento com 2% de maltose: cerca de 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco para a actividade da α -glucosidase e 2 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco para a actividade da invertase. Na ausência de maltose no meio, independentemente da actividade da enzima em questão, os valores para a actividade da estirpe *T. delbrueckii* IGC 5321 [DB 62A] tomam sempre a dianteira. O cloreto de sódio parece mesmo estimular a actividade da α -glucosidase das duas outras estirpes estudadas. No que concerne à actividade da invertase, a presença de NaCl não apresenta correlação positiva entre os valores da actividade enzimática encontrados para a estirpe de *S. cerevisiae* comercial IGC 5325 [F 46] e a estirpe de *S. cerevisiae* que isolámos IGC 5320 [DB 56A].

5. OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS DO DESENVOLVIMENTO DA MASSA PANAR

A observação das massas antes de fermentadas e as alterações visivelmente ocorridas após a sua fermentação suscitaram-nos a curiosidade de conhecer, em termos estruturais, quais as modificações visíveis numa massa fermentada. Para isso, amostras das massas antes e após três horas de

fermentação, foram preparadas e observadas ao M.E.V.. A título exemplificativo, e porque seria fastidioso apresentar um grande número de fotografias de massas não fermentadas (AF) e fermentadas (DF), com aspectos no essencial idênticos, optámos por ilustrar as duas situações com as fotografias que se seguem, correspondentes a duas massas distintas designadas por 1 e 2 preparadas respectivamente com as estirpes *T. delbrueckii* IGC 5323 [DB 62A] e *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A] (Figs. 3.8. e 3.9.).

A partir das fotografias de M.E.V. obtidas, é possível acompanhar alterações que decorrem na massa durante o processo fermentativo. Apesar de se partir do princípio de que não há massa (de composição idêntica à que usámos) que não apresente pelo menos um grau ínfimo de fermentação, notou-se uma evolução progressiva na estrutura da massa à medida que o tempo de fermentação aumentou. Quando a fermentação era praticamente inexistente, dominavam os grandes grânulos de amido, notando-se esporadicamente sinais de digestão enzimática junto desses grânulos e as leveduras, de tamanho muitíssimo menor, encontravam-se dispersas no meio dos grãos de amido e de uma ou outra fibra. À medida que o grau de fermentação se tornou maior, os grandes grânulos de amido davam lugar a grânulos mais pequenos, como que ligados por uma malha proteica alveolada, tornando-se menos evidentes as leveduras, confirmando observações feitas por outros autores (Kyogoku e Ouchi, 1995; Yousif *et al.*, 1995).

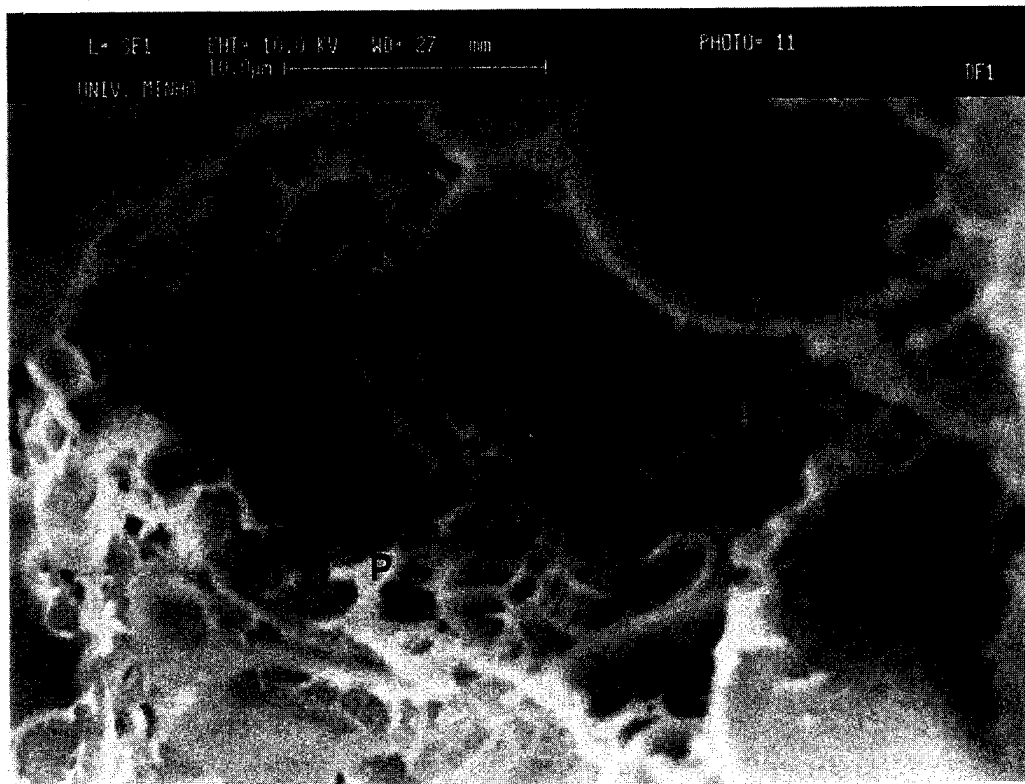
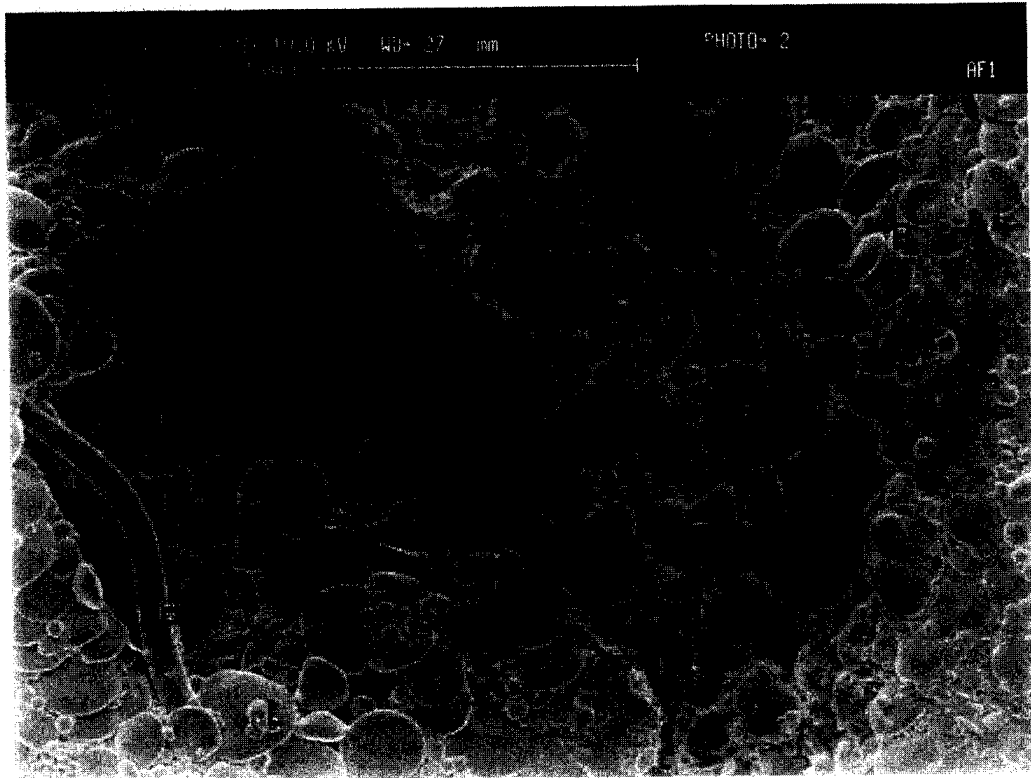


Fig. 3.8. Fotografias, ao M.E.V., da massa *I*: *I*, antes de sofrer fermentação e *II*, após 3 horas de fermentação. *A* = grande grânulo de amido; *B* = pequeno grânulo de amido; *L* = levedura; *A G* = alvéolo gasoso; *P* = proteína; *FP* = fibra proteica.

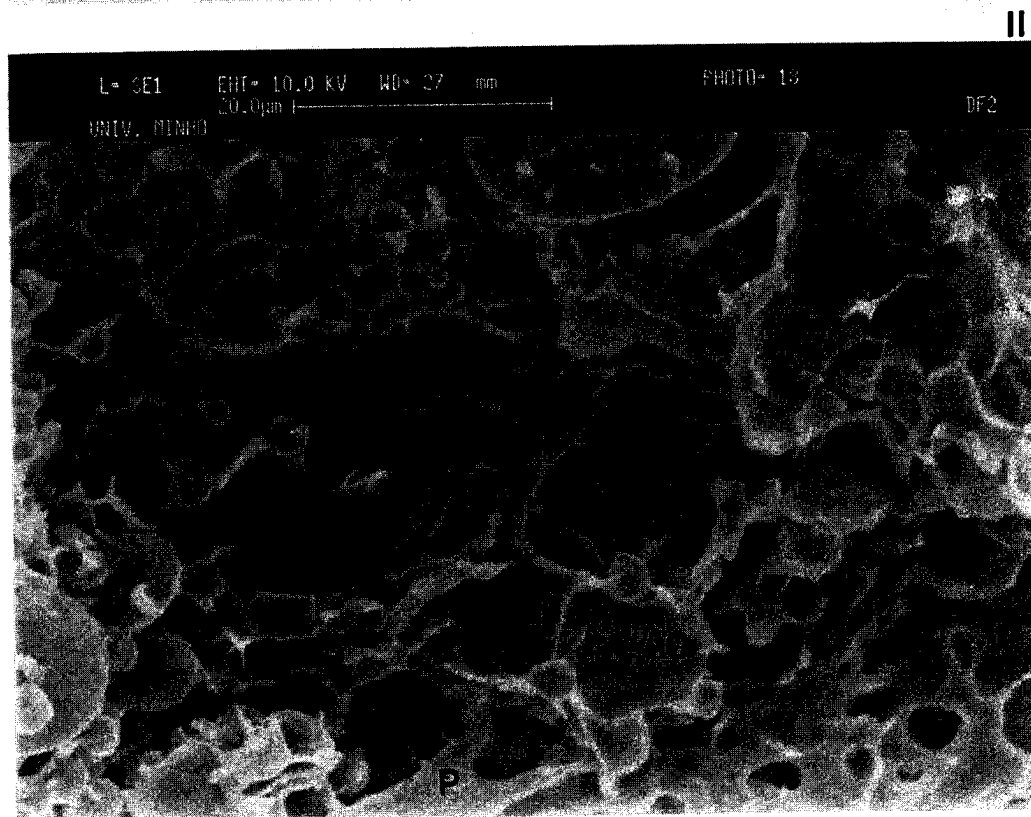
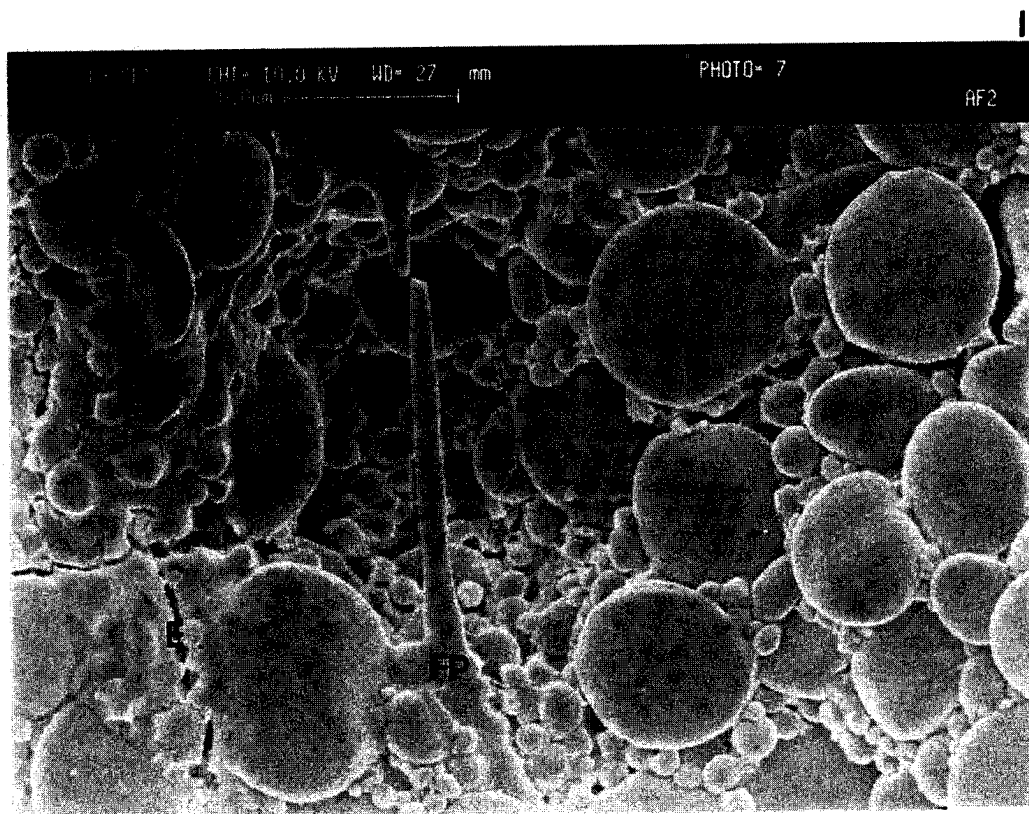


Fig. 3.9. Fotografias, ao M.E.V., da massa 2: *I*, antes de sofrer fermentação e *II*, após 3 horas de fermentação. *A* = grande grânulo de amido; *B* = pequeno grânulo de amido; *L* = levedura; *A G* = alvéolo gasoso; *P* = proteína; *FP* = fibra proteica; *E* = sinais de digestão enzimática na superfície de um grânulo de amido.

Através de estudos de M.E.V. efectuados para seguir as alterações que ocorriam durante a elaboração da massa e a cozedura do pão, foram identificadas modificações na película de glúten, reconhecido o efeito de enzimas sobre os grânulos de amido e a natureza da interacção entre o amido e a proteína. A utilização do M.E.V., permitiu ainda identificar o desenvolvimento do glúten, observando as propriedades do seu filme; a quebra da película de glúten e a perda da sua integridade são mais evidentes nos casos em que as massas contêm a maior percentagem de edulcorante, o que indica um efeito adverso na elasticidade e extensibilidade da massa, resultando uma massa de difícil manipulação (Yousif *et al.*, 1995). Estes mesmos autores demonstraram também que a inclusão de aditivos na massa básica, feita à base de farinha e água, provocava grandes alterações na estrutura, quer da massa, quer do pão. A estrutura da massa é igualmente alterada pela adição de farinha de soja, cloreto de sódio, gordura ou açúcar; o açúcar, em particular, ajuda o desenvolvimento da massa, reduzindo o espaço à volta dos grânulos de amido e altera a conformação da proteína.

As massas utilizadas nas observações por nós efectuadas foram preparadas de forma idêntica, mas fermentadas por estirpes de leveduras diferentes, não se notando alterações significativas determinadas pelo uso de qualquer uma delas.

Capítulo 4

CAPACIDADE FERMENTATIVA E TOLERÂNCIA AO CONGELAMENTO DAS
ESTIRPES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E *TORULASPORA*
DELBRUECKII SELECCIONADAS

1. INTRODUÇÃO

A tolerância ao congelamento conta-se entre as principais características desejáveis numa levedura de panificação. Assim, o principal objectivo do trabalho apresentado neste capítulo foi a avaliação das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii*, por nós seleccionadas, no que respeita à sua capacidade fermentativa após diferentes períodos de congelamento das massas.

Procurámos ainda elucidar em que medida períodos variáveis de fermentação anterior ao congelamento eram determinantes na capacidade fermentativa das massas onde se incluíam as leveduras que seleccionámos. Em ambas as situações foi determinada a taxa de sobrevivência das leveduras após os diferentes períodos de congelamento, de modo a podermos avaliar em que medida a viabilidade das células influenciava os resultados obtidos.

Uma vez que tudo parece indicar que a trealose intracelular deverá desempenhar algum papel na resistência das leveduras ao congelamento verificámos também se, para as estirpes que seleccionámos, encontrávamos alguma correlação entre o conteúdo intracelular de trealose dessas estirpes e a sua capacidade fermentativa, nas circunstâncias descritas.

Antes da apresentação dos resultados, segue-se uma breve revisão bibliográfica sobre alguns aspectos relevantes relacionados com o congelamento das massas e crio-tolerância das leveduras bem como com a obtenção de estirpes mais resistentes.

2. AS MASSAS CONGELADAS

O método de congelamento das massas para panificação tem sido largamente aceite, devido quer às vantagens que traz no fornecimento de pão quente e fresco aos consumidores quer à poupança de tempo que representa para os padeiros (Báguena *et al.*, 1994). No entanto, as leveduras de panificação são danificadas durante o período de congelamento das massas após fermentação e as potencialidades fermentativas de tais massas diminuem substancialmente à medida que o período de armazenamento se torna maior (Hsu *et al.*, 1979; Hahn e Kawai, 1990a, 1990b).

Nas massas congeladas foram estudados os efeitos da forma da massa, do conteúdo em água e das condições de moldagem em folha bem como a sua reutilização: após armazenamento a -18°C durante pelo menos 20 semanas, o volume do pão preparado a partir de massa congelada sob a forma de bola era significativamente menor do que a congelada sob a forma cilíndrica ou de folha, mas o tempo de ensaio e as características do pão não eram significativamente diferentes (Wang e Ponte, 1994; Wang *et al.*, 1994; Gélinas *et al.*, 1995). Os danos causados pelo congelamento podem ser minimizados pela diminuição ou mesmo eliminação do período de fermentação antes do congelamento e variando a quantidade de ingredientes que fazem parte das receitas das massas (Hahn e Kawai, 1990b). Massas com adição de quantidades diferentes de glúten, foram congeladas por um mesmo período de tempo, verificando-se uma forte correlação entre o volume específico do pão e a sua resistência máxima. Demonstrou-se deste modo que farinhas com baixo teor de proteína suplementada com glúten de trigo podiam substituir farinhas com maior percentagem daqueles compostos, na produção de massas congeladas (Wang e Ponte, 1994).

A qualidade da panificação das massas congeladas depende do tipo de leveduras utilizadas e das taxas de congelamento e degelo da massa. O uso de leveduras tolerantes ao frio, que retêm suficiente capacidade

fermentativa e mantêm a viabilidade celular após o congelamento, parecem ser eficientes quando se pretende utilizar este método (Hahn e Kawai, 1990b).

A vasta literatura sobre o assunto é unânime no que respeita à importância de um período de fermentação anterior ao congelamento (Hsu *et al.*, 1979; Wolt e D'Appolonia, 1984; Oda *et al.*, 1986; Hino *et al.*, 1987; Hahn e Kawai, 1990a, 1990b; Takasaki e Karasawa, 1992). Segundo Nakagawa e Ouchi (1994) a ausência dessa pré-fermentação é nociva principalmente no que respeita às propriedades organolépticas do pão, que sistematicamente são referidas pelos consumidores, mas a fermentação da massa antes do congelamento é talvez o factor que mais afecta a estabilidade da massa congelada. Vários estudos mostraram que a fermentação da massa antes do congelamento causa danos extremos nas leveduras de panificação, ao mesmo tempo que a qualidade do pão preparado a partir da massa congelada pré-fermentada é inferior à do pão proveniente de massas não congeladas (Sugihara e Kline, 1968; Hsu *et al.*, 1979; Hahn e Kawai, 1990a). No entanto, reconhece-se que massas devidamente fermentadas produzem um pão com melhor volume, aroma, paladar e textura, quando comparado com o que é desprovido de fermentação (Gassenmeier e P. Schieberle, 1995). Deduz-se assim, que o uso de leveduras crio-tolerantes, que não sofrem grandes danos durante o congelamento após fermentação prévia são necessárias à indústria de panificação (Hahn e Kawai, 1990).

Nas massas congeladas, a estabilidade das leveduras parece estar inversamente relacionada com o tempo de fermentação activa que decorreu antes do congelamento (Hino *et al.*, 1987). Metabólitos, como o etanol e outros compostos voláteis, formados durante a fermentação, afectam negativamente a actividade fermentativa das células vivas (Hsu *et al.*, 1979).

3. A TOLERÂNCIA DAS LEVEDURAS AO CONGELAMENTO

Para que uma levedura possa ser usada numa massa congelada deve possuir como propriedade essencial uma elevada capacidade fermentativa, comparável à das leveduras comerciais de panificação, quer em massas não congeladas quer nas congeladas que tenham sido fermentadas durante um período adequado antes do congelamento (Kline e Sugiara, 1968a, 1968b; Oda *et al.*, 1986).

A qualidade das leveduras afecta fortemente a estabilidade das massas congeladas. Uma boa prestação das leveduras após o congelamento está relacionada somente com leveduras cujo conteúdo proteico seja superior a 57% (Hsu *et al.*, 1979) e com as que possuam elevados níveis de trealose, que estabilizam os lípidos da membrana celular e reduzem a re-hidratação (Oda *et al.*, 1986). A levedura activa em multiplicação é mais sensível ao congelamento e susceptível a danos durante o decorrer do processo (Takasaki e Karasawa, 1992).

São conhecidos alguns factores que influenciam o desempenho das leveduras nas massas congeladas. Podem citar-se a idade das células, os seus conteúdos em proteína e açúcar e a sua estabilidade, se bem que não exista consenso no que diz respeito à importância da idade das células no processo de congelamento das massas (Báguena *et al.*, 1991). Os mesmos autores referem trabalhos em que se recomenda o congelamento (-150°C) ou refrigeração (4°C) das leveduras antes da sua adição à massa. Tais tratamentos aumentariam a tolerância das leveduras ao congelamento. Um prévio armazenamento a 4°C incrementa a demora do aparecimento de gémulas nas leveduras, evitando o crescimento e diminuindo a sua sensibilidade ao frio.

Alguns trabalhos acerca da sobrevivência de leveduras tolerantes à congelação em meio líquido levaram a crer que a sobrevivência das leveduras nas massas de pão congeladas parecia diferir da dos meios líquidos congelados, porque a natureza física e ingredientes da massa

deveriam proteger as células de levedura durante o período de congelamento (Hahn e Kawai, 1990b; Hino *et al.*, 1990; Takasaki e Karasawa, 1992). Estes resultados são concordantes com outros obtidos em massa semi-sólida, explicando-se os resultados pelo facto das leveduras se encontrarem incluídas na malha ou estrutura do glúten (Gan *et al.*, 1995). A sobrevivência das leveduras nas massas congeladas nalguns estádios do processo de panificação em que ocorre um período de congelamento acima de 10 semanas e as propriedades reológicas da massa descongelada foram determinadas de modo a esclarecer as causas da deterioração da massa panar durante um longo armazenamento. As leveduras utilizadas como estirpes tolerante e sensível ao congelamento foram respectivamente *T. delbrueckii* SANK 50184 (Sankyo Co., Ltd.) e *S. cerevisiae* SANK 50182 (Sankyo Co., Ltd.). A taxa de sobrevivência foi constante nalgumas etapas do processo de panificação antes da cozedura, em massas congeladas e não congeladas com ambos os tipos de levedura. A massa congelada em que se utilizou *T. delbrueckii* manteve uma taxa de sobrevivência constante por um período de 10 semanas, mas ocorreu uma diminuição da capacidade fermentativa das células de levedura ao longo do período de armazenamento, sendo maior quando a referida massa era doce. As modificações nas propriedades reológicas iniciavam-se imediatamente após o congelamento e em todos os casos, a adesividade da massa descongelada aumentava com o aumento do período de armazenamento. Um longo período de armazenamento de massa com *T. delbrueckii* apresentou-se nocivo na qualidade do pão, verificando-se que o período de armazenamento não devia ultrapassar três semanas (Takasaki e Karasawa, 1992). No sentido de solucionar os problemas que têm vindo a ser colocados, e embora as massas plenamente fermentadas com uma levedura crio-sensível percam actividade fermentativa após um período de congelamento, um tratamento térmico dessas massas a 46°C durante 10 minutos parece aumentar a tolerância ao processo. Nessas condições o volume específico aumenta e o tempo de ensaio diminui. Este tratamento mostrou-se efectivo em vários tipos de massa (Nakagawa *et al.*, 1994).

Alguns dos danos causados às leveduras pelo congelamento são devidos ao aumento de compostos sulfidril (SH) de baixo peso molecular lixiviados das células. Esse material lixiviado quando incorporado na farinha e estudado em testes de reologia e panificação, permitiu concluir que os compostos libertados das células durante seis semanas produziam efeitos equivalentes a 50 ppm de glutathione pura. No entanto, segundo outros autores, as alterações reológicas nas massas com ou sem leveduras durante o período de congelamento não estão associadas a alterações da quantidade de grupos SH presentes nas massas (Wolt e D'Appolonia, 1984).

O mecanismo da tolerância das leveduras ao congelamento foi de algum modo explicado por Hino *et al.* (1990), verificando que a membrana das células de levedura tolerantes ao congelamento permanecia praticamente intacta após tal processo, a avaliar pelas diferenças na composição dos lípidos e pelos níveis de trealose em células de levedura tolerantes e sensíveis ao congelamento. Estudos em que foi comparada a composição lipídica de uma estirpe tolerante ao congelamento com a de uma estirpe sensível, sugeriram que a membrana plasmática da estirpe tolerante ao congelamento deveria ter maior fluidez do que a da estirpe sensível (Murakami *et al.*, 1995).

A dificuldade em encontrar estirpes de levedura que apresentem as propriedades imprescindíveis à panificação industrial, onde se inclui, como é evidente, a sua resistência ao congelamento, tem feito com que os investigadores se debrucem sobre a pesquisa de estirpes de leveduras a partir de fontes naturais (Hino *et al.*, 1987; Hahn e Kawai, 1990a, 1990b; Almeida e Pais, 1996b), ou estirpes incluídas em colecções internacionais (Oda *et al.*, 1986; Uno, 1986), procurando deste modo encontrar estirpes selvagens que colmatem todas estas características desejáveis às leveduras de panificação. Outros, dedicam-se à pesquisa de índole genética investindo na obtenção de estirpes que reúnem as qualidades que não estão presentes nas estirpes selvagens (Nakagawa e Ouchi, 1994; Kyogoku e Ouchi, 1995).

De acordo com a literatura, as estirpes de leveduras que até ao momento têm sido referidas como eficientes em massas congeladas por se mostrarem crio-tolerantes e ao mesmo tempo utilizáveis em massas com ou

sem açúcar, pertencem às espécies *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* (FRI-413 e FRI-802) e *Kluyveromyces thermotolerans* (FRI-501) (Ohshima *et al.*, 1987; Sasaki e Ohshima, 1987; Oda e Tonomura, 1993, 1994; Hahn e Kawai, 1990a, 1990b).

4. ESTUDOS GENÉTICOS PARA OBTENÇÃO DE ESTIRPES CRIO-TOLERANTES

Alguns tipos de leveduras crio-tolerantes foram obtidas por mutação (Nakagawa e Ouchi, 1994) e estudados os possíveis papéis de certos *locus* na tolerância ao choque térmico (Blumenthal *et al.*, 1995). Embora a actividade glicolítica diminua com o abaixamento da temperatura, as leveduras de panificação ainda fermentam as massas mesmo a temperaturas extremamente baixas (perto de 0°C) e convertem os açúcares em CO₂ e etanol de um modo apreciável, quando a massa é guardada durante dias. Estes factos tornam difícil a adopção destas leveduras para métodos de panificação em que as massas são guardadas num frigorífico antes da cozedura. Se houvesse uma levedura de panificação que dificilmente fermentasse os açúcares nas condições de refrigeração mas adquirisse a sua capacidade fermentativa normal após esse período, à temperatura ambiente, tornava-se, acima de tudo, extremamente útil em processos de panificação que envolvessem um período de refrigeração. Com este objectivo, foram isolados mutantes de estirpes de leveduras que produziam muito menos CO₂ na massa do que a estirpe parental a temperaturas inferiores a 15°C, mas recuperavam a sua actividade fermentativa normal quando a temperatura rondava ou era superior a 25°C (Kyogoku e Ouchi, 1995).

Entre as leveduras pertencentes ao género *Torulaspora*, *T. pretoriensis* IFO 10218 foi seleccionada como uma estirpe maltose-fermentativa, capaz de fermentar massas com 5% de glucose com a mesma eficiência das estirpes comerciais de panificação. A resistência ao congelamento-degelo desta estirpe na massa era superior à da estirpe *S.*

cerevisiae FL 2209 isolada a partir de levedura comercial prensada. Uma vez que as células de IFO 10218 sedimentavam rapidamente quando em suspensão, foi construído um mutante, YK-1, capaz de dispersão. Este mutante demonstrou ser eficaz quer na panificação tradicional quer na obtenção de massas congeladas. A resistência de YK-1 ao congelamento-degelo, em massas com 30% e 5% de sacarose, era superior à de FL 2209, mas ambas as estirpes sofriam danos em massas isentas de açúcar. No pão fabricado a partir de massas congeladas, verificou-se que as preparadas com YK-1 apresentavam um tempo útil de manipulação da massa mais curto e um volume específico maior quando comparadas com massas que continham FL 2209. Comparando com produtos de panificação cujas massas não sofreram congelamento, o volume específico das feitas com YK-1 era superior a 95% e 75% quando o período de armazenamento era inferior a 21 dias em pão doce e sete dias em pão branco, respectivamente (Oda e Tonomura, 1993; 1994).

Conforme a literatura disponível, outro caso bem sucedido neste campo diz respeito à levedura *T. delbrueckii* SANK 50184 (Sankyo Co., Ltd.), tolerante a elevadas concentrações de açúcar e ao congelamento-degelo na massa. Esta levedura é muito usada no Japão, mas a sua produção industrial foi dificultada pelo pequeno tamanho das células. A suspensão celular devia ser desidratada para a obtenção de uma pasta após a recolha e lavagem e o seu tamanho causava problemas no referido processo: a filtração das células para desidratação demorava e não podia decorrer de modo contínuo porque os filtros de desidratação colapsavam e tinham de ser mudados frequentemente (Sasaki e Ohshima, 1987). Era uma estirpe haploide a partir da qual se obteve uma diploide por fusão de protoplastos. O estado diploide foi herdado de modo estável, o volume celular passou a ser três vezes maior e o DNA duplicou em relação à estirpe parental. Não se encontraram diferenças notórias entre a estirpe diploide induzida pelo DMSO e as células formadas através da fusão protoplasmática intra-específica (Sasaki e Ohshima, 1987). As estirpes diploides de *T. delbrueckii* obtidas foram experimentadas para aplicação industrial. Dado o seu

tamanho, foi melhorado o processo de obtenção de pasta de levedura com o diploide YL3. O tempo de desidratação da estirpe diploide foi encurtado em relação à estirpe parental nas mesmas condições convencionais e deixaram de ser necessárias mudanças frequentes de filtros durante a desidratação. A actividade fermentativa e a tolerância ao congelamento-degelo na massa foi herdado com sucesso pelas estirpes diploides não se detectando uma diferença estatisticamente significativa no paladar e aroma do pão fabricado usando SANK 50268 ou YL3. Novos métodos para a indução de diploides artificiais, através de diploidização directa são úteis para desenvolvimento genético de uma estirpe industrial de *T. delbrueckii*. De facto, um desses diploides está agora no mercado em substituição da estirpe parental haploide (Ohshima *et al.*, 1987).

5. A IMPORTÂNCIA DA TREALOSE NA AQUISIÇÃO DE TERMOTOLERÂNCIA

A trealose (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) é um dissacarídeo não redutor de glucose e um isómero da maltose. Encontra-se em vários organismos nomeadamente em leveduras (Keller *et al.*, 1982; De Virgilio *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 1994), fungos, insectos, bactérias (Leslie *et al.*, 1995) e plantas (Kidd e Devorak, 1994; Müller *et al.*, 1995). Nestes organismos a trealose pode ser consumida como fonte de energia e tem variadas funções. Entre elas pode referir-se a protecção das estruturas das membranas biológicas contra os danos causados pelo congelamento e dessecação (Oda *et al.*, 1986). Embora tenha um paladar doce não provoca cárie e pode ser usada como um componente de alimentos variados (Kidd e Devorak, 1994) e de produtos de beleza, sendo já considerada um produto a ser utilizado em fármacos anticancerígenos (Yoshikawa *et al.*, 1994). A trealose é também um subproduto de fermentações industriais (Hull *et al.*, 1995). Alguns autores mostraram que a trealose pode ser usada como um poderoso crio-protector

das leveduras de panificação, tornando-as mais resistentes ao congelamento na massa. (Oda *et al.*, 1986).

A trealose é frequentemente encontrada em elevadas concentrações em leveduras de panificação (Yoshikawa *et al.*, 1994). Em *S. cerevisiae* a trealose pode contribuir em mais de 23% do peso seco das células ou menos de 1%, dependendo das condições de crescimento e do estágio no ciclo de vida. É genericamente assumido que uma das funções da trealose é ser um carboidrato de reserva do mesmo modo que o glicogénio o é. Glicogénio e trealose podem ser acumulados nas células em quantidades semelhantes, mas os padrões de acumulação e mobilização destes dois hidratos de carbono de reserva diferem visivelmente, o que leva a crer que desempenhem papéis fisiológicos distintos (Keller *et al.*, 1982; Ling *et al.*, 1995). O glicogénio só é formado na fase exponencial de crescimento da levedura, e gasto na fase seguinte. Por outro lado, os níveis mais elevados de trealose estão associados à fase estacionária, enquanto os mais baixos se encontram durante o crescimento exponencial (Van Laere, 1989).

A preparação da massa panar coincide com o início da fermentação e está associada a rápida perda de resistência à tensão e mobilização da trealose, nas células de levedura. Usando mutantes de *S. cerevisiae* afectados no metabolismo da trealose, confirmou-se a correlação entre o conteúdo em trealose e a resistência ao "stress", mas só na ausência de fermentação. Foi demonstrado que ambos os fenómenos podem ser claramente separados logo que as células iniciam a fermentação. A experiência foi executada quer em células com níveis moderados de trealose, crescidas em condições laboratoriais, quer em células cujo conteúdo de trealose era superior a 10%. A manutenção de um nível elevado de trealose durante a fermentação também não evita a perda de capacidade fermentativa durante a preparação de massas congeladas. Embora níveis mais elevados de trealose estejam sempre relacionados com maior resistência à tensão antes da adição do açúcar fermentável, o início da fermentação causa o desaparecimento de um

qualquer factor necessário à manutenção da resistência à tensão, mesmo na presença de elevados conteúdos de trealose (Van Dijk *et al.*, 1995).

A tolerância das estirpes de levedura ao congelamento está associada a um nível de trealose que deve ser mantido após um período de fermentação anterior ao próprio congelamento. A tolerância ao congelamento das leveduras está assim, de algum modo, relacionada com um nível basal de trealose intracelular à qual se segue uma rápida degradação no começo de um período de fermentação anterior ao congelamento (Yokoigawa *et al.*, 1995). Nas leveduras sensíveis ao congelamento, o grau de hidrólise da trealose pode ser afectado pelo tipo de açúcar, ao contrário do que acontece nas leveduras crio-resistentes (Hino *et al.*, 1990). Recentemente aceita-se que a crio-resistência não está directamente correlacionada com a quantidade inicial de trealose na célula nem com o nível ainda presente na massa na altura do congelamento. Quando o nível de trealose desce abaixo de 5%, a resistência ao armazenamento no frio diminui claramente. No entanto, uma percentagem de 4-5% de conteúdo celular em trealose na altura do congelamento parece ser suficiente para proteger a levedura dos danos provocados pelo congelamento, durante o período de armazenamento (Meric *et al.*, 1995). Apesar de tudo, grande parte destes autores faz notar que nem sempre um elevado conteúdo de trealose está relacionado com uma elevada crio-resistência.

Outros trabalhos referem-se à relação entre a concentração de trealose e a viabilidade das leveduras sob condições ambientais geradoras de tensão. Um total de 12 estirpes de leveduras de diferentes géneros foram examinadas. As estirpes de levedura consideradas osmotolerantes continham os níveis de trealose intracelular mais elevados. Adicionalmente, estas estirpes foram estudadas no que diz respeito à sua capacidade de tolerância a longos períodos de armazenamento por congelação. Após 12 semanas de congelamento a -20°C, as estirpes de levedura que continham níveis mais elevados de trealose na altura do congelamento, apresentavam a maior viabilidade celular. As estirpes atrás referidas apresentavam nestas condições uma viabilidade celular de 30%. Em estirpes com baixo nível de trealose

intracelular não se detectavam células viáveis após as 12 semanas (D'Amore *et al.*, 1991). O efeito da temperatura na acumulação da trealose foi investigado nas estirpes referidas. Aumentando a temperatura de incubação de 21°C para 40°C verifica-se um aumento no conteúdo de trealose em *T. delbrueckii* após 45-60 minutos de incubação. Por outro lado, só se observava um pequeno aumento no conteúdo de trealose nas estirpes osmo-sensíveis, após 60 minutos a 40°C. Estes resultados confirmam a ideia de que o tratamento pelo calor em estirpes tolerantes pode provocar um aumento na acumulação de trealose. A acumulação de trealose induzida pelo calor protege as células de levedura do calor e dessecação. O aumento da tolerância ao calor é provavelmente devido ao efeito da trealose como estabilizador das membranas. A confirmar o papel da trealose na termotolerância incluem-se os trabalhos com a levedura de panificação *S. cerevisiae* em que a acumulação da trealose é desencadeada por um estímulo que activa a resposta de choque térmico: os níveis de trealose estão correlacionados positivamente com a termotolerância sugerindo que desempenha também uma função protectora (D'Amore *et al.*, 1991; Atfield *et al.*, 1994; Nakata *et al.*, 1995a, 1995b).

A acumulação de trealose em leveduras de panificação pode estar relacionada com o metabolismo da maltose nestes organismos (Operti *et al.*, 1982). Eleutherio *et al.* (1993) refere ter-se demonstrado que a expressão de qualquer dos genes MAL leva à acumulação de trealose. Assim, um gene constitutivo MAL4, foi introduzido numa estirpe que não acumulava trealose nem adquiria termotolerância. Verificou-se que esta estirpe construída acumulava trealose durante o aumento de temperatura, aumento esse que levava a um incremento da sua termotolerância. Uma variação de 28°C para 40°C induzia um aumento da actividade da trealose-6P-sintetase três vezes maior em todas as estirpes experimentadas, mas a actividade da trealase não era significativamente modificada, provocando um grande aumento da trealose interna. O mutante de *S. cerevisiae* Klg-102 não apresenta actividade da trealose-6P-sintetase dependente de uridino-difosfato de glucose (UDPG) e portanto nenhuma acumulação de trealose se

observou. Tanto a trealose-6P-sintetase como a trealase são reguladas por formas interconvertíveis: enquanto a enzima de síntese se torna menos activa quando fosforilada, a trealase torna-se activa quando sofre fosforilação. Noutro mutante de *S. cerevisiae* (VFP1-8C) obtido a partir do cruzamento do mutante Klg-102 com a estirpe de *S. cerevisiae* 1403-7A, apesar de não se observar qualquer actividade da sintetase, observou-se acumulação da trealose devido à presença do gene constitutivo MAL4. As leveduras de panificação contêm entre outros, o gene MAL4, que se encontra na natureza sempre na sua forma constitutiva, garantindo assim, a capacidade de acumular trealose.

O tipo de transporte da trealose através da membrana plasmática da levedura parece desempenhar um papel importante na acumulação intracelular daquele substrato, que por sua vez parecia estar associado à termotolerância da levedura. Para elucidar estes aspectos, foram usadas duas estirpes mutantes (T82 e 308T5) que perderam o transportador mas sintetisavam trealose. Verificou-se que a ausência de um transportador para a trealose não tinha um efeito negativo sobre a aquisição da termotolerância, uma vez que uma boa relação entre a acumulação da trealose e a termotolerância foi observada nos mutantes deficientes no transportador. Pode assim dizer-se, que a acumulação de trealose induzida pelo calor origina um modo de proteger as proteínas (principalmente enzimas) da desnaturação. Com efeito, verificou-se que a trealose estabiliza proteínas isoladas, como a fosfofrutocinase, lactato-desidrogenase e a enzima de restrição *Pst*I (Eleutherio *et al.*, 1993). Ao contrário do que estes mesmos autores tinham demonstrado em relação ao papel da trealose e do seu transportador na protecção da membrana celular durante a desidratação, que requeria a presença deste dissacarídeo de ambos os lados da membrana, neste caso, a acumulação da trealose induzida pelo calor estabelece um meio de proteger as proteínas (especialmente as enzimas) da desidratação.

De facto, no caso da levedura *S. cerevisiae*, todos os processos a seguir referidos, têm sido citados como responsáveis pela aquisição de termotolerância: (1) indução de hsp; (2) manutenção do pH e gradientes

iónicos através da membrana plasmática via actividade da ATPase da membrana citoplasmática; (3) diminuição na actividade ou modificações na distribuição da água no citosol; (4) acumulação de trealose induzida pelo calor. Existe uma evidência genética de que a síntese de trealose induzida pelo calor é um factor importante na indução da termotolerância (Trollmo *et al.*, 1988; De Virgilio *et al.*, 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

I. MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

Neste estudo foram utilizadas nove estirpes de leveduras. Cinco, isoladas como referido no Capítulo 3, de fermentos tradicionais (IGC 5318 [DB 55A]; IGC 5319 [DB 55B]; IGC 5320 [DB 56A]; IGC 5321 [DB 42B]; IGC 5323 [DB 62A]), duas de pasta de fermento comercial (IGC 5325 [F 46]; IGC 5326 [F 65]) e duas (IGC 4072; IGC 4478) fornecidas pela Colecção Portuguesa de Leveduras (PYCC), Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras. Todas as estirpes foram mantidas em meio de manutenção sólido, cuja composição está descrita no Apêndice I (secção III-1).

Para as diferentes experiências efectuadas as estirpes foram crescidas numa incubadora orbital (160 rpm) a 30°C em "erlenmeyer" de 500 ml contendo 250 ml de meio Y.P.S. (Apêndice I, secção VI-6) pH 6,0, durante 24 horas.

Para a preparação das massas congeladas, as células foram colhidas por centrifugação, a 4°C, durante dois minutos a 7 000 rpm (Centrífuga Sigma 4K10), lavadas duas vezes com água desionizada gelada e filtradas (Membranas Schleicher & Schuell ME 25 0,45µm, diâmetro = 50 mm) de modo a obter uma massa compacta de leveduras.

2. PREPARAÇÃO DAS MASSAS

O modo de preparação destas massas foi em tudo idêntica à referida no Capítulo 3 (Material e Métodos - 2.2), utilizando o quintuplo dos ingredientes. Assim, logo que a massa ficou pronta foi dividida em cinco porções de igual

peso. Uma delas foi utilizada para determinação da capacidade fermentativa, conforme descrito no Capítulo 3 (Material e Métodos - 2.3). As outras quatro foram tendidas à mão, com forma mais ou menos retangular e com cerca de 0,5 cm de espessura, embrulhadas em folha de alumínio e armazenadas a -20°C por períodos de 4, 8, 15 e 30 dias respectivamente.

Após congelamento durante os períodos desejados, as massas congeladas foram colocadas numa estufa a 30°C durante uma hora e, posteriormente, introduzidas na cuba de fermentação do reofermentómetro para avaliação da capacidade fermentativa do modo anteriormente referido. Nestes casos a capacidade fermentativa após congelamento durante determinado período de tempo, foi expressa em %, calculada com base na capacidade fermentativa obtida antes do congelamento.

Para verificar se a existência de um período de fermentação anterior ao congelamento poderia ter efeitos significativos sobre a capacidade fermentativa das leveduras na massa, as massas preparadas de forma igual à descrita anteriormente foram fermentadas por diferentes períodos de tempo (0,5, 1,5 e 2,5 horas) e posteriormente guardadas no congelador (-20°C) durante 4, 8, 15 e 30 dias. Após estes períodos as massas foram descongeladas e a sua capacidade fermentativa determinada no reofermentómetro, conforme os procedimentos já descritos.

3. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O número de células viáveis foi determinado antes e depois da congelação e conseqüente descongelação, em três experiências distintas, pelo método de contagem em placa. Procedeu-se do seguinte modo: colocaram-se 0,5g de massa em 10ml de uma solução de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e agitou-se vigorosamente. Após diluições sucessivas da suspensão espalharam-se 0,1ml em placas de Y.P.G. que foram incubadas a 28°C durante 48 horas; em

seguida procedeu-se à contagem das leveduras nas placas em que o número de colónias oscilava entre 30 a 300.

A taxa de sobrevivência (%) foi determinada como a razão entre o número de UFC/100g de massa após o respectivo período de congelamento e o número de UFC/100g de massa sem congelamento prévio:

$$\frac{\text{UFC/100g de massa após um determinado período de congelamento}}{\text{UFC/100g de massa não congelada}} \times 100$$

4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE TREALOSE

Células em fase estacionária crescidas a 30°C durante 24 horas em Y.P.S. foram colhidas por centrifugação a 12000 rpm (1400 g) durante três minutos à temperatura ambiente numa centrífuga de bancada Sigma 113. Seguidamente foram ressuspensas num volume igual de água desionizada fria e lavadas duas vezes. A extracção da trealose foi feita de acordo com o método de Hino *et al.*, (1990) no qual se introduziram algumas modificações. As células obtidas a partir de 1ml de suspensão foram tratadas com 1ml de ácido tricloroacético [Merck] 5% (p/v), deixando-as em repouso durante 45 min, com agitação ocasional. As células foram então centrifugadas a 3000 rpm (400 g) durante 10 minutos processo que se repetiu duas vezes. Os sobrenadantes resultantes destas extracções foram utilizados para a determinação da concentração da trealose por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Antes de se proceder a injecções de 20 µl, os sobrenadantes foram filtrados através de filtros estéreis (Schleicher & Schuell de poro 0,2 µm). O aparelho usado era da marca Gilson com uma coluna Merck Polyspher OA KC

Cat. nº 51270, mantida a 85°C, tendo água ultra-pura como fase móvel com um fluxo de 0,5ml/min. O padrão interno usado foi a glucose (5g/l).

A determinação do peso seco por ml de suspensão de células foi feita como anteriormente descrito (Capítulo 3: Material e Métodos - 1. 2).

5. REPRODUCIBILIDADE

No que concerne à capacidade fermentativa das diversas massas, o resultado apresentado corresponde ao valor médio de três experiências cujo valor não se afastou entre si mais do que 30 ml de CO₂.

A viabilidade celular foi determinada, para cada caso, em cinco placas de Y.P.G. e tomado em consideração o valor médio do conjunto das placas cujo número de UFC não apresentava diferenças superiores a 15 UFC.

O valor encontrado para cada estirpe do conteúdo intracelular de trealose, corresponde à média de três determinações, correspondentes a três ensaios distintos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE CONGELAMENTO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS

Após uma aturada selecção das estirpes de leveduras que isolámos a partir de iscos de broas tradicionais de Portugal, com base na forte e eficaz fermentação da maltose, na rápida e elevada produção de biomassa, quando crescidas no meio Y.P.S. a pH 6,0 e a 30°C, e na sua elevada capacidade fermentativa quando incluídas em massas sem açúcar, era altura de avaliarmos a capacidade fermentativa dessas estirpes quando integradas em massas sujeitas a congelamento a -20°C, por períodos que iam até 30 dias. Os resultados obtidos a partir destes estudos estão apresentados na Fig. 4.1. e na Tabela 4.I..

Nesta tabela os valores da capacidade fermentativa, para cada estirpe de levedura após diversos dias de congelamento, apresentam-se em função da capacidade fermentativa da respectiva estirpe sem prévio congelamento.

Verificou-se que após 4 dias de congelamento a capacidade fermentativa diminuiu na maior parte das estirpes de *S. cerevisiae* experimentadas. A maioria das estirpes de *T. delbrueckii* demonstraram de um modo consistente, elevada capacidade fermentativa, mesmo após longos períodos de armazenamento a -20°C: as estirpes IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) apresentam um ligeiro decréscimo da sua capacidade fermentativa nas massas acabadas de preparar quando comparadas com a estirpe comercial IGC 5325 (F 46), mas mantêm os valores de produção de CO₂ após longos períodos de armazenamento no frio. As estirpes *S. cerevisiae* IGC 4072 e *T. delbrueckii* IGC 4478, embora apresentando baixa capacidade fermentativa, parecem ser estáveis após diversos períodos de

armazenamento a -20°C , indicando a sua tolerância ao congelamento (Tabela 4.I).

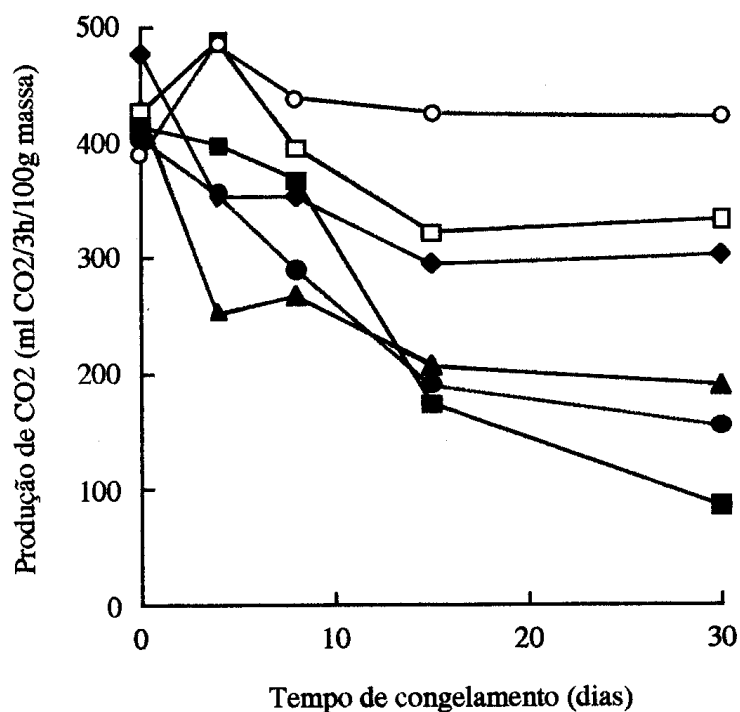


Fig.4.1. Efeito do período de congelamento na produção de CO_2 pelas estirpes de levedura em massas congeladas a -20°C .

Estirpes: (■) *Saccharomyces cerevisiae* IGC 5318 [DB 55A]; (●) *S. cerevisiae* IGC 5319 [DB 55B]; (▲) *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A]; (◆) *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46]; (□) *Torulaspora delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B]; (○) *T. delbrueckii* IGC 5323 [DB 62A].

2. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE PRÉ-FERMENTAÇÃO NA CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS

Foram também estudados os efeitos de diferentes períodos de fermentação anterior ao congelamento na capacidade fermentativa e na viabilidade celular das estirpes seleccionadas. As massas, preparadas com as diferentes estirpes de levedura, foram submetidas a períodos de pré-fermentação de 30, 90 e 150 minutos antes do congelamento e mantidas armazenadas a -20°C durante 4, 8 e 15 dias. Observámos dois padrões de comportamento distintos para estirpes de *T. delbrueckii* e de *S. cerevisiae*. As estirpes IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) da primeira espécie, embora apresentando um ligeiro decréscimo da capacidade fermentativa após 2,5 horas de pré-fermentação, não pareceram ser afectadas pela fermentação antes do congelamento, ao contrário do que aconteceu com as estirpes de *S. cerevisiae* (Fig. 4.2).

Para verificarmos se o período de armazenamento afectava a produção de CO_2 , as mesmas estirpes de *T. delbrueckii* foram sujeitas a períodos mais longos de congelamento. Ambas as estirpes mantiveram uma elevada capacidade fermentativa em massas guardadas a -20°C durante 15 dias e submetidas a um período de fermentação prévia de 150 minutos (453 $\text{ml CO}_2 \cdot 3\text{h}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ massa e 397 $\text{ml CO}_2 \cdot 3\text{h}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ massa respectivamente).

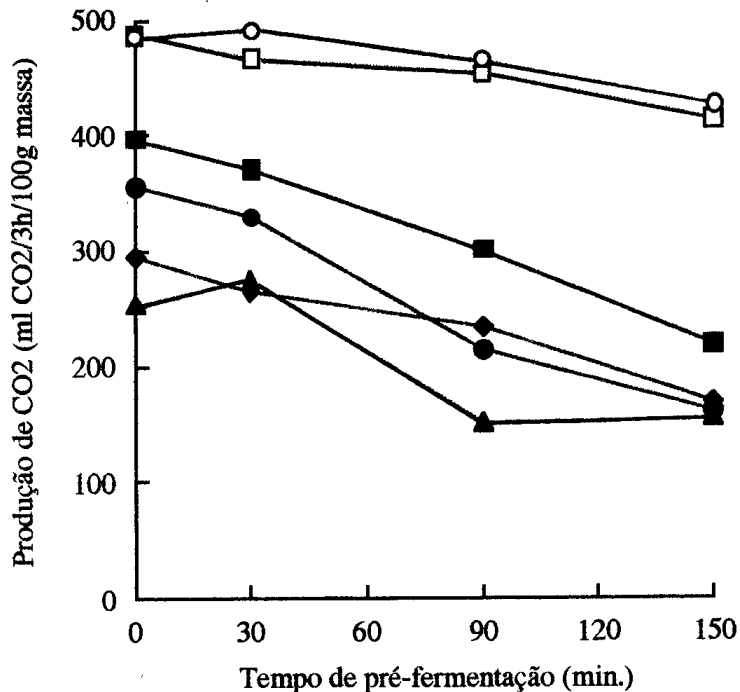


Fig.4.2. Efeito da pré-fermentação na produção de CO₂ pelas estirpes de levedura em massas congeladas e armazenadas a -20°C durante quatro dias.

Estirpes: (■) *Saccharomyces cerevisiae* IGC 5318 [DB 55A]; (●) *S. cerevisiae* IGC 5319 [DB 55B]; (▲) *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A]; (◆) *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46]; (□) *Torulaspota delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B]; (○) *T. delbrueckii* IGC 5323 [DB 62A].

3. EFEITO DO CONGELAMENTO E DA PRÉ-FERMENTAÇÃO NA VIABILIDADE CELULAR

As massas acabadas de preparar com as diferentes estirpes de levedura apresentaram valores do número de células viáveis da mesma ordem de grandeza, qualquer que fosse a estirpe em estudo. Os valores situaram-se na gama 4×10^5 e 6×10^5 UFC/g de massa para as estirpes de *S.*

cerevisiae e 6×10^5 a 8×10^5 UFC/g de massa para as estirpes de *T. delbrueckii*. Após 4 dias de congelamento observou-se um notório decréscimo na taxa de sobrevivência em todas as estirpes estudadas excepto na estirpe *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) (Fig. 4.3).

Para períodos mais longos de armazenamento a -20°C (8, 15 e 30 dias) os valores encontrados mantiveram-se aproximadamente os mesmos em todas as estirpes estudadas, indicando que a viabilidade celular não era significativamente afectada pela duração do período de armazenamento.

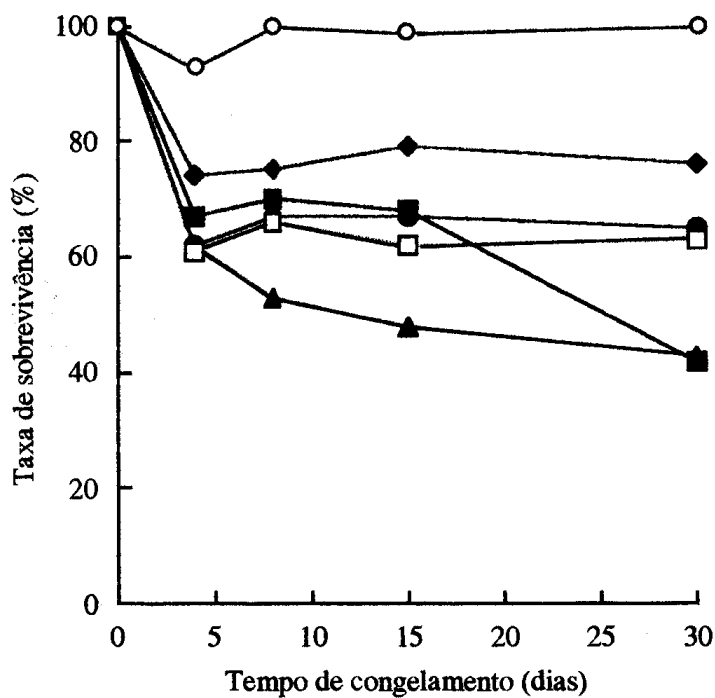


Fig.4.3. Efeito do período de armazenamento na taxa de sobrevivência das leveduras em massas sem pré-fermentação, guardadas a -20°C , até um período de 30 dias.

Estirpes: (■) *Saccharomyces cerevisiae* IGC 5318 [DB 55A]; (●) *S. cerevisiae* IGC 5319 [DB 55B]; (▲) *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A]; (◆) *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46]; (□) *Torulaspora delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B]; (○) *T. delbrueckii* IGC 5323 [DB 62A].

No que diz respeito às massas congeladas, depois de submetidas a uma fermentação prévia, verificou-se que a pré-fermentação também reduziu a viabilidade das células de levedura, numa extensão que dependeu das estirpes em causa. Observámos uma diminuição acentuada do número de células viáveis nas estirpes de *S. cerevisiae* IGC 5320 (DB 56A) e *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A), após 2,5 horas de pré-fermentação (Fig. 4.4).

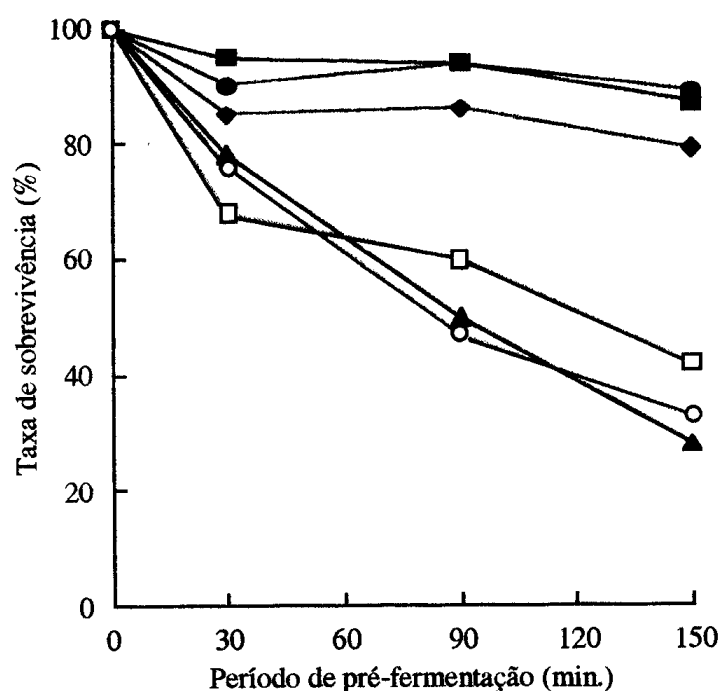


Fig. 4.4. Efeito de diferentes períodos de pré-fermentação na taxa de sobrevivência das leveduras, em massas congeladas e armazenadas durante quatro dias a -20°C .

Estirpes: (■) *Saccharomyces cerevisiae* IGC 5318 [DB 55A]; (●) *S. cerevisiae* IGC 5319 [DB 55B]; (▲) *S. cerevisiae* IGC 5320 [DB 56A]; (◆) *S. cerevisiae* IGC 5325 [F 46]; (□) *Torulaspora delbrueckii* IGC 5321 [DB 42B]; (○) *T. delbrueckii* IGC 5323 [DB 62A].

O mesmo padrão não se verificou para as estirpes IGC 5318 (DB 55A), IGC 5319 (DB 55B) e IGC 5325 (F 46) de *S. cerevisiae*, que mantiveram uma elevada taxa de sobrevivência após esse período de pré-fermentação.

Estes resultados indicaram que a taxa de sobrevivência e a capacidade fermentativa não se encontram correlacionadas, uma vez que as estirpes de *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) apresentaram elevados valores de produção de CO₂ após 4 dias de congelamento e 2,5 horas de pré-fermentação (Fig. 4.2).

Podemos assim referir que, no que respeita à tolerância ao congelamento, a capacidade fermentativa de todas as estirpes de *S. cerevisiae* excepto IGC 4072 diminuiu consideravelmente à medida que o período de congelamento aumentou. Do mesmo modo, nestas estirpes, quando as massas respectivas se sujeitaram a um período de fermentação antes do congelamento, observou-se um efeito negativo na capacidade fermentativa das leveduras. Verificou-se ainda que a capacidade fermentativa das leveduras diminuiu com o aumento do tempo de pré-fermentação, tendo-se obtido em três estirpes uma redução de cerca de um quarto do valor inicial obtido nas massas frescas, quando sofreram 2,5 horas de fermentação antes do congelamento (Fig. 4.2). Aparentemente, algumas estirpes mostraram-se mais sensíveis ao próprio processo de congelamento do que ao armazenamento a -20°C, enquanto outras (IGC 5318 [DB 55A] e IGC 5319 [DB 55B]) demonstraram ser mais sensíveis a longos períodos de congelamento do que ao congelamento em si, uma vez que mantiveram uma boa capacidade fermentativa para períodos até 8 dias de congelamento, diminuindo consideravelmente após 15 dias. Contrariamente, e de acordo com o que seria de esperar tendo em conta os resultados de outros autores (Oda *et al.*, 1986; Hino *et al.*, 1990; Oda e Tonomura, 1993), estirpes de *T. delbrueckii* (IGC 5321 [DB 42B], IGC 5323 [DB 62A] e IGC 4478) pareceram ser mais tolerantes ao congelamento, uma vez que mantiveram aproximadamente a mesma capacidade fermentativa após 30 dias de congelamento a -20°C. Embora apresentando uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência após pré-fermentação, duas destas estirpes

mantiveram uma boa capacidade fermentativa na massa após 2,5 horas de pré-fermentação e 15 dias de congelamento.

4. CONTEÚDO INTRACELULAR DE TREALOSE E SUA RELAÇÃO COM A CRIO-RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS

Os valores encontrados para a concentração intracelular de trealose situaram-se na gama de 5 a 29% (p/p), correspondendo o valor mais elevado a uma estirpe de *S. cerevisiae* de proveniência industrial (IGC 5325 [F 46]) e às estirpes IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) de *T. delbrueckii* (Tabela 4.I). A estas duas últimas estirpes corresponderam também os valores mais elevados de concentração de proteína (resultados não apresentados).

O conteúdo intracelular de trealose das leveduras comerciais de panificação é geralmente considerado um parâmetro crítico na resistência à tensão ou "stress" (Atfield *et al.*, 1992; Eleutherio *et al.*, 1993; Hottiger *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 1994), e as condições de cultura têm vindo a ser optimizadas de modo a obter-se conteúdos de trealose mais elevados. São frequentes níveis de trealose de 15 a 20% do peso seco, sendo considerado o valor de 10% como um patamar crítico (Gélinas *et al.*, 1989). Também o conteúdo proteico parece ser um dos factores que afecta a capacidade fermentativa das leveduras, tendo sido associada uma boa prestação da levedura após congelamento a um elevado conteúdo em proteína (Hsu *et al.*, 1979a).

Tabela 4.I. Conteúdo intracelular de trealose e capacidade fermentativa das leveduras crescidas em Y.P. com 2% de sacarose. Efeito na capacidade fermentativa de diferentes períodos de armazenamento das massas a -20°C.

Estirpes de leveduras	Conteúdo intracelular de trealose (mg/g p.s.)	Capacidade fermentativa			
		Antes do congelamento (ml CO ₂ /3h/100g massa)	Após o congelamento *		
			4 dias	15 dias	30 dias
IGC 5318 (DB 55A)	102.0	414	95.9	41.8	20.5
IGC 5319 (DB 55B)	173.7	402	88.3	47.3	38.6
IGC 5320 (DB 56A)	51.9	429	59.0	48.0	44.1
IGC 5321 (DB 42B)	259.4	427	113.8	75.4	78.0
IGC 5323 (DB 62A)	227.5	389	124.4	109.3	108.5
IGC 5325 (F 46)	290.0	476	74.2	62.0	63.7
IGC 5326 (F 65)	206.1	447	66.0	46.5	47.7
IGC 4072	131.8	223	104.0	94.2	98.2
IGC 4478	186.7	270	108,9	99.6	106.3

* - Calculada com base na capacidade fermentativa antes do congelamento

Os resultados obtidos parecem indicar que outros factores poderão desempenhar um papel importante na tolerância ao congelamento, uma vez que os valores mais elevados de trealose intracelular que encontramos nem sempre corresponderam a uma maior tolerância (Tabela 4.I). Verificámos também um efeito negativo na capacidade fermentativa das células de *S. cerevisiae* IGC 5325 (F 46), uma estirpe com níveis elevados de trealose intracelular, quando as respectivas massas acabadas de preparar se submetiam a um período de fermentação antes do congelamento. Estes

resultados estão aparentemente de acordo com os obtidos por outros autores (Gélinas *et al.*, 1989; Meric *et al.*, 1995), que indicam que a crio-resistência não se encontra directamente correlacionada nem com a quantidade inicial de trealose nas células de levedura nem com o nível ainda presente na massa na altura do congelamento.

Capítulo 5

DISCUSSÃO GERAL

1. DISCUSSÃO GERAL

No âmbito do presente trabalho de tese foram desenvolvidos estudos sobre a flora de leveduras presente em fermentos tradicionalmente utilizados no fabrico de pão. Os estudos foram basicamente delineados tendo como objectivos centrais: (i) identificar a flora de leveduras presente nos iscos, (ii) viabilizar o início de uma colecção representativa do património microbiano característico de iscos ou fermentos, em via de desaparecimento mas que ainda é possível encontrar em casas tradicionais portuguesas, (iii) avaliar a representividade de outras espécies de leveduras, que não *Saccharomyces cerevisiae*, nos iscos e (iv) seleccionar, de entre as leveduras isoladas, estirpes com perfil adequado às exigências do mercado da panificação.

Numa primeira fase procuramos ter acesso a iscos provenientes de vários locais, essencialmente da região minhota e, recuperar um pouco da história da feitura de pão por processos caseiros. Uma parte significativa do trabalho incidiu sobre a caracterização das leveduras isoladas, dando ênfase aos aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos contemplados nos testes clássicos de taxonomia. Numa segunda fase do trabalho procurámos caracterizar as leveduras isoladas, avaliando alguns parâmetros considerados relevantes na indústria de panificação.

Nos capítulos anteriores procedemos à apresentação e discussão sistematizadas dos resultados obtidos ao longo das diferentes etapas do trabalho. Neste capítulo final iremos, basicamente, proceder a uma análise de conjunto dos resultados dando ênfase aos aspectos considerados mais importantes em termos das leveduras isoladas e da sua possível aplicação em panificação. Para facilidade de leitura e interpretação iremos considerar os seguintes itens: (i) leveduras representativas dos iscos, (ii) leveduras isoladas *versus* parâmetros imprescindíveis em panificação e (iii) potencial uso de estirpes de *Torulaspota delbrueckii*. Terminaremos tecendo considerações sobre alguns dos aspectos

que não foi possível contemplar no âmbito deste trabalho e que poderão constituir linhas para trabalho futuro.

1.1. LEVEDURAS REPRESENTATIVAS DOS ISCOS

Conforme referido no Capítulo 2, a recolha de iscos, embora efectuada em vários locais do país, incidiu preferencialmente na região minhota, onde ainda hoje se fabrica pão de milho e centeio por processos tradicionais. Dos 34 iscos recolhidos, foram isoladas 95 estirpes de leveduras e identificadas 75, de acordo com os métodos clássicos utilizados em taxonomia de leveduras. As estirpes isoladas pertenciam a nove espécies diferentes sendo as mais representativas *S. cerevisiae*, (em cerca de 80% das amostras), *Pichia membranaefaciens* e espécies afins, *Torulaspota delbrueckii* e *Issatchenkia orientalis* (em cerca de 40%). A distribuição das leveduras variou de uma a quatro espécies diferentes por fermento, apresentando alguns deles mais do que uma estirpe da mesma espécie. Apenas sete dos fermentos estudados continham uma cultura pura de *S. cerevisiae*. Associações de duas espécies diferentes foram encontradas em 48% dos fermentos, 30% apresentavam associações de três espécies e os restantes consistiam numa mistura de quatro espécies de leveduras. Associações de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, *I. orientalis*, e/ou *P. membranaefaciens* foram as mais frequentes. É igualmente importante referir que em alguns fermentos não estava presente qualquer estirpe de *S. cerevisiae* podendo inferir-se que a actividade fermentativa fosse da responsabilidade de *T. delbrueckii*. Outros fermentos houve, em que não se isolaram estirpes de leveduras fermentativas, sendo provável que, nesses casos, a fermentação fosse levada a cabo pelas bactérias lácticas aí presentes.

1.2. LEVEDURAS ISOLADAS VERSUS PARÂMETROS RELEVANTES EM PANIFICAÇÃO: POTENCIAL USO DE ESTIRPES DE *TORULASPORA DELBRUECKII*

Tendo como referência o perfil desejável para uma levedura com potencial aplicação em panificação deu-se ênfase à caracterização das estirpes isoladas no que respeita ao crescimento, produção de biomassa, capacidade fermentativa nas massas, actividade enzimática e resistência ao congelamento. Após experimentar vários meios de crescimento em que fizemos variar a concentração da fonte de carbono, verificámos que o meio que permitiu a obtenção da biomassa máxima mais elevada foi o meio Y.P.S. (2% de sacarose) a pH 6 que ao mesmo tempo era o mais similar aos melaços, correntemente utilizados na indústria de produção de levedura para panificação. Nestas condições, encontrámos valores superiores a 12g biomassa (peso seco). l⁻¹, mesmo mais elevados do que os encontrados para as estirpes comerciais. Tais valores foram obtidos para as estirpes de *Torulaspota delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) incluídas no grupo das estirpes que seleccionámos. No que respeita à taxa específica de crescimento, os valores oscilaram entre 0,51 e 0,70 h⁻¹ nas estirpes avaliadas. Na sequência destes resultados seleccionaram-se estirpes de *S. cerevisiae* e de *T. delbrueckii* para estudos de fermentação nas massas. Os resultados mostraram que a capacidade fermentativa destas estirpes oscilou entre 400 e 500ml de CO₂ em três horas de fermentação, por cada 100g de massa, valores muito próximos dos obtidos para estirpes comerciais. Por outro lado, verificámos que a adição de cloreto de sódio ao meio de crescimento estimulava a capacidade fermentativa nas massas de algumas estirpes de *S. cerevisiae* e de *T. delbrueckii*. No entanto, para todas as estirpes estudadas, constatámos que a biomassa sofria um decréscimo de 20 a 30%, indicando que

o meio Y.P.S. com 3% de NaCl não é apropriado para efeitos de produção de fermento.

Tendo em conta que o principal açúcar fermentável presente na farinha é a maltose, avaliámos a relação que poderia existir entre concentrações crescentes de maltose no meio de crescimento das estirpes seleccionadas e a sua respectiva capacidade fermentativa na massa. Na maioria dos casos, a presença de maltose no meio de crescimento contribuiu para um aumento da capacidade fermentativa da levedura na massa. No entanto, quando o meio só possuía maltose (Y.P.M.), a capacidade fermentativa das leveduras nas massas diminuiu consistentemente, passando para valores inferiores aos obtidos com o meio Y.P.S..

As actividades da α -glucosidase e da invertase são particularmente relevantes nas leveduras de panificação (Rose e Vijayalakshmi, 1993). Nas estirpes estudadas, em diferentes meios de crescimento, verificámos que a actividade da α -glucosidase foi sempre mais elevada para as estirpes de *Torulaspora delbrueckii*; aumentando com a concentração de maltose no meio, qualquer que fosse a estirpe em causa. Verificou-se ainda que a presença de cloreto de sódio no meio também estimulou a actividade da enzima. No que respeita à invertase, pudemos verificar que, de um modo geral (conforme referiam Oda e Ouchi em 1989) a actividade desta enzima tendia a aumentar com a presença de concentrações crescentes de maltose no meio de crescimento, podendo desenhar-se dois comportamentos distintos: um para as estirpes de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* de proveniência comercial, em que a actividade da enzima aumentava com a concentração crescente de maltose no meio de crescimento e outro, para as estirpes de *S. cerevisiae* que isolámos, em que só constatámos um aumento da actividade da enzima para valores de 0,1 e 0,5% de maltose no meio.

Entre as propriedades inerentes às leveduras a serem utilizadas na panificação industrial, hoje imprescindíveis, encontra-se a resistência ao congelamento, já que o mundo moderno requer pão fresco a qualquer hora do dia, o que implica a necessidade de, poupando tempo aos padeiros, poder satisfazer os consumidores. Este aspecto fez com que a indústria se debruçasse

sobre as leveduras que, além de possuírem elevada capacidade fermentativa nas massas, não perdessem de um modo significativo a sua capacidade de produção de CO₂, mesmo quando armazenadas a -20°C durante alguns dias ou semanas. Por outro lado, sabe-se através de literatura recente que as massas sujeitas a congelamento sem um período prévio de fermentação, parecem não apresentar paladar e características organolépticas desejáveis pelo público. Há mesmo alguns autores que defendem que a fermentação da massa antes do congelamento desempenha um papel mais significativo na estabilidade da massa, do que um qualquer outro factor individualmente (Oda *et al.*, 1986; Hino *et al.*, 1987; Hahn e Kawai, 1990a; Nakagawa e Ouchi, 1994). Era então necessário conciliar a capacidade fermentativa das leveduras nas massas durante períodos mais ou menos longos de congelamento com tempos variáveis de pré-fermentação, e nestas circunstâncias avaliar a capacidade fermentativa das leveduras nessas massas.

No entanto, os mecanismos de tolerância das leveduras ao congelamento não são ainda bem conhecidos, verificando-se que de um modo geral, as leveduras de panificação são susceptíveis a danos causados durante o congelamento e armazenamento e não retêm suficiente capacidade fermentativa após este último período (Hsu *et al.*, 1979a, 1979b; Nakagawa e Ouchi, 1994).

Verificámos que a capacidade fermentativa da maioria das estirpes de *S. cerevisiae* que experimentámos, diminuiu ao fim de quatro dias de congelamento, enquanto a maior parte das estirpes de *T. delbrueckii* apresentou elevada capacidade fermentativa, mesmo após 30 dias de congelamento a -20°C. Constatámos ainda que quando as massas preparadas com as diferentes estirpes de leveduras seleccionadas ficavam sujeitas a períodos diversos de fermentação antes do congelamento, se podiam observar dois comportamentos distintos: as estirpes de *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) não apresentavam variações significativas da sua capacidade fermentativa, mesmo após 2,5 horas de pré-fermentação e quatro dias de congelamento; nas mesmas condições, as estirpes de *S. cerevisiae* diminuíam a sua produção de CO₂ nas massas à medida que o período de pré-fermentação aumenta.

Segundo alguns autores, o grande problema a contornar no processo de congelamento das massas é o de saber como manter a viabilidade das células e a capacidade fermentativa das leveduras congeladas, estando os esforços da investigação a serem dirigidos para a compreensão da manutenção da estabilidade das leveduras durante o período de congelamento (Hino *et al.*, 1987). Autores há que referem que o congelamento lento parece, de um modo geral, permitir às células uma adaptação ao ambiente frio, transferindo água intracelular para o gelo existente no meio externo; por outro lado, o congelamento rápido provoca o congelamento intracelular, porque a temperatura se altera muito mais rapidamente do que a água permeia as membranas celulares: os pequenos cristais de gelo, formados durante o congelamento intracelular, tendem a recrystalizar em cristais ainda maiores durante o período de aquecimento, tornando-se então letais para as células (Hsu *et al.*, 1979). Por outro lado, muitos investigadores acreditam que a pré-fermentação é nefasta à viabilidade das leveduras (Sugihara *et al.*, 1971; Hsu *et al.*, 1979; Hahn e Kawai, 1990b). Outros autores concluem que a propriedade essencial de uma levedura capaz de ser usada em massas congeladas é uma elevada capacidade fermentativa, comparável à das leveduras de panificação, mesmo nas massas congeladas que tenham sido fermentadas durante um período adequado antes do congelamento (Oda *et al.*, 1986).

Apesar de nas massas acabadas de preparar se ter obtido um número de células viáveis da mesma ordem de grandeza, independentemente da estirpe de levedura em causa (10^5 a 10^6 UFC / g de massa), detectámos, de um modo geral, uma nítida diminuição da taxa de sobrevivência após quatro dias de congelamento; no entanto, para períodos mais longos de armazenamento, os valores encontrados para cada estirpe mantiveram-se praticamente inalterados, apontando que a duração do período de congelamento não era determinante na viabilidade celular. Verificámos também que a pré-fermentação reduziu a viabilidade das células de levedura, função da estirpe em causa. De um modo genérico, as estirpes de *T. delbrueckii* e algumas de *S. cerevisiae* baixaram a taxa de sobrevivência à medida que o tempo de pré-fermentação aumentou; a

maioria das estirpes de *S. cerevisiae* manteve uma taxa de sobrevivência elevada mesmo após 2,5 horas de pré-fermentação.

Detectados alguns dos muitos problemas relacionados com o congelamento das massas e com os períodos de pré-fermentação, indagámo-nos sobre as causas subjacentes a tais processos, que permitiam que um conjunto de leveduras se apresentasse resistente ao congelamento e mesmo a períodos variáveis de pré-fermentação, enquanto outro fosse extremamente sensível ao congelamento e/ou a um período de fermentação prévia. Em *S. cerevisiae* a acumulação de um dissacarídeo não redutor, isómero da maltose, a trealose, apresentava uma correlação positiva com a tolerância à tensão térmica, sugerindo que a trealose pudesse ser um agente protector que contribuía para a tolerância ao congelamento (De Virgilio *et al.*, 1994). Para a preservação da viabilidade das leveduras nas massas congeladas, um conteúdo intracelular de trealose elevado é considerado crucial (Van Dijck *et al.*, 1995).

Determinada a concentração intracelular de trealose nas estirpes que seleccionámos, os valores encontrados situaram-se entre 5 e 29% (p/p), sendo que os mais elevados correspondiam à estirpe comercial de *S. cerevisiae* IGC 5325 (F 46) e às estirpes de *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A).

Em resumo, os resultados obtidos mostraram que a maior parte das estirpes isoladas de iscos tradicionais apresentavam elevada capacidade fermentativa em massas desprovidas de açúcar, enquanto, nas mesmas condições, as estirpes de colecção IGC 4072 e IGC 4478 demonstraram baixa produção de CO₂, quando comparadas com as estirpes de panificação comercial. Verificámos ainda que duas estirpes de *T. delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) mantinham elevada capacidade de produção de CO₂ em todas as condições experimentadas, mostrando ao mesmo tempo elevada concentração de trealose intracelular e proteína, apresentando concomitantemente a maior tolerância ao congelamento.

1.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como reflexão final, consideramos que os resultados obtidos, no seu conjunto, para além da sua importância sob o ponto de vista fundamental, apontam claramente para aplicações importantes na indústria da panificação.

No que respeita à vertente mais fundamental, é nossa convicção que muitos aspectos ficaram por esclarecer e constituirão, naturalmente, objecto de estudos futuros. Entre outros, realçamos:

a. a ecologia microbiana dos iscos, que vai desde o estudo da flora bacteriana presente às interações bactérias/bactérias e bactérias/leveduras;

b. resposta das leveduras seleccionadas à presença de ácidos fracos de cadeia curta, habitualmente utilizados como agentes fungistáticos nas farinhas;

c. elucidação dos mecanismos subjacentes à resistência das leveduras seleccionadas ao congelamento.

Numa perspectiva mais aplicada, e de acordo com os nossos resultados, as estirpes de *Torulaspora delbrueckii* IGC 5321 (DB 42B) e IGC 5323 (DB 62A) revelam-se particularmente interessantes sob o ponto de vista de panificação. Não foi possível, no âmbito desta tese, explorar as potencialidades destas estirpes em testes de panificação à escala industrial, o que constitui um campo em aberto para trabalhos futuros. Podemos no entanto adiantar que “Ensaio de Panificação” realizados no nosso laboratório foram, de acordo com os “provadores de laboratório!”, coroados de êxito. É, assim, nossa convicção que

tais estirpes de *T. delbrueckii* poderão vir a constituir uma boa alternativa, ao lado de *S. cerevisiae*, no fabrico do pão.

Apêndice I

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS UTILIZADOS

Neste apêndice encontra-se a composição de todos os meios utilizados ao longo deste trabalho e de métodos seguidos, sendo a sua discriminação feita conforme a designação referida no texto.

I- MEIO DE CULTURA UTILIZADO PARA O ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

MEIO *Y.M.A.*

Composição:

Glucose [BDH] 1% (p/v).

Peptona [Difco] 0,5% (p/v).

Extracto de levedura [Difco] 0,3% (p/v).

Extracto de malte [Difco] 0,3% (p/v).

Agar [Difco] 2% (p/v).

Água desionizada q.b..

- O pH do meio foi corrigido para 3,5 com ácido clorídrico 1N e posteriormente foi suplementado com cloranfenicol [Merck] 500 mg/l com o objectivo de inibir o crescimento de bactérias.

- O meio, previamente liquefeito, foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 120°C e a 1 atm.. Posteriormente foi vertido em placas de Petri estéreis e deixado a solidificar.

II- MEIO DE CULTURA UTILIZADO NA CONTAGEM DE COLÓNIAS DE LEVEDURAS (UFC)

MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA:

MEIO Y.P.G.

composição:

Glucose [BDH] 2% (p/v).

Bacto-peptona [Difco] 1% (p/v).

Extracto de levedura [Difco] 0,5% (p/v).

Agar [Difco] 2% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Após liquefação, procedeu-se à esterilização em autoclave do meio (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

- No final o meio foi vertido em placas de Petri estéreis, esperando-se que solidificasse.

procedimento:

- Colocar 1,0g de isco em 20ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril.

- Agitar vigorosamente.

- Proceder a diluições sucessivas da suspensão obtida, até se obterem entre 30 e 300 UFC por cada 0,1ml de suspensão espalhados em cada placa de Y.P.G..

- Incubar durante 48 horas a 28°C.

- Contar o número de UFC em cada placa.

III- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA MANUTENÇÃO DAS LEVEDURAS

1 - MEIO Y. P. G.

composição:

A mesma descrita para o meio designado pela mesma sigla.

- Liquefez-se o meio e verteu-se em tubos de ensaio (± 5 ml/tubo).
- Os tubos de ensaio esterilizaram-se (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão em autoclave); posteriormente foram deixados inclinados, a solidificar.

2 - MEIO LIQUIDO

composição:

Glicerol [Difco] 30% (p/v).

Água estéril q.b..

- Volumes de cerca de 1,5ml foram distribuídos assepticamente por criotubos de 2ml também estéreis e guardados a -70°C.

IV- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

UTILIZAÇÃO DE ALGUMAS FONTES DE CARBONO EM ANAEROBIOSE: FERMENTAÇÃO

1- MEIOS DE FERMENTAÇÃO

a. composição do meio base:

Extracto de levedura [Difco] 0,45% (p/v).

Bacto-peptona [Difco] 0,75% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Procedeu-se então ao aquecimento da suspensão (evitando a fervura), à qual se adicionou uma pequena quantidade de azul de bromotimol [Merck], até se obter uma cor ligeiramente esverdeada.

- Após filtração desta solução por um funil de algodão hidrófilo, porções de 4 ml deste meio foram distribuídos por tubos de ensaio onde previamente se tinham introduzido tubos de Durham invertidos, e vedados com tampa metálica.

- Os tubos assim preparados, foram autoclavados (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

b. composição de cada uma das soluções das fontes de carbono:

D-glucose [BDH] 6% (p/v).

D-galactose [Sigma] 6% (p/v).

Maltose [Merck] 6% (p/v).

Sacarose [Merck] 6% (p/v).

α - α -trealose [Sigma] 6% (p/v).

Melibiose [Merck] 6% (p/v).

Lactose [Merck] 6% (p/v).

Celobiose [Merck] 6% (p/v).

Melezitose [Sigma] 6% (p/v).

Rafinose [Merck] 6% (p/v).

Inulina [Merck] 6% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Estas soluções foram então filtradas através de filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22 μm .

c. composição final do meio de fermentação:

O meio considerou-se completo quando, a cada tubo de ensaio preparado conforme (a.) se adicionaram, em condição estéreis, 2ml da respectiva solução da fonte de carbono (b.).

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E ENERGIA

2- MEIOS DE ASSIMILAÇÃO

a. composição do meio base:

Yeast Nitrogen Base (Y.N.B.) [Difco] 6,7% (p/v).

Água desionizada q.b..

b. composição de cada uma das soluções das fontes de carbono:

D-glucose [BDH] 5% (p/v).

D-galactose [Sigma] 5% (p/v).

L-sorbose [Sigma] 5% (p/v).

L-ramnose [Merck] 5% (p/v).

D-xilose [Merck] 5% (p/v).

D-ribose [Merck] 5% (p/v).

D-arabinose [Merck] 5% (p/v).

L-arabinose [Merck] 5% (p/v).

Sacarose [Merck] 5% (p/v).

Maltose [Merck] 5% (p/v).

α - α -trealose [Sigma] 5% (p/v).

Celobiose [Merck] 5% (p/v).

Melibiose [Merck] 5% (p/v).

Lactose [Merck] 5% (p/v).

Rafinose [Merck] 10% (p/v).

Melezitose [Sigma] 5% (p/v).

Amido [BDH] 5% (p/v).

Inulina [Merck] 5% (p/v).

α -metil-D-glucosídeo [Sigma] 5% (p/v).

Salicina [Sigma] 5% (p/v).

Arbutina [Fluka] 5% (p/v).

Metanol [Merck] 4% (p/v).

Etanol [Merck] 4% (p/v).

Glicerol [Sigma] 5% (p/v).

Eritritol [Merck] 5% (p/v).

Adonitol [Merck] 5% (p/v).

Galactitol [Sigma] 5% (p/v).

D-manitol [Merck] 5% (p/v).

D-sorbitol [Merck] 5% (p/v).

Inositol [Merck] 5% (p/v).

Xilitol [Merck] 5% (p/v).

Ácido láctico [BDH] 5% (p/v).

Ácido succínico [Merck] 5% (p/v).

Ácido cítrico [Merck] 5% (p/v).

Ácido tartárico [Merck] 5% (p/v).

Ácido málico [Sigma] 5% (p/v).

D-glucoronato [Sigma] 5% (p/v).

D-gluconato [Sigma] 5% (p/v).

D-glucono 1,5-lactona [Sigma] 5% (p/v).

Y.N.B. q.b..

- 0,5ml destas soluções previamente filtradas em condições assépticas (filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22 μ m), foram adicionadas, nas mesmas condições, a tubos de ensaio com 4,5ml de água, já esterilizados em autoclave (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS COMO ÚNICA FONTE DE NITROGÊNIO

a. composição do meio base:

Yeast Carbon Base (Y.C.B.) [Difco] 11,7% (p/v).

Água desionizada q.b..

b. composição da solução das fontes de nitrogénio:

Nitrato de potássio [Merck] 0,78% (p/v).

Glucosamina [Fluka] 5% (p/v).
L-lisina [Sigma] 0,56% (p/v).
Nitrito [Merck] 0,26% (p/v).
Etilamina [Sigma] 0,64% (p/v).
Cadaverina [Sigma] 0,68% (p/v).
Creatina [Merck] 0,60% (p/v).
Creatinina [Merck] 0,60% (p/v).

Y.C.B. q.b..

- A tubos de ensaio com 4,5ml de água, já esterilizados em autoclave (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão) foram adicionados 0,5ml destas soluções previamente filtradas (filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22 μ m) em condições assépticas.

3- MEIO DE CRESCIMENTO SEM VITAMINAS: MEIO MINERAL BASE SEM VITAMINAS

composição :

a. (NH₄)SO₄ [Merck] 0,5% (p/v)
KH₂PO₄ [Merck] 0,5% (p/v)
MgSO₄.7H₂O [Merck] 0,05% (p/v)
CaCl₂.2H₂O [Merck] 0,0132% (p/v))

b. Glucose [BDH] 2% (p/v)
Água desionizada q.b..

c. solução aquosa de oligoelementos A:
(H₃BO₄ [Merck] 0,1% (p/v)
KI [Merck] 0,02% (p/v)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [M&B] 0,04% (p/v)

d. solução de oligoelementos B:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [M&B] 0,008% (p/v)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,04% (p/v)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,0723% (p/v)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,08% (p/v).

- Após pesagem das respectivas quantidades dos compostos constituintes dos oligoelementos B, procedeu-se previamente à sua dissolução em 0,1ml de HCl [Merck] 1M e só depois em água desionizada.

- A esterilização dos oligoelementos (A e B) foi feita por filtração (filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22 μm).

- O meio sem vitaminas ficou pronto quando para cada litro de meio mineral base com glucose, se adicionaram 0,5ml da solução de oligoelementos A e 0,5ml da solução de oligoelementos B, de modo a obter-se concentrações finais de 0,05% (v/v).

4- MEIO PARA OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DE LEVEDURA EM MEIO LÍQUIDO

composição:

Glucose [Merck] 2% (p/v).

Extracto de levedura [Difco] 0,5% (p/v).

Peptona [Difco] 1% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Para observar a morfologia em meio líquido, o meio, devidamente esterilizado, foi distribuído em condições de assepsia, por tubos de ensaio estéreis (\pm 6ml/tubo) e o crescimento avaliado até um máximo de cinco dias.

**5 - MEIO PARA A DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO
A DIFERENTES TEMPERATURAS**

composição:

A mesma descrita para o meio 4 -.

- O meio foi também entubado, e colocado em banho termostático, às seguintes temperaturas: 30°C, 35°C, 37°C e 42°C. O crescimento foi acompanhado durante uma semana.

**6 - MEIO PARA A VERIFICAÇÃO DA TOLERÂNCIA OSMÓTICA AO
CLORETO DE SÓDIO**

composição:

Solução de Y.N.B. [Difco] 6,7% (p/v).

NaCl [Merck] 10 %, (p/v).

Água desionizada q.b..

- A solução de Y.N.B. foi de imediato esterilizada, usando filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22µm.

- Foram distribuídos 4,5 ml da solução salina por tubos de ensaio que posteriormente foram autoclavados (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

- Quando frios, adicionou-se a cada um, em condições assépticas, 0,5ml da solução de Y.N.B..

**7- MEIO PARA VERIFICAÇÃO DA TOLERÂNCIA OSMÓTICA A 50% (v/v)
DE GLUCOSE**

composição:

Glucose [Merck] 50% (v/v).

Extracto de levedura [Difco] 1% (p/v).

Agar [Difco] 2% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Levou-se a solução à ebulição.
- Distribuíram-se cerca de 5ml por tubos de ensaio.
- Os tubos de ensaio foram então esterilizados em autoclave (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão) e posteriormente deixados a solidificar inclinados.

8- MEIO PARA VERIFICAÇÃO DA HIDRÓLISE DA ARBUTINA

composição:

Arbutina [Fluka] 0,5% (p/v).

Extrato de levedura [Difco] 0,1% (p/v).

Agar [Difco] 2% (p/v).

Água da torneira q.b..

- Após solubilização do agar, repartiu-se o meio na razão de 5 - 7ml por tubo de ensaio e esterilizou-se durante 15 min, a 120°C e à pressão de 1atm..
- De imediato incorporou-se a cada tubo 3 gotas de uma solução aquosa de citrato férrico amoniacal [Merck] a 1% (p/v).

- Todos os constituintes foram bem misturados a quente, deixando-se os tubos inclinados a solidificar.

9- MEIO PARA VERIFICAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA UREIA

("Christensen's urea agar")

composição:

Bacto-peptona [Difco] 1,0g.

Glucose [Merck] 1,0g.

NaCl [Merck] 5,0g.

KH₂PO₄ [Merck] 2,0g.

Vermelho de fenol [Merck] 0,012g.

Agar [Difco] 20g.

900ml de água desionizada.

- Este meio foi distribuído por tubos de ensaio (4,5ml/tubo) e esterilizado em autoclave (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

- Em paralelo preparou-se uma solução aquosa de ureia a 20% (p/v) [Merck], que se esterilizou por filtração.

- Ainda com a primeira solução quente, adicionaram-se 0,5ml da solução de ureia a cada tubo, que após agitação se deixaram inclinados a solidificar.

10- MEIO PARA VERIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE À CICLOHEXIMIDA

composição:

Y.N.B. [Difco] 6,7% (p/v).

Glucose [Merck] 10%.

Cicloheximida [Merck] 100 e/ou 1000 ppm, previamente dissolvida em
2,5ml de acetona [Merck].

Água desionizada q.b..

- A solução foi esterilizada por filtração (filtros estéreis descartáveis Schleicher & Schuell de poro 0,22 μ m).

- No final, adicionaram-se 0,5ml desta solução a tubos de ensaio contendo 4,5ml de água estéril (esterilização em autoclave — 20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão).

11- MEIOS PROPÍCIOS À ESPORULAÇÃO

11.1 - MEIO DE ACETATO DE SÓDIO

composição:

Acetato de sódio anidro [Merck] 0,4% (p/v).

Agar [Difco] 1,5% (p/v).

Água desionizada q.b..

- O meio foi previamente cozido em banho-maria, posteriormente entubado (\pm 5ml/tubo) em seguida esterilizado (20 minutos a 120°C e a 1atm de pressão) e finalmente inclinado até que solidificar.

11.2 - MEIO DE ACETATO DE POTÁSSIO

composição:

Acetato de potássio [Merck] 1% (p/v).

Glucose [Merck] 0,1% (p/v).

Extracto de levedura [Difco] 0,25% (p/v).

Agar [Difco] 1,5% (p/v).

Água desionizada q.b..

- O procedimento foi o descrito para (11.1).

11.3- MEIO DE GORODKOWA (modificado Lodder, DELFT)

composição:

Glucose [Merck] 0,1% (p/v).

Bacto-peptona [Difco] 1% (p/v).

NaCl [Merck] 0,5% (p/v).

Agar [Difco] 3% (p/v).

Água desionizada q.b..

- O procedimento foi o descrito para os meios 11.1 e 11.2.

V- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE PROPRIEDADES "KILLER" NAS LEVEDURAS (Sampaio, 1991)

1- MEIO Y. M. A.

composição:

- O meio foi esterilizado e autoclavado (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão) e vertido em placas estéreis, que em seguida foram deixadas a solidificar.

2- MEIO Y.M.A. DUAS VEZES CONCENTRADO

composição:

- A composição foi idêntica ao meio referido em 1-, mas a concentração dos seus constituintes foi dupla da do primeiro.

3- TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO

composição:

Tampão citrato de sódio [Merck] 0,2M, pH4, duplamente concentrado.

- O valor de pH foi corrigido com NaOH 10M.

4- SOLUÇÃO AQUOSA DE AZUL DE METILENO

composição:

Azul de metileno [Merck] 2% (p/v).

Água desionizada q. b..

- Esta solução foi adicionada ao meio 3., de modo a obter-se uma concentração final de 0,1% (v/v).

- Os meios 2- e 3- foram autoclavados (20 minutos a 120°C e a 1atm. de pressão) separadamente, de imediato misturados em condições assépticas e o meio resultante vertido em placas estéreis que se deixaram solidificar.

VI- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA SELECÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS DE POTENCIAL INTERESSE EM PANIFICAÇÃO

1 - MEIO MINERAL BASE COM GLUCOSE (Van Uden, 1967)

composição :

a. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ [Merck] 0,5% (p/v)

KH_2PO_4 [Merck] 0,5% (p/v)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,05% (p/v)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,0132% (p/v))

b. Glucose [BDH] 2% (p/v)

Água desionizada q.b..

c. solução aquosa de *oligoelementos A*:

H_3BO_3 [Merck] 0,1% (p/v)

KI [Merck] 0,02% (p/v)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [M&B] 0,04% (p/v))

d. solução de *oligoelementos B*:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [M&B] 0,008% (p/v)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,04% (p/v)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,0723% (p/v)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck] 0,08% (p/v)).

e. solução aquosa de *vitaminas*:

Biotina [BDH] 0,001% (p/v).

Pantotenato de cálcio [Merck] 0,08% (p/v).

Mio-inositol [BDH] 4% (p/v).

Niacina [Merck] 0,16% (p/v).

Hidroclorato de piridoxina [BDH] 0,16% (p/v).

Hidroclorato de tiamina [Sigma] 0,16% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Este meio, possuindo vitaminas (0,5ml/l) que não estavam presentes no meio 3- (meio de crescimento sem vitaminas), foi acertado para pH4 e pH6 e o crescimento decorreu a 28°C e a 30°C.

2- MEIO MINERAL BASE COM SACAROSE

composição:

- A composição é idêntica ao meio descrito anteriormente (1-), tendo sido alterada unicamente a fonte de carbono: sacarose [Merck] 2% p/v.

- As condições de utilização foram as mesmas acima referidas.

3- MEIO DE MELAÇO DE CANA (I)

composição:

Açúcar de cana [Golden Syrup; melaço de cana da Ilha da Madeira; a Colmeia do Minho L^{da}.] 3% (p/v).

Ureia [Merck] 0,193% (p/v).

KH₂PO₄ [Merck] 0,046% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Este meio foi utilizado quer a pH4 quer a pH6 e às temperaturas de 28 e 30°C.

4- MEIO DE MELAÇO DE CANA (II)

composição:

Açúcar de cana [Golden Syrup; melaço de cana da Ilha da Madeira; a Colmeia do Minho L^{da}.] 2% (p/v).

Ureia [Merck] 0,05% (p/v).

KH₂PO₄ [Merck] 0,01% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Este meio foi igualmente utilizado a pH4 e a pH6 e às temperaturas de 28°C e 30°C.

5- MEIO *Y.P.D.*

composição:

Extracto de levedura [Difco] 1% (p/v).

Bacto-peptona [Difco] 2% (p/v).

Glucose [Merck] 2% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Este meio foi utilizado a valores de pH4 ou de pH6 e às temperaturas de 28°C e 30°C ou quando necessário na presença de NaCl [Merck] 3% (p/v).

6- MEIO *Y.P.S.*

composição:

Extracto de levedura [Difco] 2% (p/v).

Bacto-peptona [Difco] 4% (p/v).

Sacarose [Merck] 2% (p/v).

KH₂PO₄ [Merck] 0,2% (p/v).

MgSO₄.7H₂O [Merck] 0,1% (p/v).

Água desionizada q.b..

- Este meio foi utilizado a 28°C e a 30°C, na ausência ou na presença de NaCl [Merck] 3% (p/v), a pH4 ou pH6.

VII- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE LEVEDURA COM POTENCIAL INTERESSE EM PANIFICAÇÃO

1- MEIO *Y.P.S.*, pH 6.

2- MEIO *Y.P.S.* em qu se substituiu 0,1% de sacarose por 0,1% de *maltose*.

3- MEIO *Y.P.S.* em qu se substituiu 0,5% de sacarose por 0,5% de *maltose*.

4- MEIO *Y.P.M.* (*Y.P.S.* em qu se substituiu 2,0% de sacarose por 2,0% de *maltose*).

VIII- MÉTODO UTILIZADO NO FABRICO DAS MASSA

composição da massa:

250g de farinha de trigo possuindo 20 ppm de ácido ascórbico e 130 ppm de enzimas amilolíticas e fúngicas.

5g de NaCl [Merck].

7,5g do sedimento de levedura previamente obtido a partir de uma cultura crescida durante 24 horas (D.O. final [3,5 - 5,5]).

130 ml de água da torneira (de acordo com a humidade da farinha).

procedimento:

- Dissolver num "goblet" a levedura na água.

- Adicionar esta suspensão à farinha.
- Amassar manualmente durante um minuto.
- Juntar em seguida o sal e continuar a amassar-se do mesmo modo, até perfazer oito minutos.
- Pesar 315g da massa resultante.
- Colocar de imediato a respectiva massa na cuba do reofermentómetro.
- Aguardar de 5 minutos de modo a homogeneizar a temperatura no interior da cuba de fermentação (27-28°C).
- Tornar a cuba estanque.
- Ligar o botão de activação dos ciclos.
- Deixar decorrer o processo durante 3 horas e 3min

IX- MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÓNIAS (UFC) NAS MASSAS, QUER ANTES QUER APÓS O SEU CONGELAMENTO

1- MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA

procedimento:

- Colocar 0,5g de massa (acabada de preparar ou após o degelo) em 10ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril.
- Agitar vigorosamente.

- Proceder a diluições sucessivas da suspensão obtida, até se obterem entre 30 e 300 CFU por cada 0,1ml de suspensão espalhados em placas de Y.P.G..
- Incubar durante 48 horas a 28°C.
- Contar o número de UFC em cada placa.

X- MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO (M.E.V.)

- Preparar os porta-amostras metálicos apropriados a M.E.V. ("stubs") com fita auto-adesiva dupla, de modo a cobri-los em toda a sua extensão.
- Colocar nos porta-amostras pequenas porções de massa sem fermentação prévia ou após 3 horas de fermentação e congelá-las a -70°C, durante 24 horas.
- Liofilizar logo de seguida as amostras durante 24 horas.
- Transferir as amostras montadas para um excicador.
- Proceder à metalização, imediatamente antes da observação, com uma camada de de ouro com cerca de 200 Å de espessura.

XI- MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE CÉLULAS PARA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR EM TREALOSE

- Colher por centrifugação, à temperatura ambiente, durante três minutos (12000 rpm — 1400 g) células em fase estacionária, crescidas a 30°C durante 24 horas.
- Ressuspender as células em igual volume de água desionizada fria e lavá-las.
- Repetir esta última etapa duas vezes.
- Extrair a trealose com ácido tricloroacético [Merck] 5% (p/v).
- Deixar as células em repouso durante 45 min, com agitação ocasional.
- Centrifugar as células a 3000 rpm (400 g) durante 10 minutos; repetir o processo duas vezes.
- Guardar os sobrenadantes resultantes destas extracções.
- Determinar a concentração de trealose por HPLC.

XII- MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA INVERTASE E DA α -GLUCOSIDASE

Foram obtidos sedimentos celulares de células crescidas em diversos meios: (VII- 1; 2; 3; 4) e *Y.P.S.* + *NaCl* 3% (p/v), durante 24 horas a 30°C e a 160 rpm.

procedimento para *obtenção dos extractos celulares*:

- A cada sedimento correspondente a 2ml de suspensão celular, adicionaram-se 2ml de tampão imidazol [Sigma] 20 mM, pH7 e 1,5g de esferas de vidro de diâmetro compreendido entre 425 e 600 μm [Sigma].
- O conjunto foi fortemente agitado num "vortex" durante um minuto, seguindo-se um minuto de repouso em gelo
- Este procedimento foi repetido 20 vezes.
- De imediato, o extracto foi sujeito a uma centrifugação de 25 min a 14000 rpm (1700 g) e a 4°C, de modo a separar-se quer das esferas de vidro quer dos restos celulares.

determinação da *actividade da invertase*:

- Colocaram-se num banho termostatizado a 30°C dois "erlenmeyer" contendo cada um 8ml de sacarose [Sigma] 10% (p/v) em tampão imidazol [Sigma] 0,1M, pH7.
- Decorridos cerca de cinco minutos, de modo a homogeneizar a temperatura, adicionou-se a um deles 0,08ml de extracto celular (a que correspondeu o início da reacção), enquanto o outro serviu de controlo.
- A partir do tempo zero e minuto a minuto, até um máximo de cinco, foram retiradas amostras de 0,5ml que se adicionaram a 0,5ml de ácido dinitrossalicílico (DNS) [Merck] previamente colocado em tubos de ensaio. Preparou-se ainda um branco onde se adicionou a 0,5ml de DNS e 0,5ml da mistura reaccional.

- Estes tubos, devidamente vedados, de modo a evitar a evaporação, foram colocados num banho de água fervente durante cinco minutos e seguidamente em gelo.
- Adicionou-se então a cada tubo 10ml de água ultra-pura fria, agitou-se e leu-se a densidade óptica (D.O.) a 540 nm (Perkin-Elmer UV/VIS, munido de controlo de temperatura e ligado a uma impressora Epson II) contra o branco já preparado.
- Previamente tinham sido preparados padrões nas mesmas condições das amostras, a partir de soluções aquosas de sacarose [Sigma] com as seguintes concentrações: 0,0g/ml; 0,2g/ml; 0,4g/ml; 0,6g/ml; 0,8g/ml e 1,0g/ml. A partir dos resultados obtidos foi feita uma curva de calibração da glucose em equivalentes de açúcar redutor pelo método do DNS.

determinação da *actividade da maltase*:

- Num banho de temperatura controlada a 30°C colocaram-se dois "erlenmeyer" contendo cada um 7ml de uma mistura reaccional constituída por uma solução de p-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo (PNPG) [Sigma] 10mM em tampão imidazol [Sigma] 20mM, pH7.
- Após cinco minutos iniciou-se a reacção, adicionando-se a um deles 0,5ml de extracto celular; o outro "erlenmeyer" serviu de controlo.
- A partir do tempo zero e minuto a minuto até um máximo de cinco minutos, foram retiradas amostras de 1ml que se adicionaram a 1ml de Na₂CO₃ [Merck] 1M previamente colocado em tubos de ensaio.

- Preparou-se ainda um branco onde se adicionou a 1ml de Na_2CO_3 1M, 1ml da mistura reaccional.
- A cada um destes tubos de ensaio adicionaram-se 10ml de água ultra-pura e foi lida a DO a 400nm (Perkin-Elmer UV/VIS, munido de controlo de temperatura) contra o branco previamente preparado.
- Anteriormente foram preparados padrões nas mesmas condições das amostras, utilizando concentrações de p-nitrofenol [Sigma] que variaram de 0,00mM a 1,00mM. Com os resultados obtidos foi elaborada uma curva de calibração do p-nitrofenol.

XIII- MÉTODO UTILIZADO NO DOSEAMENTO DA PROTEÍNA NOS EXTRACTOS CELULARES

1 - Determinação da concentração da proteína do extracto celular:

Preparação do reagente de Lowry modificado (Peterson. 1977):

- Adicionou-se lentamente e com agitação, uma solução de carbonato de sódio [Merck] 20% (p/v) a uma solução de sulfato de cobre e tartarato de sódio e potássio [Merck] (CTC), de modo a obter as concentrações finais de 0,1% (p/v) de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,2% (p/v) de tartarato de potássio e 10% (p/v) de carbonato de sódio.
- Preparou-se uma solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) [Merck].
- Previamente também se preparou uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,8N [Merck].

- O reagente de Lowry modificado foi considerado pronto quando se adicionaram volumes iguais das soluções acima referidas (CTC, SDS, NaOH) e água desionizada. Segundo Peterson (1977) esta solução mantém-se estável à temperatura ambiente.
- O reagente de Folin & Ciocalteu e a solução padrão de proteína 400µl/ml obtida a partir de albumina de soro bovino foram fornecidos pela Sigma (cat. nº F 9252) e (cat. nº P 7656).
- Obtido o extracto celular a concentração da proteína foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) usando albumina de soro bovino (BSA) [Sigma] como padrão, em concentrações que variaram de 0µg/ml até 123µg/ml.
- As soluções padrão foram preparadas perfazendo um volume final de 1ml a partir de cada uma das soluções padrão de proteína previamente preparadas. A cada solução das amostras adicionou-se 1ml de reagente de Lowry, seguidamente agitou-se no "vortex" e deixaram-se os respectivos tubos a incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após este período adicionou-se a cada tubo 0,5ml de reagente de Folin & Ciocalteu, agitando-se imediatamente.
- Após 30 minutos à temperatura ambiente, as leituras foram feitas contra um branco, preparado na mesmas condições das amostras, a 750nm num espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS, ligado a uma impressora Epson II.
- O procedimento para o doseamento da proteína nos extractos celulares decorreu de modo idêntico ao referido para a obtenção da curva padrão, tendo-se diluído a amostra até se obterem concentrações finais de proteína contidas nos limites da curva padrão.

2 - Doseamento da proteína total:

Utilizou-se, do mesmo modo, o método de Lowry modificado (Peterson, 1977).

procedimento:

- As amostras foram sujeitas a um tratamento de solubilização a quente com NaOH 2N.
- Foram ainda utilizadas as mesmas diluições da suspensão celular.
- Utilizaram-se 0,5ml de água desionizada para o branco e o mesmo volume de suspensão de cada amostra. A cada um dos tubos em causa adicionaram-se 0,5ml de NaOH 1N. Os tubos, devidamente t apados, foram em seguida imersos num copo com água fervente, durante 5 minutos, seguindo-se o seu arrefecimento em gelo.
- De imediato adicionaram-se a cada tubo 2,5ml de reagente de Lowry, à qual se seguiu agitação vigorosa. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Finalmente adicionaram-se 0,5ml de reagente de Folin & Ciocalteu, seguida de agitação rápida de cada um dos tubos. A cor foi deixada desenvolver durante 30 minutos. As leituras foram levadas a cabo conforme descrito na secção *XIII-1* -.

Bibliografia

Akdogan, Hülya e Mustafa Özilgen (1992). Kinetics of microbial growth, gas production, and dough volume increase during leavening. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**: 141-143

Atlas, R. M. (1988). *In: Microbiology - Fundamentals and Applications* (Macmillan Publishing Company), pp. 478-482. Macmillan Inc., New York.

Almeida, M. J. e C. Pais (1996a). Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Letters in Applied Microbiology*, **23**: 154-158.

Almeida, M. J. e C. Pais (1996b). Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from tradicional corn and rye bread doughs. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 4401-4404.

Attfield, Paul V., Ana Raman e Carolyn J. Northcott (1992). Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, **94**: 271-276.

Attfield, Paul V., Sophia Kletsas e Brian W. Hazell (1994). Concomitant appearance of intrinsic thermotolerance and storage of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* during early respiratory phase of batch-culture is *CIF1*- dependent. *Microbiology*, **140**: 2625-2632.

Báguena, R., M. D. Soriano, M. A. Martínez-Anaya e C. Benedito de Barber (1991). Viability and performance of pure yeast strains in frozen wheat dough. *Journal of Food Science*, **56**: 1690-1694.

Baker, J. C. (1939). The permeability of bread by air. *Cereal Chemistry*, **16**: 730-733.

Baker, J. C. (1941). The structure of the gas cell in bread dough. *Cereal Chemistry*, **18**: 34-41.

Baker, J. C. e M. D. Mize, (1941). The origin of the gas cell in bread dough. *Cereal Chemistry*, **18**: 19-34.

Barber, Salvador, M. José Torner, M. Antonia Martínez-Anaya e Carmen Benedito de Barber (1989). Microflora of the sour dough of wheat flour bread IX. Biochemical characteristics and baking performance of wheat doughs elaborated with mixtures of pure microorganisms. *Z. Lebensm Unters Forsch*, **189**: 6-11.

Barnett, J. A., R. W. Payne e D. Yarrow (1990). *Yeasts. Characteristics and Identification*. University Press, Cambridge.

Baur, X. e A. B. Czuppon (1995). Allergic reaction after eating α -amylase (Asp 0 2)-containing bread. *Allergy*, **50**: 85-87.

Bekes, F. , P. W. Gras, R. B. Gupta, D. R. Hickman e A. S. Tatham (1994). Effects of high M_r glutenin subunit (1Bx20) on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, **19**: 3-7.

Bervas, E., S. Gauthier, D. Richard-Molard e Y. Vayssier (1991). Rôle des levures dans les autres produits alimentaires. *In: Biotechnologie des levures* (Ed. J. P. Larpent), pp. 314-315. Masson.

Beudeker, Robert F., Henk W. Van Dam, Johannes B. Van Der Platt e K. Vellenga (1990). Developments in baker's yeast production. *In: Yeast. Biotechnology and Biocatalysis*, (Eds. Verachtert H. e De Mot R.), pp. 103-146. Marcel Dekker, Inc., New York.

Biltcliffe, D. O. (1972). Active dried baker's yeast. II. Factors involved in the fermentation of flour. *J. Fd. Technol.*, 7: 63-77.

Blumenthal, C., P. W. Gras, F. Bekes, E. W. R. Barlow e C. W. Wrigley (1995). Possible role for the *Glu-D1 locus* with respect to tolerance to dough-quality change after heat stress. *Cereal Chemistry*, 72: 135-136.

Boggini, G., P. Tusa e N. E. Pogna (1995). Bread making quality of durum wheat genotypes with some novel glutenin subunit compositions. *Journal of Cereal Science*, 22: 105-113.

Burrows, S (1970). *In*: Rose A. H., Harrison JS (eds). The Yeasts, vol 3. Academic Press, New York, pp 349-419.

Burrows, S (1979). *In*: Rose A. H., Harrison JS (eds). Economic Microbiology, vol 4. Academic Press, New York, pp 32-64.

Burrows, S. e J. S. Harrison (1959). Routine method for determination of the activity of baker's yeast. *J. Inst. Brew.*, 65: 39-45.

Cansado, José, Elisa Longo, Dolores Agrelo e Tomás G. Villa (1989). Levaduras asociadas a procesos de fermentación espontánea en vinos de Ribeiro. Análisis del homo/heterotalismo y sistema killer de las cepas de *S. cerevisiae*. *Microbiologia SEM*, 5: 79-88.

Cansado, José, Elisa Longo, Pilar Calo, Carmen Sieiro, Jorge B. Velázquez e Tomás G. Villa (1991). Role of killer character in spontaneous fermentations from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 643-647.

Chen, W. Z. e R. C. Hosney (1995). Wheat flour compound that produces sticky dough: isolation and identification. *J. Food Sci.*, 60: 434-437.

Clemént, Philippe, Annie Loiez born Hennette e Lesaffre Cie Aug. 2, (1983). Strains of yeast for bread-making and novel strains of yeast thus prepared. United States Patent 4,396,632.

Chinery, S.A. e E. Hinchliffe (1988). The stable maintenance of 2 μ m plasmids in yeast: a new class of vector. *Yeast* 4 (Special Issue): S 123, Agosto 1988.

Cohen, J. D., M. J. Goldenthal, B. Buchferer e J. Marmur (1984). * *Molecular and General Genetics*, 196: 208.

Contamine, A. S., J. Abecassis, M-H. Morel, B. Vergnes e A. Verel (1995). Effect of mixing conditions on the quality of dough and biscuits. *Cereal Chemistry*, 72: 516-522.

Dairaku, Kazuo, Yoshihiko Yamasaki, Kazuo Kuki, Suteaki Shioya e Takeichiro Takamatsu (1981). Maximum production in a baker's yeast fed-batch culture by tubing method. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 2069-2081.

De Virgilio, Claudio, Thomas Hottiger, Judith Dominguez, Thomas Boller e Andres Wiemken (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance *in*: I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.*, 219: 179-186.

Dennis, M. J., A. Burrell, K. Mathieson, P. Willetts e R. C. Massey (1994). The determination of the flour improver potassium bromate in bread by gas chromatographic and ICP-MS methods. *Food Additives and Contaminants*, 11: 633-639.

D'Amore Tony, Rena Crumplen e Graham G. Stewart (1991). The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, **7**: 191-196.

Eleutherio, Elis C. A., Pedro S. Araujo e Anita Panek (1993). Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, **30**: 591-596.

Esteve, Concepción Collar, Carmen Benedito de Barber e María Antonia Martínez- Anaya (1994). Microbial sour doughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. *Journal of Food Science*, **59**: 629-633.

Evans, I. H. (1990). Yeast strains for baking: recent developments. *In: Yeast Technology* (Eds. J. F. T. Spencer e D. M. Spencer), pp 13-54. Springer-Verlag.

Eynard, Lucia, Nicoletta Guerrieri e Paolo Cerletti (1995). Modifications of starch during baking: studied through reactivity with amyloglucosidase. *Cereal Chemistry*, **72**: 594-597.

Farvili, N., C. E. Walker e J. Qarooni (1995). Effects of emulsifiers on pita bread quality. *Journal of Cereal Science*, **21**: 301-308.

Fattohi, Nabeel (1994a). Studies of volatile secondary molasses constituents with inhibitory effect on yeast fermentation — Part 1: Determination of molasses and yeast components by GC and HPLC. *Zuckerind.*, **119**: 554-560.

Fattohi, Nabeel (1994b). Studies of volatile secondary molasses constituents with inhibitory effect on yeast fermentation — Part 2: Minimum inhibitory concentrations and synergic inhibitory effects of carbon acids and fatty alcohols on sucrose and molasses media. *Zuckerind.*, **119**: 847-853.

Gan, Z., P. R. Ellis e J. D. Schofield (1995). Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, **21**: 215-230.

Gélinas, P. , G. Fiset, A. Leduy e J. Goulet (1989). Effect of content on cryotolerance of baker's yeast in frozen dough. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2453-2459.

Gassenmeier, Klaus e Peter Schieberle (1995). Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type) — influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Z Lebensm Forsch.*, **201**: 241-248.

Gélinas, P., e O. Lachance (1995). Development of fermented dairy ingredients as flavor enhancers for bread. *Cereal Chem.*, **72**: 17-21.

Gélinas, P., I. Deaudelin e M. Grenier (1995). Frozen dough: effects of dough shape, water content and sheeting-molding conditions. *Cereal Foods World*, **40**: 124-126.

Gélinas, P., J. Audet, O. Lachance e M. Vachon (1995). Fermented dairy ingredients for bread: effects on dough rheology and bread characteristics. *Cereal Chemistry*, **72**: 151-154.

Gobbetti, M., A. Corsetti e J. Rossi (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **41**: 456-460.

Gobbetti, M., A. Corsetti e J. Rossi (1995a). Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in sour-dough using the rheofermentometer. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **11**: 625-630.

Gobbetti, M., A. Corsetti e S. de Vincenzi (1995b). The sourdough microflora. Characterization of homofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test. *Ital. J. Food Sci.*, 2: 95-101.

Grba, S., E. Oura e H. Suomalainen (1975). On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. *European J. Appl. Microbiol.*, 2: 29-37.

Gupta, R. B., K. Khan e F. Macritchie (1993). Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*, 18: 23-41.

Gupta, R. B., Y. Popineaut, J. Lefebvre, M. Cornec, G. J. Lawrence e F. Macritchie (1995). Biochemical basis of flour properties in bread wheats. II. Changes in polymeric protein formation and dough/gluten properties associated with the loss of low M_r or high M_r glutenin subunits. *Journal of Cereal Science*, 21: 103-116.

Hahn, Young-Sook e Hiroyasu Kawai (1990a). Screening of freeze-tolerant yeasts and their bread dough fermentative properties. *J. Home Econ. Jpn.*, 41: 115-121.

Hahn, Young-Sook e Hiroyasu Kawai (1990b). Isolation and characterization of freeze-tolerant yeasts from nature available for the frozen-dough method. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 829-831.

Hähnel, Werner, Ibrahim Jussouf e Felix Müller (1995). Investigations into the properties of emulsifiers in yeast-leavened dough by means of infrared spectroscopy. *Z Lebensm Unters Forsch*, 200: 244-246.

Hansen, Å e B. Hansen (1994). Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*, 19: 185-190.

Hansen, Birgit e Åse Hansen (1994). Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by acid lactic bacteria and sourdough yeasts. *Z Lebensm Unters Forsch*, **198**: 202-209.

Harrison, J. S. (1971). Yeasts in baking: factors affecting in behaviour. *J. Appl. Bact.*, **34**: 173-179.

Hashmi, I. e M. Wootton (1995). Tandoori bread production and quality. *Food Australia*, **47**: 365-368.

Hino, A., H. Takano e Y. Tanaka (1987). New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations. *Cereal Chem.*, **64**: 269-275.

Hino, Akihiro, Kohji Mihara, Kohtaro Nakashima e Hiroyuki Takano (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1386-1391.

Horimoto, Y., T. Durance, S. Nakai e O. M. Lukow (1995). Neural networks vs principal component regression for prediction of wheat flour loaf volume in baking tests. *Journal of Food Science*, **60**: 429-433.

Hoseney, R. C. e D.E. Rogers (1990). The formation and properties of wheat flour doughs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **29**: 73-93.

Hottiger, Thomas, Claudio De Vergilio, Michael N. Hall, Thomas Boller e Andres Wiemken (1994). The role of trehalose synthesis for acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **219**: 187-193.

Hsu, K. H., R. C. Hoseney e P. A. Seib (1979). Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.* **56**: 419-424.

Hsu, K. H., R. C. Hoseney e P. A. Seib (1979). Frozen dough. II. Effects of freezing and storing conditions on the stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.* **56**: 424-426.

Hull, Steven R., James S. S. Gray, Theodore A. W. Koerner e Rex Montgomery (1995). Trehalose as a common industrial fermentation byproduct. *Carbohydrate Research*, **266**: 147-152.

Johnston, J. R. e H. Oberman (1979). Yeast genetics in industry. *Progr. Ind. Microbiol.* (Ed. M. J. Bull), Elsevier Publishing Co, Amesterdam **15**: 151-205.

Keller, Felix, Maja Schellenberg e Andres Wiemken (1982). Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch Microbiol.*, **131**: 298-301.

Kerr, C. L., J. M. Faubion e R. C. Hoseney (1992). Effects of lipoxygenase and yeast on the rheological properties of dough. *Lebesm.-Wiss. u.-Technol.*, **25**: 244-247.

Kidd, George e James Devorak (1994). Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Bio/Technology*, **12**: 1328-1329.

Kline, L. and T. F. Sugihara (1968). Factors affecting the stability of frozen bread doughs. I. Prepared by the straight dough method. *Baker's Dig.* **42**:44-50.

Kline, L. and T. F. Sugihara (1971). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* **21**: 459-465.

Kopperschläger, Gerhard (1994). Phosphofructokinase from baker's yeast. *Methods in Enzymology*, **228**: 144.

Kreger-Van Rij, N. J. W. (1989). Taxonomy and systematics of yeasts. *In: The Yeasts - Biology of Yeast*. (Eds. A. H. Rose e J. S. Harrison) pp 5-62. Academic Press Inc.: London, New York.

Kurtzman, Cletus P (1990). Classification and general properties of yeasts. *In: Yeast-Biotechnology and Biocatalysis*. (Eds. H. Verachtert e R. De Mot.) pp 1-34. Marcel Dekker Inc.: New York.

Kyogoku, Y. e K. Ouchi (1995). Isolation of a cold-sensitive fermentation mutant of a baker's yeast strain and its use in a refrigerated dough process. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 639-642.

Lagunas, Rosario (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **104**: 229-242.

Leslie, Samuel B., Eitan Israeli, Bruce Lighthart, John H. Crowe e Lois M. Crowe (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 3592-3597.

Ling, Zhong Ya, Shigeru Morimura e Kenji Kida (1995). Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF - 7 in repeated - batch fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**: 204-207.

Lodder, J. e Kreger-van Rij (1967). The yeast. A taxonomic study. North Holland Pub, Amesterdam.

Lowry, Olivier H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr e Rose J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biol. Chem.*, **193**: 265-257.

MacRitchie, F. e P. W. Gras (1973). The role of flour lipids in baking. *Cereal Chemistry*, 50: 292-302.

Marquina, D., C. Peres, F. V. Caldas, J. F. Marques, J. M. Peinado e I. Spencer-Martins (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 279-283.

Martínez-Anaya, M. A., C. Benedito de Barber e C. Collar Esteve (1994). Effect of processing conditions on acidification properties of wheat sour doughs. *International Journal of Food Microbiology*, 22: 249-255.

Martínez-Anaya, M. A., C. Collar e C. Benedito de Barber (1995). Comparison of wheat flours from different European countries in microbiologically started breadmaking processes. *Cereal Foods World*, 40: 605-609.

Mascarós, A. F., C. S. Martínez e C. Collar (1994). Metabolism of yeasts and lactic acid bacteria during dough fermentation relating functional characteristics of fermented doughs. Metabolismo de levaduras y bacterias ácido lácticas durante la fermentación en relación con las características funcionales de la masa fermentada. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34: 623-642.

Menz, N., B. Zupan e G. Tormey (1995). Thiamin content of bread sold in Melbourne. *Food Australia*, 47: 381-384.

Meric, Laure, Sophie Lambert-Guilois, Olivier Neyreneuf e D. Richard-Molard (1995). Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: Contribution of cellular trehalose. *Cereal Chem.*, 72: 609-615.

Meuser, F., J - M. Brümmer e W. Seibel (1994). Bread varieties in Central Europe. *Cereal Foods World*, 39: 222-230.

Monteiro, Mário Berto Vieira (1950). Valor industrial de algumas leveduras dos discos empregados em panificação doméstica e de outras origens. Relatório Final do Curso de Engenheiro-Agrônomo. Universidade Técnica de Lisboa; Instituto Superior de Agronomia; Centro de eEstudos de Microbiologia e Tecnologia Agrícolas.

Morgan, Keith R., Richard H. Furneaux e Roger A. Stanley (1992). Observation by solid-state ^{13}C CP MAS NMR spectroscopy of the transformations of wheat starch associated with the making and staling of bread. *Carbohydrate Research*, 235: 15-22.

Müller, Joachim, Thomas Boller e Andres Wiemken (1995). Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, 112: 1-9.

Murakami, Y., K. Yokoigawa e H. Kawai (1995). Lipid composition of a freeze-tolerant yeast, *Torulaspora delbruekii*, and its freeze-sensitive mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44: 167-171.

Nakagawa, Satoshi e Kozo Ouchi (1994). Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3499-3502.

Nakagawa, Satoshi e Kozo Ouchi (1994). Improvement of freeze tolerance of commercial baker's yeasts in dough by heat treatment before freezing. *Biosci. Biotech Biochem.*, 58: 2077-2079.

Nakata, Kuniho, Junko Hasegawa e Kazuhiko Okamura (1995). Accumulation and role of trehalose in *Torulaspora delbrueckii* N° 3110. *Biosci. Biotech Biochem.*, **59**: 986-989.

Nakata, Kuniho, Junko Hasegawa e Kazuhiko Okamura (1995). Analysis of sensitivity to high temperature of *Torulaspora delbrueckii* N° 3110. *Biosci. Biotech Biochem.*, **59**: 990-994.

Oda, Y. e K. Ouchi (1989). Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1495-1499.

Oda, Y. e K. Ouchi (1990a). Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. *Food Microbiology*, **7**: 241-248.

Oda, Y. e K. Ouchi (1990b). Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough. *Food Microbiology*, **7**: 43-47.

Oda, Y. e K. Tonomura (1993a). Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. *Food Microbiology*, **10**: 249-254.

Oda, Y. e K. Tonomura (1993b). Selection of a novel baking strain from the *Torulaspora* yeasts. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**: 1320-1322.

Oda, Y. e K. Tonomura (1994). Applicability of the yeast *Torulaspora pretoriensis* YK-1 to breadmaking by the frozen-dough method. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41**: 214-217.

Oda, Y. e K. Tonomura (1995). Role of maltose permease and α -glucosidase in maltose fermentation and dough-leavening of *Torulaspora pretoriensis* YK-1. *Food Microbiology*, **12**: 405-411.

Oda, Yuji, Kazuo Uno e Shigenori Ohta (1986). Selection of yeasts for breadmaking by frozen-dough method. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 941-943.

Ohshima, Yoshinobu, Toshio Sugaura, Munehiro Horita e Takashi Sasaki (1987). Industrial application of artificially induced diploid strains of *Torulasporea delbrueckii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53,: 1512-1514.

Operti, M. S., D. E. Oliveira, A. B. Freitas-Valle, E. G. Oestreicher, J. R. Mattoon e A. D. Panek (1982). Relationships between trehalose metabolism and maltose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 5: 69-76.

Patterson, Margaret & A. P. Damoglou (1986). The effect of water activity and pH on the production of micotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Letters in Applied Microbiology*, 3: 123-125.

Petrofsky, K. E. e R. C. Hosney (1995). Rheological properties of dough made with starch and gluten from several cereal sources. *Cereal Chem.*, 72: 53-58.

Piazza, L. e P. Masi (1995). Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chem.*, 72: 320-325.

Ponte, J. G., Jr. e Gerald Reed (1982). Bakery foods. *In: Prescott and Dunn's industrial microbiology* (Ed. Reed, G.) pp 246-292. AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT.

Ponte, J. G., Jr. e C. C. Tsen (1987). Bakery Products. *In: Food and Beverage Mycology* (Ed. Larry R. Beuchat),pp. 233-267. Van Nostrand Reinhold, New York.

Radler, F. (1980). Les facteurs "Killer" des levures. *Bulletin de L'O. I. V.* 593-594: 568-572.

Ranhotra, G. S., J. A. Gelroth, J. Langemeier e E. Rogers (1995). Stability and contribution of beta carotene added to whole wheat bread and crackers. *Cereal Chem.*, 72: 139-141.

Randez-Gil, F. e P. Sanz (1994). Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 581-586.

Roach, R. R. e R. C. Hoseney (1995a). Effect of certain surfactants on the starch in bread. *Cereal Chem.*, 72: 578-582.

Roach, R. R. e R. C. Hoseney (1995b). Effect of certain surfactants on the swelling, solubility and amylograph consistency of starch. *Cereal Chem.*, 72: 571-577.

Röcken, W. e P. A. Voysey (1995). Sour-dough fermentation in bread making. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 79: 38S-48S.

Röcken, Wolfgang, Martina Rick e Marita Reinkemeier (1992). Controlled production of acetic acid in wheat sour doughs. *Z Lebensm Unters Forsch*, 195: 259-263.

Rodrigues, G. (1994). *Evolução da População de Leveduras e das Características Físico-Químicas de Salmouras de Azeitonas: Estudo Comparativo entre um Processo de Tratamento Artesanal e um Industrial*. Tese de mestrado. Departamento de Biologia da Universidade do Minho, Braga.

Rose, A. H. e G. Vijayalakshmi (1993). Baker's yeast. *In: The yeasts*, 2^{ed.}, vol. 5. (Ed. A. H. Rose and J. S. Harrison).pp 357-397. Academic Press, London.

Rosini, Gianfranco (1989). Killer yeasts: notes on the properties and technical use of the character. *In: Biotechnology Applications in Beverage Production*. (Eds. C. Cantarelli e G. Lanzarini) pp 41-48. Esvier Applied Science.

Ruan, R., S. Almaer e J. Zhang (1995). Prediction of dough rheological properties using neural networks. *Cereal Chem.*, 72: 308-311.

Sampaio, J. P. Nunes de Sousa (1991). Demonstração do efeito "killer" em leveduras. Relatório de uma aula teórico-prática, no âmbito da prestação de Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Sasaki, Takashi e Yoshinobu Ohshima (1987). Induction and chracterization of artificial diploids from haploid yeast *Torulaspota delbrueckii*. *Applied e Environmental Microbiology*, 53: 1504-1511.

Scott, P. M. e S. R. Kanhere (1995). Determination of ochratoxin A in beer. *Food Additives and Contaminants*, 12: 591-598.

Scott, P. M., S. R. Kanhere, G. A. Lawrence, E. F. Daley e J. M. Farber (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. *Food Additives and Contaminants*, 12: 31-40.

Shomer, I., G. Lookhart, R. Salomon, R. Vasiliver e S. Bean (1995). Heat coagulation of wheat flour albumins and globulins, their structure and temperature fractionation. *Journal of Cereal Science*, 22: 237-249.

Spencer, J. F. T. e D. M. Spencer (1983). Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 121-142

Stolz, Peter, Georg Böcker, Rudi F. Vogel e Walter P. Hammes (1993). Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters*, **109**: 237-242.

Sugihara, T. F. e L. Kline (1968). Factors affecting the stability of frozen bread doughs. II, Prepared by the sponge and dough method. *Baker's Dig.*, **42**: 51-

Sugihara, T. F., L. Kline e L. B. McCready (1970). Nature of the San Francisco sour-dough bread process. II. Microbiological aspects. *Baker's Dig.*, **44**: 51-53.

Sugihara, T. F., Leo Kline e M. W. Miller (1971). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action. *Applied Microbiology*, **21**: 456-458.

Sumner, J. B., G. F. Sommers (1944). Laboratory Experiments in Biological Chemistry. Academic Press: New York.

Suzuki, C., K. Yamada, N. Okada e S. Nikkuni (1989). Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**: 2593-2597.

Takasaki, Sadako e Keiko Karasawa (1992). Effect of storage period on survival of freeze tolerant yeast and on the rheological properties of frozen dough. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **39**: 813-820.

Toufeili, Imad, Sossy Shadarevian, Adnan M. A. Miski & Iman Hani. (1995). Effect of shortening and surfactants on selected chemical/physicochemical parameters and sensory quality of Arabic bread. *Food Chemistry*, **53**: 253-258.

Trollmo, Christina, Lars André, Anders Blomberg e Lennart Adler (1988). Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, **56**: 321-326.

Uno, K. (1986). Freeze tolerant baker's yeasts: their screening, properties and application, pp. 27-36. *In: Food and Biotechnology. Proceedings of the International Symposium.* (Eds. J. de la Noue, J. Goulet e J. Amiot), Centre de Recherche en Nutrition, Université Laval, Québec.

Van Der Walt J, P, e D. Yarrow (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. *In: The Yeasts - A Taxonomic Study.* (Ed. J. Lodder) pp 45-101. North-Holland Publishing Company: Amsterdam, London.

Van Dijck, Didier Colavizza, Peter Smet e Johan M. Thevelein (1995). Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 109-115.

Van Dijcken, J. P., R. Jonker, G. B. Houweling-Tan, P. M. Bruinenberg, J. Meijer e W. A. Scheffers (1983). The Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae* and its significance for the rising power of baker's yeast. *Symp. Biotechnol. Res. Neth* 171.

Van Laere, André (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiology Reviews*, **63**: 201-210.

Van Uden, N. (1967). Transport limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. *Archives of Microbiology*, **58**: 155-168.

Vondrejs, V. (1987). A killer system in yeasts: applications to genetics and industry. *Microbiological Sciences*, **4**: 313-315.

Wang, S. M., B. M. Watts, S. E. Betker, O. M. Lukow e W. Bushuk (1994). A sensory method of dough stickiness measurement. *Cereal Foods World*, **39**: 831-834.

Wang, Z. J. e J. G. Ponte, Jr. (1994). Improving frozen dough qualities with the addition of vital wheat gluten. *Cereal Foods World*, **39**: 500-503.

Weegels, P. L., R. Orsel, A. M. van de Pijpekamp, W. J. Lichtendonk, R. J. Hamer e J. D. Schofield (1995). Functional properties of low M_r wheat proteins. II. Effects on dough properties. *Journal of Cereal Science*, **21**: 117-126.

Wickner, Reed B. (1976). Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriological Reviews*, **40**: 757-773.

Wolt, M. J. e B. L. D'Appolonia (1984). Factors involved in the stability of frozen dough. I. The influence of yeast reducing compounds on frozen-dough stability. *Cereal Chem.*, **61**: 209-212.

Wolters, Mechteldis G. E., Hendrika A. W. Schreuder, Grietje van den Heuvel, Henk J. van Lonkhuijsen, Ruud J. J. Hermus e Alfons G. J. Voragen (1993). A continuous *in vitro* method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods: application to breads varying in phytic acid content. *British Journal of Nutrition*, **69**: 849-861.

Yokoigawa, Kumio, Yoko Murakami e Hiroyasu Kawai (1995). Trehalase activity and trehalose content in a freeze-tolerant yeast, *Torulopsis delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant. *Biosci. Biotech Biochem.*, **59**: 2143-2145.

Yoshikawa, Yumi, Kanji Matsumoto, Kazuhisa Nagata e Toshio Sato (1994). Extraction of trehalose from thermally-treated baker's yeast. *Biosci. Biotech Biochem.*, **58**: 1226-1230.

Yousif, Ali K., Ian D. Morton e Abdelmnoeim I. Mustafa (1995). Light and scanning electron microscopy of wheat-paste dough and bread. *Arab Gulf J. Scient. Res.*, *13*: 275-292.

Zanoni, B., C. Peri e D. Bruno (1995). Modelling of starch gelatinization kinetics of bread crumb during baking. *Lebesm.-Wiss. u.-Technol.*, *28*: 314-318.

Zech, Manfred e Helmut Görlich (1995). Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible inactivation by componentes of industrial molasses media. *Enzymeand Microbial Technology*, *17*: 41-46.

AGRADECIMENTOS

Durante a preparação deste manuscrito, tive a grande sorte de receber os conselhos de alguns Professores e colegas e a oferta das suas sugestões. Entre eles contam-se a Professora Doutora Célia Pais, a Professora Doutora Cecília Leão e a Professora Doutora Isabel Spencer. Aprendi muito com os debates amigáveis que os seus comentários proporcionaram, mesmo quando às vezes o acordo não foi possível. Agradeço-lhes o tempo, os conhecimentos e a sabedoria que me ofereceram. As palavras não me chegam para exprimir o reconhecimento à Doutora Célia Pais, pela paciência com que leu as diversas versões dos diferentes capítulos, no sentido de me ajudar a melhorá-los.

O trabalho que aqui descrevo não é mais do que um acumular de conhecimentos ao longo de cerca de oito anos no Departamento de Biologia da Universidade do Minho, dentre os quais, os últimos cinco, no Laboratório de Microbiologia II. Estou grata aos meus colegas de Laboratório (Fernanda Lages, Alexandra Nobre, Cristina Aguiar, Rui Oliveira, Mágda Graça, Filomena Duarte e Georgina Rodrigues) pelo que me ensinaram ao longo dos anos e pelo espírito e competência com que me ajudaram a criar um ambiente único, compatível com a investigação e com a Ciência. Estou também reconhecida aos meus alunos, pelo incentivo e pelos comentários tão oportunos, que me deram a saber que para ensinar é sempre preciso conhecer um pouco mais. Se no final do século XX, alguém pode fazer alguma coisa, completamente sozinho, não é, com certeza, "fazer Ciência".

Não deixo de lembrar a permanente preocupação, disponibilidade e a inigualável ajuda do Doutor Bernardo Teixeira Coelho, sem as quais esta tarefa não teria sido levada a bom termo. Para ele, de uma forma muito especial, a minha gratidão.

A influência de alguns factores, que não prescindirei de mencionar, foram preponderantes no decorrer deste trabalho: uma grande curiosidade dos que estiveram mais perto dele, um enorme incentivo, porque cada novo passo era mais uma pequena novidade que despoletava novas curiosidades e acima de tudo um enorme sentido de humor sem o qual qualquer ciência não se transforma em Ciência.

A todos os que de algum modo participaram neste trabalho, o meu muito obrigada.