

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE HIDRATAÇÃO DA
LEVEDURA SECA INSTANTÂNEA DE PANIFICAÇÃO POR
TRATAMENTOS COM SOLUÇÕES DE ADITIVOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Daniel Thomaz

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Laluce

Araraquara, fevereiro de 2008.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE HIDRATAÇÃO DA
LEVEDURA SECA INSTANTÂNEA DE PANIFICAÇÃO POR
TRATAMENTOS COM SOLUÇÕES DE ADITIVOS**

DANIEL THOMAZ

Dissertação de Mestrado
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

T464m Thomaz, Daniel
Melhoramento das condições de hidratação da levedura seca instantânea de panificação por tratamentos com soluções de aditivos / Daniel Thomaz.
- Araraquara : [s.n], 2008
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cecília Laluce

1. Bioquímica. 2. Panificação - Teses. 3. Viabilidade celular.
4. Leveduras - Bioquímica - Teses. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a DEUS e a MARIA, nossa mãe celeste, pela orientação e pelos amigos concedidos.

Aos meus pais (Rosendo e Madalena) pelo investimento e pela confiança que depositaram em mim.

Aos meus irmãos (Fernando e Fabiana) por serem não somente irmãos, mas sim verdadeiros amigos.

A minha namorada (Beth) pelo amor e carinho, pela satisfação com que me ouvia falar sobre minha pesquisa, pelo incentivo e principalmente pelas palavras de conforto nas horas difíceis.

Aos meus familiares e amigos (Wilian, Isabele, Cebola e Elaine, Fabrício e Gislaine, Tio Dora e Tia Zê, Tio Nardão e Tia Fátima, Carlão e Sidiane, Luiz e Fabiana, Catu e Sandra, Paulinho e Marcela, Dario e Sandra, Muca, Alessandro, Crisla, Karen, Sandro, João Batista, Claudia, Estela, Meline, Fafi, Fernando, Tarcisio, Waldenir, Camila, Casinha, Lidi, Duzão, Wolly, Wilmo, Nó e Carina) pela convivência e pelo apoio nas horas alegres e tristes.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra Cecília Laluze pela atenção, zelo e ensinamentos de química.

Aos meus amigos de laboratório pelo companheirismo, convivência e amizade.

Aos Professores que participaram tanto direta quanto indiretamente da minha formação.

Aos funcionários do Instituto de Química de modo especial aos funcionários da Sessão de Pós-Graduação pelos serviços prestados.

A CAPES pela bolsa concedida.

**“Um minuto perdido na juventude possibilidade de desgraça no futuro”
(Prof. Magrilo)**

RESUMO

A hidratação é uma fase crítica no uso da levedura seca instantânea por depender do meio líquido usado, da temperatura e do tempo de hidratação. A levedura seca apresenta-se como um material biológico de grande heterogeneidade celular. Hidratação direta do fermento seco com soluções de aditivos, bem como, o tratamento do fermento seco, mas previamente hidratado com água foram acompanhados por medidas de viabilidade e atividade de fermentação (variações em volume de massa e evolução de CO₂). O efeito do tempo de abertura da embalagem do fermento seco sobre as variações em viabilidade celular teores de glicerol interno e atividade de fermentação também foram determinados. Os seguintes tratamentos foram aplicados a levedura, previamente hidratada em água: (a) incubação em solução de citrato; (b) aplicação de choque térmico as células suspensas em solução de citrato. A levedura seca foi hidratada diretamente em água a temperatura ambiente e em solução de lisina a 37°C. As hidratações diretas do fermento seco com soluções de citrato 0,15 mol.L⁻¹ a pH 6,9 e 7,5 por 40 min a temperatura ambiente proporcionaram aumentos em volume de massa da ordem de 25-29% (35,4-36,6 mL/180 min de fermentação) em relação ao controle (28,3 mL/180 min de fermentação). No entanto, a hidratação direta do fermento seco com água por 10 min a temperatura ambiente proporcionou um volume de massa (36,0 mL/150 min de fermentação) tão bom quanto aos obtidos com solução de citrato, mas com tempos de hidratação e fermentação menores. As hidratações diretas, do fermento seco, com soluções de glicose 2,0% e 0,5% por 40 min a temperatura ambiente proporcionaram aumentos em volume de CO₂ da ordem de 33-38% (53,7-56,0 mL/180 min de fermentação) em relação ao controle (40,5 mL/180 min de fermentação). Porém, a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água por 10 min a temperatura ambiente proporcionou um volume de CO₂ (79,0 mL/180 min de fermentação) maior que os obtidos anteriormente com hidratação em glicose. A hidratação direta do fermento seco instantâneo com solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ por 120 min a 37°C proporcionou aumento em viabilidade da ordem de 2,09 vezes (15,1 cfu.mL⁻¹ x 10²) em relação ao controle (7,2 cfu.mL⁻¹ x 10²). Apesar disso, a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água na faixa de 40-80 min a temperatura ambiente proporcionou viabilidades (16,6 cfu.mL⁻¹ x 10² e 16,4 cfu.mL⁻¹ x 10²) maiores que as obtidas anteriormente (após hidratação com lisina). Portanto, conclui-se que a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água por 10 min a temperatura ambiente foi a melhor condição de hidratação obtida em relação ao crescimento de massa e evolução de CO₂,

enquanto a hidratação direta com água na faixa de 40-80 min a temperatura ambiente foi a melhor condição de hidratação obtida em relação a viabilidade celular.

Palavras-chave: Fermento seco instantâneo. Tratamentos com soluções de aditivos. Viabilidade. Atividade de fermentação da massa.

ABSTRACT

Hydration is a critical phase in the use of instant dry yeast because it depends on the liquid media used, temperature and hydration time. Instant dry yeast is showed as biological material of great cellular heterogeneity. Direct hydration of instant dry yeast in additive solutions as well as the treatment of the instant dry yeast, but previously hydrated in water, were followed by viability measures and activity of fermentation (variations in dough volume and CO₂ evolution). The time effect of the opened packing of the instant dry yeast on the fermentation activity, the internal glycerol and the cellular viability variations were also determined. The following treatments were applied to yeast, previously hydrated in water: a) incubation in citrate solution; b) application of heat shock to suspension cells in citrate solution. Instant dry yeast was directly hydrated in water at room temperature and in lysine solution at 37°C. Direct hydrations of instant dry yeast in 0,15 mol.L⁻¹ citrate solutions at pH 6.9 and 7.5 for 40 min at room temperature provided increases in dough volume around 25-29% (35.4-36.6 mL/180 min of fermentation) in relation to the control (28.3 mL/180 min of fermentation). However, direct hydration of instant dry yeast in water for 10 min at room temperature provided a dough volume (36.0 mL/150 min fermentation) as good as the ones obtained after citrate hydration, but with shorter hydration and fermentation time. Direct hydration of instant dry yeast in 2.0% e 0.5% glucose solutions for 40 min at room temperature provided increases in CO₂ evolution around 33-38% (53.7-56,0 mL/180 min of fermentation) in relation to the control (40.5 mL/180 min of fermentation). However, direct hydration of instant dry yeast in water for 10 min at room temperature provided a CO₂ evolution (79.0 mL/180 min of fermentation) bigger than the CO₂ evolution previously obtained with glucose hydration. Direct hydration of instant dry yeast in 0.08 mol.L⁻¹ lysine solutions for 120 min at 37°C provided increases in cellular viability around 2.09 times higher (15.1 cfu.mL⁻¹ x 10²) in relation to the control (7,2 cfu.mL⁻¹ x 10²). Although, direct hydration of instant dry yeast in water for 40 min to 80 min at room temperature provided viabilities (16,6 cfu.mL⁻¹ x 10² and 16,4 cfu.mL⁻¹ x 10²) bigger than the ones obtained previously (after lysine hydration). Therefore, it was concluded that the direct hydration of instant dry yeast in water for 10 min at room temperature was the best hydration condition obtained in relation to the dough growth and CO₂ evolution. Nevertheless, direct hydration in water for 40 to 80 min at room temperature was the best hydration condition obtained in relation to cellular viability.

Key words: Instant dry yeast. Treatment with additive solutions. Viability. Activity of dough fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Via glicolítica ilustrando a produção de CO ₂ na fermentação da massa.	18
Figura 2.	Microscopia eletrônica de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (BEKER et al., 1984): A , células coletada na fase estacionária; B , depois de desidratação por 1,5 h; C , célula morta durante desidratação e hidratação.	20
Figura 3.	Dispositivo usado para medida do crescimento da massa e evolução de CO ₂ da massa de pão: frasco para a fermentação da massa (A); frasco contendo solução saturada de NaCl (B); cilindro graduado (C) para coletar a solução de NaCl expelida pelo gás proveniente do frasco A; tubo lateral (D) para adição da solução de sal ao frasco B.	25
Figura 4.	Curva analítica do glicerol	27
Figura 5.	Heterogeneidade do fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA”.	28
Figura 6.	Efeito do tempo de hidratação, a 27°C, sobre as variações em crescimento de massa (□), evolução de CO ₂ (○) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO ₂ na parte A da figura, viabilidade na parte B e volumes finais de massa após 150 min de fermentação e CO ₂ após 180 min na parte C . O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	40
Figura 7.	Curva do tempo de hidratação a temperatura ambiente (27°C) sobre a variação no volume de massa e volume de CO ₂ : 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (◆) e 120 min (►). O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	71-AP
Figura 8.	Efeito do tempo de hidratação, a 37°C, sobre as variações em crescimento de massa (□), evolução de CO ₂ (○) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO ₂ na parte A da figura, viabilidade na parte B e volumes finais de massa após 150 min de fermentação e CO ₂ após 180 min na parte C . O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	41
Figura 9.	Curva de tempo de hidratação a 37°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO ₂ : 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (◆) e 120 min (►). O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	72-AP
Figura 10.	Efeito do tempo de hidratação, a 40°C, sobre as variações em crescimento de massa (□), evolução de CO ₂ (○) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO ₂ na parte A da figura, viabilidade na parte B e volumes finais de massa após 180 min de fermentação e CO ₂ após 180 min na parte C . O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	43
Figura 11.	Curva de tempo de hidratação a 40°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO ₂ : 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (◆) e 120 min (►). O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.	73-AP

- Figura 12.** Efeito da hidratação do fermento seco, em soluções de aditivos por 120 min a 37°C, sobre a viabilidade celular. Os aditivos utilizados na preparação das suspensões de células (0,05g/10mL) para a hidratação foram: **a)** água a pH 4,8 (controle); **b)** glicose 0,5% a pH 3,7; **c)** citrato trissódico 0,15 mol.L⁻¹ a pH 7,0; **d)** extrato de levedura 1% a pH 6,3; **e)** extrato de levedura 2% a pH 6,5; **f)** ácido glutâmico 0,08 mol.L⁻¹ a pH 6,1; **g)** ácido glutâmico 0,08 mol.L⁻¹ a pH 6,6; **h)** lisina 0,08 mol.L⁻¹ a pH 9,5; **i)** lisina 0,08 mol.L⁻¹ a pH 7,3; **j)** bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ a pH 7,7. O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 45
- Figura 13.** Curva do tempo de hidratação do fermento seco, em solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (pH 8,0) a 37°C, sobre a viabilidade celular. O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 46
- Figura 14.** Efeito da hidratação do fermento seco com solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (pH 8,0) por 20 min a 37°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO₂: hidratação em água, coletado por centrifugação e resuspensão em água antes da adição a massa, controle (□); hidratação em solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹, coletado por centrifugação e resuspensão em água antes da adição a massa (○); hidratação em solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ e adicionado a massa sem centrifugação (Δ). O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 49
- Figura 15.** Variações em níveis internos de glicerol durante a hidratação do fermento seco (embalagem aberta no instante do experimento) em água (□); solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e solução de bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ) a 37°C. O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 51
- Figura 16.** Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco sobre a viabilidade celular. Parte **A**: embalagem aberta 10 dias antes do ensaio; Parte **B**: embalagem aberta 30 dias antes do ensaio; Parte **C**: embalagem aberta 60 dias antes do ensaio. O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 52
- Figura 17.** Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco e do tempo de hidratação por 20 min (**Parte A**), 50 min (**Parte B**), 80 min (**Parte C**) e 120 min (**Parte D**) a 37°C sobre a viabilidade celular: água (□), lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ). 54
- Figura 18.** Variações em níveis internos de glicerol durante a hidratação do fermento seco (embalagem aberta 30 dias antes do experimento) em água (□); solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e solução de bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ) a 37°C. O fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado. 56
- Figura 19.** Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco e do tempo de hidratação por 20 min (**Parte A**), 50 min (**Parte B**), 80 min (**Parte C**) e 120 min (**Parte D**) a 37°C sobre os teores de glicerol interno: água (□), lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ). 58
- Figura 20.** Relação entre os dados descritos nas **Figuras 17-19** e **Tabela 16** para embalagens abertas no instante do ensaio (**Partes: A, C, E e G**) e após 30 dias (**Partes: B, D, F e H**): Soluções hidratantes utilizadas: água (□), lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○), bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ) e citrato 0,15 mol.L⁻¹ (▷). 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito da quantidade de fermento seco hidratado em água por 10 min a temperatura ambiente (27,6°C) sobre a velocidade de crescimento da massa e o volume final da massa.	29
Tabela 2.	Efeito da quantidade de fermento seco hidratado em água por 10 min a temperatura ambiente (27,6°C) sobre a velocidade da evolução de CO ₂ e o volume final da evolução de CO ₂ .	29
Tabela 3.	Efeitos do tratamento por 20 min em solução de citrato aplicado a células previamente hidratadas por 15 min a temperatura ambiente (28,8°C) e seguido por lavagem em água (duas vezes).	31
Tabela 4.	Efeito do choque térmico a 43°C por 15 min quando aplicado a suspensão de células hidratadas por 30 min a 23°C em soluções de citrato a pH 7,5.	32
Tabela 5.	Comparação entre amostras de fermento tratadas com e sem choque térmico a 43°C aplicado a suspensão de células hidratada por 30 min a 26°C em solução de citrato 0,10 mol.L ⁻¹ a pH 7,5.	33
Tabela 6.	Hidratação da levedura seca, previamente hidratada por 15 min a 24°C e lavada com água, com soluções de aditivos por 20 min a 37°C.	34
Tabela 7.	Efeitos da hidratação do fermento seco por 40 min a 26,1°C, com soluções de aditivos, frente à atividade fermentativa da massa de pão francês.	36
Tabela 8.	Hidratação direta da levedura seca por 40 min a 25,2°C com soluções de Extrato de levedura.	37
Tabela 9.	Hidratação direta da levedura seca por 40 min a 24,6°C com soluções de Extrato de levedura.	38
Tabela 10.	Efeito da hidratação do fermento seco, com solução de lisina 0,08 mol.L ⁻¹ (pH 8,0) por 20 min a 37°C, e da resuspensão do fermento após centrifugação sobre a evolução de CO ₂ .	47
Tabela 11.	Efeito da hidratação do fermento seco, com solução de lisina 0,08 mol.L ⁻¹ (pH 8,0) por 20 min a 37°C, e da resuspensão do fermento após centrifugação sobre a atividade de crescimento da massa.	48
Tabela 12.	Efeito da hidratação do fermento seco proveniente de pacotes distintos, com solução de lisina 0,08 mol.L ⁻¹ (pH 8,0) por 120 min a 37°C, sobre a viabilidade celular.	50
Tabela 13.	Efeitos da hidratação do fermento seco, com soluções de lisina e bicarbonato a 37°C, frente aos teores de glicerol interno em relação ao controle (água pura).	51
Tabela 14.	Efeitos do tempo de abertura da embalagem (aberta 30 dias antes do ensaio) e hidratação do fermento seco com soluções de lisina e bicarbonato a 37°C frente aos teores de glicerol interno em relação ao controle (água pura).	56
Tabela 15.	Efeitos da hidratação do fermento seco instantâneo com soluções de aditivos a 37°C e do tempo de abertura da embalagem (embalagem aberta a 0 e 30 dias) sobre os parâmetros fermentativos (crescimento de massa e evolução de CO ₂).	62

LISTA DE SÍMBOLOS

ADY	Active dry yeast (levedura seca ativa ou levedura seca instantânea)
CO ₂	Dióxido de carbono
NaCl	Cloreto de sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
°C	grau Celsius
min	Minuto
rpm	rotação por minuto
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
μmol	Micromol
mol	Mol
mL	Mililitro
L	Litro
g	Gramas
m/v	massa por volume
v/v	volume por volume
cfu	colony form unit (unidade formadora de colônias)

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	17
2 - OBJETIVOS	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 - Leveduras	23
3.2 - Formas de hidratação do fermento seco, realizadas antes da medida da atividade de fermentação (variação do volume da massa e evolução de CO₂) na massa do pão francês	23
3.2.1 - <i>Hidratação direta do fermento seco</i>	23
3.2.2 - <i>Lavagem do fermento com água a temperatura ambiente seguido de tratamento por 20 min com solução de citrato</i>	23
3.2.3 - <i>Choque térmico aplicado por 15 min a 43°C a células suspensas em soluções de citrato</i>	24
3.2.4 - <i>Tratamentos com soluções de aditivos por 20 min a 37°C após hidratação prévia e lavagem com água a temperatura ambiente</i>	24
3.3 - Medida da atividade de fermentação na massa de pão	24
3.4 - Determinação da quantidade de fermento para utilização nos ensaios da ativação da fermentação na massa de pão	25
3.5 - Ensaio da viabilidade celular da levedura seca	25
3.5.1 - <i>Hidratação da levedura seca comercial para ensaio da viabilidade</i>	25
3.5.2 - <i>Plaqueamento para medida da viabilidade</i>	26
3.6 - Tratamento do fermento seco com soluções de aditivos a 37°C para determinação dos teores de glicerol interno das células	26
3.7 - Medida dos teores de glicerol interno	26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 - A heterogeneidade da levedura comercial seca	27
4.2 - Ensaio da atividade de fermentação da massa: efeito da quantidade de fermento seco hidratado por 10 min a temperatura ambiente	28
4.3 - Ensaios preliminares baseados em melhoramentos conseguidos para a levedura úmida: efeitos sobre a atividade fermentativa de tratamentos aplicados ao fermento previamente hidratado em água (15 a 30 min) a temperatura ambiente (23 a 28,8°C)	30
4.3.1 - <i>Lavagem do fermento com água a temperatura ambiente seguido por tratamento por 20 min com solução de citrato a pH 6,9-7,5</i>	30
4.3.2 - <i>Choque térmico aplicado por 15 min a 43°C a células suspensas em soluções de citrato com aumento na concentração do citrato</i>	31
4.3.3 - <i>Tratamentos com soluções de aditivos a 37°C após hidratação (por 15 min) e lavagem com água a temperatura ambiente</i>	33
4.4 - Hidratação direta do fermento seco com soluções de aditivos a temperatura ambiente (24,6 a 26,1°C) sobre a atividade fermentativa	34
4.4.1 - <i>Hidratação direta do fermento seco, com soluções de aditivos por 40 min a 26,1°C, sobre a atividade fermentativa</i>	35
4.4.2 - <i>Efeitos da concentração do extrato de levedura sobre a atividade de fermentação do fermento seco hidratado por 40 min a temperatura ambiente</i>	37
4.4.3 - <i>Efeitos do ajuste do pH a 7,5 de suspensões de células em soluções de extrato de levedura sobre a atividade de fermentação do fermento seco hidratado</i>	37
4.5 - Efeitos dos tempos de hidratação do fermento seco em água frente as diferentes temperaturas sobre a atividade fermentativa e viabilidade	38
4.5.1 - <i>Hidratação a temperatura ambiente</i>	38
4.5.2 - <i>Hidratação a 37°C</i>	40
4.5.3 - <i>Hidratação a 40°C</i>	42
4.6 - Efeitos sobre a viabilidade celular resultantes da hidratação direta do fermento seco com soluções de aditivos a 37°C após 120 min de hidratação	44
4.6.1 - <i>Comparação entre aditivos</i>	44
4.6.2 - <i>Curva do tempo de hidratação do fermento seco com solução de lisina a 37°C sobre a viabilidade</i>	45

4.6.3 - Comparação da adição da suspensão total das células de levedura diretamente hidratada com solução de lisina 0,08 mol.L ⁻¹ a pH 8,0 (por 20 min a 37°C) com a mesma quantidade de levedura tratada da mesma forma, porém resuspensas em água	46
4.6.4 - Efeitos do tempo de estocagem das embalagens individuais sobre a viabilidade celular de amostras hidratadas com solução de lisina	49
4.7 - Efeitos da hidratação do fermento seco, com soluções de aditivos a 37°C, sobre os teores de glicerol interno das células	50
4.8 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco sobre a retenção de viabilidade, teores de glicerol interno e atividade fermentativa	51
4.8.1 - Efeitos sobre a viabilidade celular	52
4.8.2 - Efeitos sobre os teores de glicerol interno para amostras de fermento de mesma marca, mas de embalagens distintas	54
A) Embalagem 1 - contendo 10 g de fermento seco instantâneo	54
B) Embalagem 2 - contendo 110 g de fermento seco instantâneo	56
4.8.3 - Efeitos sobre a atividade de fermentação na massa de pão	58
A) Quanto ao crescimento da massa (embalagem aberta no instante do ensaio)	58
B) Quanto a evolução de CO ₂ (embalagem aberta no instante do ensaio)	59
C) Quanto ao crescimento da massa (embalagem aberta a 30 dias)	60
D) Quanto a evolução de CO ₂ (embalagem aberta a 30 dias)	61
4.8.4 - Correlação entre viabilidade celular, atividade fermentativa (crescimento de massa e evolução de CO ₂) e teores de glicerol interno	62
A) Embalagem aberta no instante do ensaio	62
B) Embalagem aberta a 30 dias do ensaio	63
5 - CONCLUSÃO	66
6 - PREVISÕES DE APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO	67
REFERÊNCIAS	68
7 - APÊNDICE	71
8 - DADOS EXPERIMENTAIS	74

1 - INTRODUÇÃO

Durante séculos, o pão tem sido o principal alimento nos países ocidentais, por esse motivo a tecnologia da produção de fermentos e formulação de pães tem passado por uma constante evolução através dos tempos (GUGERLI et al., 2004). A variedade de pães e fermentos encontrados no mercado, nos dias de hoje, é bastante grande. O papel da levedura de panificação na indústria de alimentos é de extrema importância e por isto inúmeras publicações sobre a produção de fermentos e fabricação de pães podem ser encontradas na literatura. As células de levedura fermentam açúcar (glicose, frutose, sacarose e maltose) sob condições anaeróbicas produzindo dióxido de carbono, etanol e subprodutos. Assim, a levedura fermenta produzindo e liberando CO₂ que é um dos grandes responsáveis pelo aumento do volume da massa de pão, bem como a formação de produtos secundários que conferem aroma, sabor e a textura desejável ao pão final. A **Figura 1** mostra a via de degradação de glicose ou glicólise que é a responsável pela evolução de CO₂. A fonte de glicose na massa é a maltose resultante da degradação do amido pela β-amilase presente na própria farinha. Nos dias de hoje a levedura de panificação mais utilizada é a do tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar da grande variedade de formas de leveduras encontradas comercialmente a levedura prensada ou levedura úmida ainda é a mais utilizada pelos consumidores. A preferência pela levedura prensada se deve a sua maior atividade de fermentação na massa de pão quando comparada com as demais formas de levedura. Quando se compara a atividade de fermentação da levedura prensada com a atividade da levedura seca fica explícita a superioridade da levedura prensada. Devido ao seu maior poder de fermentação uma quantidade 2-3 vezes menor que a levedura seca é necessária para obtenção do mesmo desempenho. Além disto, poder ser adicionada diretamente à massa sem a necessidade de hidratação prévia como no caso da levedura seca. O melhor desempenho da levedura prensada ocorre pelo fato da mesma possuir maior teor de água intracelular (67-73%) e um teor de proteína relativamente alto (42-56%) (BRONN, 2006). No entanto, trabalhar com a levedura prensada requer certos cuidados. Por exemplo, por se tratar de um material biológico com alto teor de umidade este se torna suscetível a contaminações e por isso deve ser estocado em refrigerador (0-4°C). Este tipo de levedura possui vida de prateleira curta (3-4 semanas). Na tentativa de eliminar o problema da vida de prateleira curta da levedura prensada, a “Gist Brocades” da Holanda fabricou em 1969 a levedura seca instantânea FERMIPAN (BRONN, 2006).

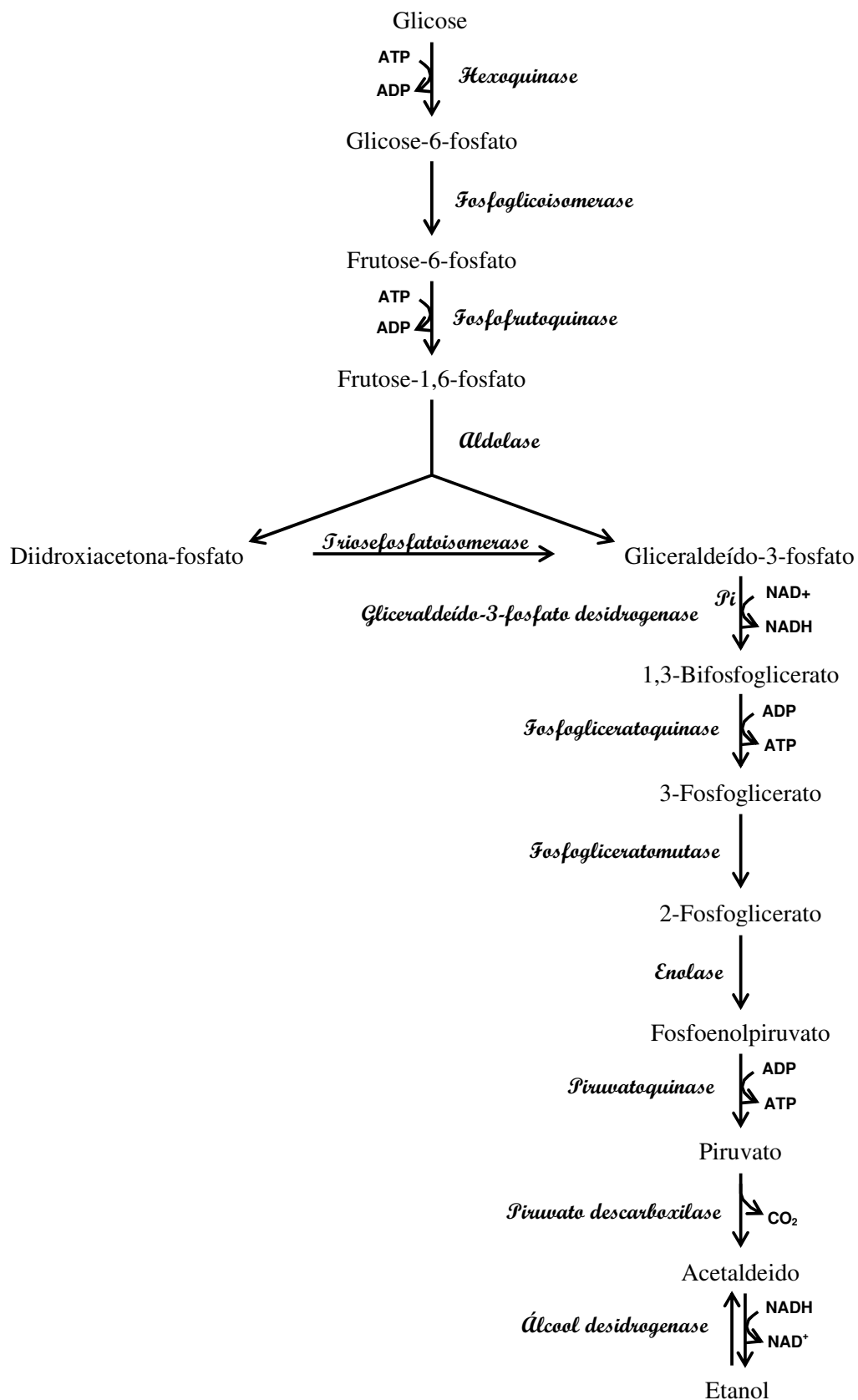


Figura 1 - Via glicolítica ilustrando a produção de CO₂ na fermentação da massa.
 FONTE: Via glicolítica. Disponível em: <<http://www.farmabio3.kit.net/mais.html>>. Acesso em: 01 jul. 2007.

A levedura seca instantânea resulta de secagem em leito fluidizado das células de levedura prensada deixando-as com um teor de água intracelular da ordem de 4-6% após a secagem. Três fases do processo de fabricação e uso da levedura seca instantânea são críticas (secagem, armazenamento e hidratação) para o seu desempenho em panificação. Estas fases podem alterar a estrutura de sua membrana plasmática e levar à perda de viabilidade ou a um desempenho metabólico inferior na massa dos pães. A estabilidade do fermento prensado (armazenado em geladeira) e do fermento seco (armazenado a temperatura ambiente) depende das condições de propagação e estocagem do fermento, bem como da linhagem de levedura utilizada (BÁGUENA et al., 1991). Deficiências de aminoácidos e amônia durante o processo de propagação levam ao acúmulo de SO_2 que é letal a célula (RECONSTITUTION, 2006).

Durante a secagem, as membranas celulares passam por um processo de desorganização da estrutura que pode terminar em ruptura. A cinética de desidratação da levedura prensada para obtenção da levedura seca durante a secagem é de extrema importância. Marechal e Gervais (1994) mostraram a importância da cinética de desidratação para a manutenção da viabilidade da levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*. A desidratação lenta (15-25 min) aumentou a viabilidade quando comparada com a desidratação rápida. Outro fator positivo sobre a viabilidade celular é a realização da desidratação da levedura em presença de açúcar (trealose e sacarose) (LESLIE et al., 1995). Durante a desidratação, a retenção da viabilidade celular está relacionada com a fase de crescimento, porque as células são mais tolerantes a condições de estresse em fase estacionária como é o caso da levedura seca instantânea (GERVAIS et al., 1992). Com o baixo teor de água intracelular obtido através da secagem, as células da levedura seca instantânea podem ser estocadas em seu pacote original (fechado a vácuo) a temperatura ambiente por até dois anos sem perdas de viabilidade.

A reidratação é considerada a fase mais crítica do processo. Uma boa hidratação assegura a obtenção de células com boa viabilidade e características de fermentação (WINE - GROWERS, 2006). As características do fermento seco dependem da cinética e da temperatura de reidratação. A viabilidade celular é também dependente da cinética de reidratação (POIRIER et al., 1999). Recomenda-se que a atividade da água seja mantida na faixa de 0,117-0,455 durante a hidratação e isto não acontece em reidratação rápida. Na prática, recomenda-se o uso de água de reidratação da ordem de 5-10 vezes o peso da levedura (WINE - GROWERS, 2006). Em relação a temperatura de hidratação os dados mais recentes encontrados na literatura recomendam que a levedura deva ser diretamente hidratada (sem hidratação prévia) por 20 min a 37°C (ROUSTAN e SABLAYROLLES, 2002) e/ou por

20 min a 38°C (BELLISSIMI e INGLEDEW, 2004). O fermento não deve ser hidratado abaixo de 35°C e acima de 40°C (YEAST, 2007). A respiração e a fermentação são mais baixas em levedura seca ativa (ADY) quando hidratada a 0°C que no caso da levedura ADY hidratada a 40°C. No entanto, Poirier et al., (1999) observaram aumento da germinação das células após 30 min de hidratação, quando as células foram hidratadas na faixa de temperatura de 9°C - 50°C após desidratação a 25°C. O pH intracelular também influencia a retenção de viabilidade durante o processo de hidratação. A relação entre a viabilidade e o pH intracelular em leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (prensada) foi investigada utilizando células menos viáveis (perda de viabilidade) por estocagem a baixas temperaturas, tratamento com etanol e tratamento térmico. Esse estudo mostra que a viabilidade sobe com o pH intracelular, mas diminuições são observadas com o aumento do etanol do meio (IMAI e OHNO, 1995).

Efeitos das condições de hidratação sobre a morfologia das células - a permeabilidade da membrana aumentou durante a hidratação. Além disso, a membrana da levedura (ADY) previamente hidratada a 0°C não recupera sua permeabilidade, mesmo durante horas a 40°C, porque as membranas celulares a 0°C apresentam estruturas mais desordenadas (PEÑA et al., 1992). Variação da temperatura de hidratação levou a variação na velocidade de fermentação de glicose e esta foi mais rápida com a levedura hidratada a 40°C que a 0°C. A viabilidade aumenta com o aumento da temperatura de hidratação na faixa de 0°C a 40°C (PEÑA et al., 1992). Profundas modificações ocorrem na membrana celular durante a secagem e hidratação, como mostra a microscopia eletrônica (BEKER et al., 1984). A **Figura 2** mostra as mudanças em inclusões celulares que podem ocorrer durante a desidratação e hidratação de células.

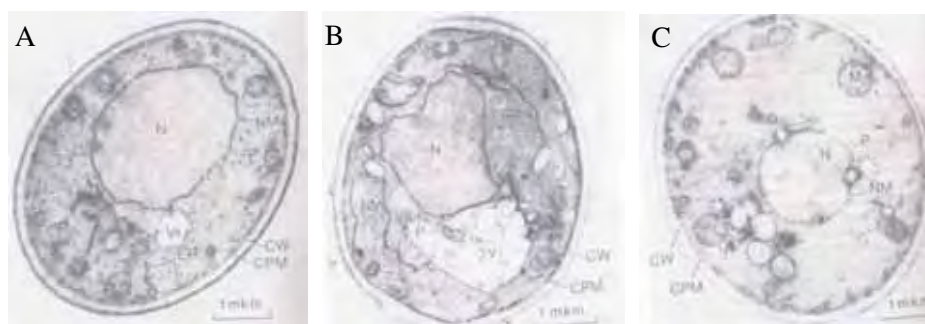


Figura 2 - Microscopia eletrônica de células de *Saccharomyces cerevisiae* (BEKER et al., 1984): **A**, células coletada na fase estacionária; **B**, depois de desidratação por 1,5 h; **C**, célula morta durante desidratação e hidratação.

Efeito de aditivos no processo de fermentação de massas de pães

O papel do glicerol - o glicerol pode ser sintetizado ou consumido pelas células como fonte de carbono. Uma vez dentro das células é convertido por uma quinase (consumo de um ATP) em glicerol-P e, a seguir, é convertido a diidroxiacetona fosfato. A diidroxiacetona fosfato é metabolizada pela via glicolítica. O glicerol é um estabilizante osmótico intracelular, por proteger as estruturas celulares frente a calor e altas concentrações internas de sais. O efeito do glicerol sobre a viabilidade é dependente da sua concentração, diminuindo com o aumento da pressão osmótica (BENEY et al., 2001). O xilitol é outro poliol que mostrou capacidade de estabilizar estruturas durante a secagem de leveduras (KRALLISH et al., 1997).

O papel da trealose - um papel de destaque tem sido atribuído à trealose, em caso da anidrobiose, na qual ocorre redução do metabolismo devido à perda extrema de água (CLEGG, 2001). Teores de trealose da ordem de 20% (peso seco) têm sido descrito para alguns organismos (MADIN e CROWE, 1975). A estabilização de estruturas celulares sob condições de estresse foi atribuída à trealose e duas hipóteses (CROWE et al., 1998) foram propostas para explicar este efeito. Segundo a hipótese da troca pela água, a trealose substituiria a água, formando ligações de hidrogênio com macromoléculas da estrutura celular, preservando assim a estrutura biológica viva durante a secagem. A hipótese da vitrificação propõe que a trealose forma estrutura amorfa durante a secagem que protege as membranas e proteínas por limitar o movimento, agregação de proteínas e difusão de radicais livres. Soubeyrand et al., (2006) verificaram que as variações em concentrações de trealose total (intra e extracelular), durante o processo de hidratação, foram dependentes das linhagens de leveduras ensaiadas. No entanto, correlações entre a viabilidade e a trealose intracelular não foram observadas antes ou após a secagem da levedura (KRALLISH et al., 1997). Estudos sobre a estocagem da levedura prensada em geladeira foram concluídos recentemente (TININIS, 2005) e os dados descrevem que a mobilização da trealose diminuiu durante a estocagem em geladeira e mais ainda durante a estocagem da levedura prensada a -18°C. Em condições ótimas de crescimento o teor de trealose da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser da ordem de 45% (peso seco), como determinado por Van Dijck et al., (1995).

O papel dos ácidos orgânicos fracos e efeitos do pH - os ácidos orgânicos fracos mais envolvidos com a indústria de alimentos são o sórbico, láctico, ascórbico, succínico, málico e cítrico. Mais recentemente, Peres et al., (2005) verificaram que o pré-tratamento das células com solução de ácidos orgânicos fracos, notadamente o ácido cítrico, levaram a um aumento da atividade de crescimento da massa do pão francês quando a levedura pré-tratada e

prensada foi estocada a 30°C por três dias. Notou-se, no mesmo trabalho, acúmulo de glicerol, manutenção de níveis altos de proteínas totais e viabilidade após o pré-tratamento do fermento com solução de ácido cítrico a pH 7,5. Os ácidos orgânicos (aditivos) adicionados às soluções de pré-tratamento antes da estocagem a baixas temperaturas foram os ácidos cítrico, láctico, ascórbico e acético. A atividade fermentativa caiu durante a estocagem em geladeira em todos os casos (com maior intensidade em presença de ácido acético a pH 4,5 e menor grau com ácido cítrico em pH 7,5). O ácido cítrico foi o que melhor protegeu as células contra as perdas em atividade fermentativa, bem como proteólise celular, durante a estocagem. As perdas em viabilidade foram pouco significativas durante a estocagem tanto a 4°C quanto a -18°C. No entanto, em presença de ácidos acético e láctico, os teores de glicerol interno aumentaram sem correspondente aumento em atividade fermentativa (TININIS, 2005).

Uma patente americana (KYOWA et al., 1970) afirma que a adição (0,5% a 10% em peso) de leucina, isoleucina, lisina, glutâmico, fenilalanina e monoglicerídeo aumentaram a atividade de fermentação da massa quando adicionados ao licor de levedura antes da prensagem da levedura úmida e o pão resultante mostrou fragrância superior.

Efeitos dos açúcares - a viabilidade pode ser melhorada durante desidratação com a adição de dissacarídeos tais como maltose (TAN et al., 1995) e sacarose (LESLIE et al., 1995). Alguns autores chegaram a usar meio de cultivo para hidratação ao em vez de água. Poirier et al., (1999) utilizaram um meio malte de Wickerham enriquecido com adição de frutose.

Efeitos dos aminoácidos e outros metabólicos - trabalhos mostraram que citrato de sódio a pH 7,5 (PERES et al., 2005), misturas de ácido cítrico/glutâmico e ácido cítrico/carnitina aumentam a germinação em meios sólidos (VELLOSA, 2006). A atividade de fermentação da massa congelada aumentou durante a estocagem em congelador (TININIS, 2005) com o uso da levedura prensada pré-tratada com a mistura citrulina/glutâmico e ornitina/glutâmico. A betaina protege a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* durante a secagem (KETS e BONT, 1994).

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral: O presente trabalho tem por objetivo estudar o efeito da hidratação do fermento seco instantâneo comercial sobre a atividade de fermentação na massa do pão francês.

Objetivos específicos:

- Comparar os tratamentos aplicados diretamente à levedura seca com os aplicados à levedura após a sua hidratação prévia em água, quanto aos parâmetros de fermentação na massa do pão (variações em volumes e velocidades de evolução de CO₂ e crescimento da massa do pão).
- Estudar o efeito da temperatura durante a hidratação do fermento sobre os parâmetros de fermentação na massa do pão e viabilidade celular.
- Comparar os efeitos de aditivos (aminoácidos, estabilizantes osmóticos, matérias complexas como extrato de levedura) presentes nas soluções de hidratação sobre os parâmetros de fermentação e viabilidade celular.
- Comparar os efeitos dos melhores aditivos na hidratação do fermento sobre a fisiologia das células (glicerol interno).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Leveduras

Os seguintes fermentos foram utilizados: **fermento biológico seco instantâneo Fermix** (embalagem contendo 10g não embalada a vácuo) fabricado na Holanda por “DSM Bakery Ingredients”; **fermento biológico seco instantâneo Fermix** (embalagem contendo 10g não embalada a vácuo) fabricado no Chile pela “Gist Brocades”; **fermento biológico seco instantâneo Fermix** (embalagem contendo 10g não embalada a vácuo e embalagem contendo 110g embalada a vácuo) fabricado em Istambul, Turquia por “PAK GIDA”.

3.2 - Formas de hidratação do fermento seco, realizadas antes da medida da atividade de fermentação (variação do volume da massa e evolução de CO₂) na massa do pão francês

3.2.1 - Hidratação direta do fermento seco

Suspendeu-se 0,5g de fermento seco em 10,0 mL de água destilada ou em soluções de aditivos e a suspensão foi incubada (agitação periódica) em temperaturas e tempos variáveis (até 120 min) conforme necessidade do experimento. Ao final das incubações, volumes da suspensão de células contendo 0,15g de levedura seca foram pipetados (com uma pipeta de líquido viscoso) e em seguida centrifugados a temperatura ambiente (5 min a 3000 rpm) para coleta de células a serem analisadas. A massa de células foi imediatamente resuspensa em 6,2 mL de água e usada no preparo da massa do pão.

3.2.2 - *Lavagem do fermento com água a temperatura ambiente seguida de tratamento por 20 min com solução de citrato*

O fermento seco foi previamente hidratado em água por 15 min a temperatura ambiente (28,8°C), como descrito no item 3.2.1. Logo após a hidratação prévia, o fermento foi lavado duas vezes com água e resuspenso em solução de citrato (também a temperatura ambiente). O ensaio foi realizado com o ajuste do pH da suspensão de células a 7,5 e sem o ajuste do pH (pH 6,9 da suspensão celular sem ajuste). A hidratação com citrato deu-se por 20 min antes da centrifugação (5 min a 3000 rpm) e resuspensão das células em água (6,2 mL) para adição a massa de pão nos ensaios de panificação.

3.2.3 - Choque térmico aplicado por 15 min a 43°C a células suspensas em soluções de citrato

O fermento seco foi diretamente hidratado em solução de citrato por 30 min a temperatura ambiente (23-26°C), como descrito no item 3.2.1. Em seguida, após a hidratação a temperatura ambiente, a suspensão de fermento em citrato foi submetida a um choque térmico de 43°C por 15 min antes da centrifugação (5 min a 3000 rpm) e resuspensão em água (6,2 mL) para adição à massa. A temperatura utilizada para o choque térmico (43°C) foi escolhida por ser considerada suficientemente alta, uma vez que as células estavam a temperatura ambiente.

3.2.4 - Tratamentos com soluções de aditivos por 20 min a 37°C após hidratação prévia e lavagem com água a temperatura ambiente

O fermento seco foi previamente hidratado em água por 15 min a temperatura ambiente (24°C), como descrito no item 3.2.1, lavado por duas vezes com água e resuspenso em soluções de aditivos por 20 min a 37°C antes da centrifugação (5 min a 3000 rpm) e resuspensão em água (6,2 mL) para adição à massa.

3.3 - Medida da atividade de fermentação na massa de pão

Porções de massa de pão (pão francês) foram preparadas para conter inicialmente 10,0g de farinha, 0,2g de cloreto de sódio, 6,2 mL de água e 0,1g de levedura prensada pré-tratada (MURAKAMI et al., 1996). A massa de pão resultou da mistura dos ingredientes em um almofariz e de forma manual utilizando-se luvas. A massa foi rapidamente transferida para um cilindro graduado de boca larga. Este cilindro foi hermeticamente fechado e o CO₂ liberado da massa passou por um frasco contendo solução saturada de sal (100 mL). A passagem do CO₂ forçou a saída da solução saturada de sal para um cilindro graduado (**Figura 3**). A medida do volume da solução salina no cilindro foi proporcional ao volume de CO₂ liberado da massa. Depois da adição da massa ao cilindro de boca larga, a evolução de CO₂ foi acompanhada por 3 horas a 32°C, conforme procedimento em rotina em nosso laboratório (BURROWS e HARRISON, 1959; PERES, 2001). No presente trabalho, 0,1g a 0,3g de fermento seco foram utilizados. Os volumes finais de massa e CO₂ aparecem nos

resultados. As velocidades resultaram de regressão linear das curvas de tempo da variação do volume da massa e evolução de CO₂. As velocidades de crescimento de massa e evolução de CO₂ foram calculadas através de regressão linear e expressa em mililitros de massa ou CO₂ por minuto de fermentação (mL.min⁻¹), enquanto que as medidas dos volumes de massa e evolução de CO₂ foram expressas em mililitros (mL) de massa ou CO₂.

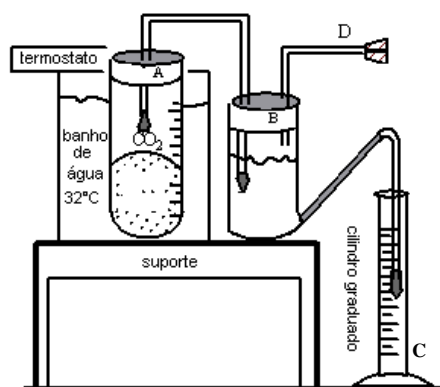


Figura 3 - Dispositivo usado para medida do crescimento da massa e evolução de CO₂ da massa de pão: frasco para a fermentação da massa (A); frasco contendo solução saturada de NaCl (B); cilindro graduado (C) para coletar a solução de NaCl expelida pelo gás proveniente do frasco A; tubo lateral (D) para adição da solução de sal ao frasco B.

3.4 - Determinação da quantidade de fermento para utilização nos ensaios da ativação da fermentação na massa de pão

Suspendeu-se 0,5g de fermento seco em água por 10 min a temperatura ambiente (27,6°C), como descrito no item 3.2.1, pipetou-se volumes contendo diferentes quantidades de fermento (0,1g, 0,2g e 0,3g) e centrifugou-se (5 min a 3000 rpm) as amostras antes da resuspensão em água (6,2 mL) para adição à massa. A atividade de fermentação na massa do pão foi medida como descrito no item 3.5.

3.5 - Ensaio da viabilidade celular da levedura seca

3.5.1 - Hidratação da levedura seca comercial para ensaio da viabilidade - suspendeu-se 0,05g de levedura seca em 10,0 mL de água destilada ou em soluções de aditivos e incubou-se as suspensões de células em temperaturas e tempos variáveis (até 120 min) antes do plaqueamento em meio sólido. Uma quantidade de fermento dez vezes menor (0,05g) que a utilizada nos ensaios de atividade fermentativa foi utilizada nos ensaios de viabilidade celular na tentativa de minimizar os erros, proporcionados pelo número de diluições realizadas nesse ensaio (viabilidade celular), frente aos resultados.

3.5.2 - *Plaqueamento para medida da viabilidade* - as suspensões de células foram contadas em câmara de Neubauer após diluições de 10 vezes. Um volume da suspensão diluída 15.000 vezes, contendo 400 colônias, foi inoculado em placas petri (meio YPD). Após 2-3 dias a 30°C foram realizadas as contagens de colônias e o número de viáveis foi calculado e expresso em cfu.mL⁻¹ (unidade formadora de colônias/mL) da suspensão diluída. Cada célula semeada na placa resulta em uma colônia.

3.6 - Tratamento do fermento seco com soluções de aditivos a 37°C para determinação dos teores de glicerol interno das células

O fermento seco foi hidratado (como descrito no item 3.2.1) a 37°C, com soluções de aditivos, por tempos variáveis como exigido pelo experimento. Após hidratação centrifugou-se a 4°C (5 min a 6000 rpm) uma alíquota contendo 0,1g de fermento, que foi suspensa em 1,0 mL de água destilada, sendo a suspensão transferida para tubos de 10,0 mL, com tampa e de fundo chato, contendo 1,0g de esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro. A suspensão foi congelada em congelador por aproximadamente 3 horas antes da lise mecânica das células. A lise das células se deu por agitação mecânica dos tubos durante 4 ciclos de 30 segundos de agitação em agitador de tubos (modelo Rx³; marca VELP SCIENTIFICA). A seguir, a determinação dos teores de glicerol interno foi realizada como descrito no item 3.7.

3.7 - Medida dos teores de glicerol interno

O glicerol interno foi ensaiado utilizando um Kit de dosagens de triglicéride 120 - TRIE 4111, fabricado por Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios LTDA-Goiânia. Este Kit é baseado na utilização da glicerol quinase e da glicerol fosfato oxidase que convertem o glicerol em diidroxicetona e H₂O₂. A água oxigenada na presença de 4-clorofenol, 4-aminoantipirina e sob ação da enzima peroxidase origina um produto de coloração avermelhada (4-antipirilquinonimina), cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de glicerol na amostra. A medida foi feita em espectrofotômetro com absorção máxima a 510nm. A curva analítica do ensaio do glicerol encontra-se descrita na **Figura 4**.

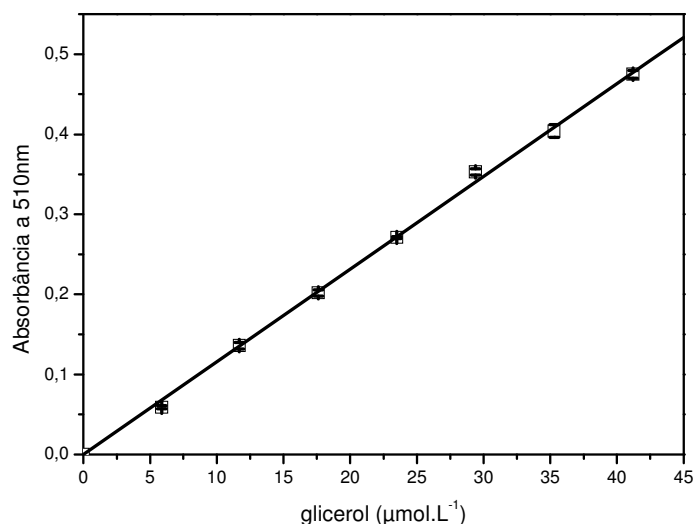


Figura 4 - Curva analítica do glicerol.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - A heterogeneidade da levedura comercial seca

A levedura comercial seca é um material biológico muito heterogêneo. A **Figura 5** mostra um plaqueamento realizado com a levedura seca após hidratação em água. Uma grande heterogeneidade entre as colônias pode ser observada. Esta diversidade pode estar relacionada com o estresse proporcionado ao microorganismo durante o processo de estocagem. Durante a estocagem (até dois anos a temperatura ambiente) este tipo de fermento (levedura seca) possui um teor de água intracelular (4-6%) muito baixo (BRONN, 2006). Esse teor de água intracelular baixo pode, possivelmente, causar a heterogeneidade observada entre as colônias como resposta ao estresse. Por outro lado, durante a secagem a levedura é submetida a temperaturas ao redor de 35°C (BRONN, 2006), elevadas o suficiente para desidratá-la com menor perda em viabilidade. No entanto, o aumento da temperatura provoca um estresse sobre o microorganismo, que também pode ser o possível causador da heterogeneidade observada entre as colônias. O tempo de maturação das células também deve ser levado em conta quando se trata da heterogeneidade celular, uma vez que as células embaladas para comercialização podem ser tanto células mãe quanto brotos.

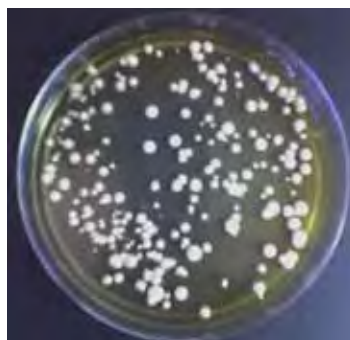


Figura 5 - Heterogeneidade do fermento biológico seco distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA”.

4.2 - Ensaio da atividade de fermentação da massa: efeito da quantidade de fermento seco hidratado por 10 min a temperatura ambiente

As **Tabelas 1** (variação em volume de massa) e **2** (variação em volume de CO₂) mostram os efeitos da quantidade de fermento seco, hidratado por 10 min a temperatura ambiente (27°C), sobre a atividade fermentativa da massa de pão francês. O tempo de hidratação (10 min) foi escolhido por ser suficiente para formação e manutenção de uma suspensão de células homogênea a temperatura ambiente (27°C) e por não requerer aquecimento. Apesar da literatura recomendar a hidratação direta do fermento seco por 15-20 min a 37°C (ROUSTAN e SABLAYROLLES, 2002), neste primeiro instante a intenção era somente comparar os efeitos das quantias de fermento seco sobre os parâmetros fermentativos (crescimento de massa e evolução de CO₂) para selecionar a quantidade mais adequada para dar início aos trabalhos. As **Tabelas 1** e **2** mostram que o aumento da quantidade de fermento causou variações tanto em volume de massa quanto em evolução de CO₂, sendo obtidos maiores volumes de massa (34,0 ± 2,0 mL/150 min de fermentação), para a massa que continha maior quantidade de fermento (0,3g). No entanto, quanto ao volume da evolução de CO₂ a massa que continha 0,2g de fermento seco apresentou maior valor (78,0 ± 6,1 mL/180 min de fermentação). Resultados surpreendentes com o aumento da quantidade de fermento na massa do pão foram obtidos. A massa que continha maior quantidade de fermento seco (0,3g) apresentou decréscimo tanto em velocidade de crescimento da massa (44%) quanto em velocidade de evolução de CO₂ (29%), em relação à massa de referência que continha menor quantidade de fermento seco (0,1g). Variações nos parâmetros fermentativos também foram observadas quando a farinha, da mesma marca (Renata), mas de embalagens distintas, foi utilizada. Decréscimos em volume final de massa (16% após 180 min de fermentação) e volume final de evolução de CO₂ (6% após 180 min de

fermentação) foram observados em relação ao ensaio de massa que continha 0,1g de fermento. Essas variações obtidas sobre os parâmetros fermentativos para as massas de pão contendo farinha de embalagens distintas podem possivelmente estarem relacionadas com a forma que a massa foi maçada e não com a farinha utilizada, uma vez que este processo foi totalmente manual tornando impossível uma padronização do mesmo. Acredita-se que com a padronização da forma de maçar a massa resultados mais confiáveis poderiam ser obtidos.

Tabela 1 - Efeito da quantidade de fermento seco hidratado em água por 10 min a temperatura ambiente (27,6°C) sobre a velocidade de crescimento da massa e o volume final da massa.

Fermento (g/g) ^(a)	Massa do pão				
	Velocidade do crescimento da massa			Volume final da massa	
	(mL/min) x 10 ⁻²	(mL/min/g)	Valores relativos	Tempo de fermentação (min)	mL
0,1	27,0 ± 1,4	2,7 ± 0,14	1,00	150	29,0 ± 3,2
				180	32,0 ± 4,5
0,2	36,1 ± 2,2	1,8 ± 0,11	0,67	150	32,0 ± 2,0
				180	30,0 ± 2,0
0,3	45,4 ± 5,8	1,5 ± 0,19	0,56	150	34,0 ± 2,0
				180	28,0 ± 4,5
0,1*	18,0 ± 0,8	1,8 ± 0,08	0,67	150	24,0 ± 4,5
				180	27,0 ± 5,8

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA"; ^(a) gramas de fermento/10 gramas de farinha conforme a formulação de massa proposta por Murakami et al., (1996); * 0,1g de fermento seco ensaiado com 10g de farinha da mesma marca (Renata), mas de embalagem diferente.

Tabela 2 - Efeito da quantidade de fermento seco hidratado em água por 10 min a temperatura ambiente (27,6°C) sobre a velocidade da evolução de CO₂ e o volume final da evolução de CO₂.

Fermento (g/g) ^(a)	Evolução do CO ₂				
	Velocidade da evolução de CO ₂			Volume final da evolução de CO ₂	
	(mL/min) x 10 ⁻²	(mL/min/g)	Valores relativos	Tempo de fermentação (min)	mL
0,1	34,5 ± 0,4	3,5 ± 0,04	1,00	150	52,0 ± 5,4
				180	62,5 ± 5,2
0,2	51,0 ± 1,1	2,6 ± 0,06	0,74	150	65,0 ± 5,0
				180	78,0 ± 6,1
0,3	76,0 ± 0,9	2,5 ± 0,03	0,71	150	68,0 ± 5,0
				180	72,5 ± 7,1
0,1*	31,3 ± 1,0	3,1 ± 0,03	0,89	150	48,5 ± 3,5
				180	59,0 ± 3,2

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA"; ^(a) gramas de fermento/10 gramas de farinha conforme a formulação de massa proposta por Murakami et al., (1996); * 0,1g de fermento seco ensaiado com 10g farinha da mesma marca (Renata), mas de embalagem diferente.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o aumento da quantidade de fermento proporcionou variações nos volumes de CO₂ e nos volumes de massa, bem como, quedas nas velocidades de evolução de CO₂ e crescimento da massa. Em relação aos parâmetros fermentativos observou-se que variações também foram obtidas quando amostras de farinha (mesma marca) de embalagens distintas foram utilizadas. Quanto a determinação da quantidade de fermento a ser utilizada nos ensaios de fermentação na massa do pão, decidiu-se utilizar 0,15-0,20g por ter sido a quantidade que apresentou maior evolução de CO₂.

4.3 - Ensaios preliminares baseados em melhoramentos conseguidos para a levedura úmida: efeitos sobre a atividade fermentativa de tratamentos aplicados ao fermento previamente hidratado em água (15 a 30 min) a temperatura ambiente (23 a 28,8°C)

Estes ensaios foram realizados para verificar se a levedura seca responderia aos tratamentos assim como a levedura prensada (PERES et al., 2005). Admitindo-se a possibilidade de se conseguir alguma melhora da levedura com algum pré-tratamento já seria uma vantagem. A hidratação prévia do fermento seco foi inicialmente realizada a temperatura ambiente, apesar da literatura recomendar a hidratação direta (15-20 min) a 37°C (ROUSTAN e SABLAYROLLES, 2002), na tentativa de tornar o processo mais prático por não requerer aquecimento.

4.3.1 - Lavagem do fermento com água a temperatura ambiente seguido por tratamento por 20 min com solução de citrato a pH 6,9-7,5

A **Tabela 3** compara os efeitos da hidratação prévia (hidratação em água por 15 min a 28,8°C) e lavagem (duas lavagens com água) do fermento quando hidratado em solução de citrato 0,15 mol.L⁻¹ com e sem ajuste do pH a 7,5 das suspensões de células. Um controle, no qual as células foram diretamente hidratadas em água (sem hidratação prévia e lavagem), foi usado como referência. A hidratação com água, das células previamente hidratadas e lavadas, permitiu um aumento em volume de massa da ordem de 12%, enquanto que a hidratação das células com solução de citrato a pH 6,9 permitiu elevar o crescimento da massa para 21%. O pH 6,9 da suspensão de células favoreceu o crescimento da massa (21%), enquanto o pH 7,5 favoreceu a evolução de CO₂ (28%). Assim, o tratamento com solução de citrato a pH 7,5, respondeu conforme esperado (PERES et al., 2005), ou seja, com a melhora do fermento. Seria conveniente comparar este resultado com a hidratação recomendada na literatura, ou seja, a 37°C (ROUSTAN e SABLAYROLLES, 2002) e num mesmo experimento. O simples fato de realizar uma hidratação prévia do fermento seco seguida de lavagem com água, na

tentativa de torná-lo mais semelhante possível ao fermento úmido, permitiu obter um aumento em volume de massa devido a regeneração da estrutura celular e a retirada parcial de possíveis aditivos industriais devido a lavagem. Contudo, o tratamento posterior do fermento seco previamente hidratado em água, com soluções de citrato 0,15 mol.L⁻¹ a pH 6,9 e 7,5 levaram a melhoras em evolução de CO₂ e crescimento de massa. A elevação do pH favorece o acúmulo de glicerol interno e reduz a necessidade da extrusão de prótons (PERES et al., 2005).

Tabela 3 - Efeitos do tratamento por 20 min em solução de citrato aplicado a células previamente hidratadas por 15 min a temperatura ambiente (28,8°C) e seguido por lavagem em água (duas vezes).

Soluções hidratantes	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,2g fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,2g fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
		mL	Valores Relativos		mL	Valores Relativos
Água a pH 7,5 (hidratação por 35 min sem lavagem após hidratação)	27,6 ± 1,0	24,0 ± 4,5	1,00	32,1 ± 1,6	48,5 ± 2,6	1,00
Água (a pH 7,5)	24,8 ± 2,1	27,0 ± 3,2	1,12	27,4 ± 0,5	49,0 ± 4,1	1,01
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹ a pH 6,9)	27,6 ± 1,0	29,0 ± 3,2	1,21	35,6 ± 1,4	56,0 ± 1,0	1,15
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹ a pH 7,5	20,9 ± 2,5	27,0 ± 2,0	1,12	33,6 ± 0,5	62,0 ± 5,4	1,28

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido na Holanda por "DSM Bakery Ingredients".

4.3.2 - Choque térmico aplicado por 15 min a 43°C a células suspensas em soluções de citrato com aumento na concentração do citrato

A **Tabela 4** mostra os efeitos da concentração da solução de citrato a pH 7,5, utilizada no tratamento térmico (15 min a 43°C) aplicado após a hidratação prévia (hidratação em água por 30 min a temperatura ambiente: 23°C) do fermento seco. O choque térmico a 43°C quando aplicado as células em presença de solução de citrato 0,2 mol.L⁻¹ proporcionou um decréscimo de 13% em relação ao volume final de massa quando comparado com o fermento suspenso em solução de citrato 0,1 mol.L⁻¹. No entanto, este efeito não foi observado frente a evolução de CO₂, a qual não apresentou variações significativas. O incremento em volume de massa obtido com a hidratação do fermento seco (previamente hidratado com água por 15 min a temperatura ambiente e lavado duas vezes com água) com solução de citrato

0,15 mol.L⁻¹ e sem choque térmico foi superior (aumento de 21%) quando comparado com o controle (hidratação direta por 35 min em água) (**Tabela 3**). Comparando-se os valores das **Tabelas 3** (sem choque térmico) e **4** (com choque térmico) tem-se variações em volumes de massas pouco significativas, exceto quando o fermento foi submetido ao tratamento térmico (15 min a 43°C) em presença de citrato 0,1 mol.L⁻¹ (**Tabela 4**). Neste caso o volume de massa (31,0 ± 3,2 mL) foi superior.

Tabela 4 - Efeito do choque térmico a 43°C por 15 min quando aplicado a suspensão de células hidratadas por 30 min a 23°C em soluções de citrato a pH 7,5.

Soluções hidratantes	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
		mL	Valores Relativos		mL	Valores Relativos
Citrato 0,10 mol.L ⁻¹	31,4 ± 2,1	31,0 ± 3,2	1,00	33,8 ± 1,5	55,5 ± 1,6	1,00
Citrato 0,20 mol.L ⁻¹	24,8 ± 2,1	27,0 ± 3,2	0,87	31,7 ± 1,9	53,5 ± 1,6	0,96

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido na Holanda por "DSM Bakery Ingredients".

Após verificar que o choque térmico em presença de citrato 0,1 mol.L⁻¹ foi melhor do que com citrato 0,2 mol.L⁻¹ frente a atividade de fermentação (**Tabela 4**), decidiu-se comparar os efeitos, sobre a atividade fermentativa, obtidos com e sem choque térmico, utilizando uma solução de citrato na concentração de 0,1 mol.L⁻¹. A **Tabela 5** mostra que o choque térmico aplicado as células suspensas em solução de citrato 0,1 mol.L⁻¹ a pH 7,5 apresentou uma melhora da ordem de 15% em crescimento de massa em relação ao fermento, também suspenso em solução de citrato 0,1 mol.L⁻¹, mas que não foi submetido ao tratamento térmico. Os resultados apresentados nesta última tabela mostram também que a melhora na atividade fermentativa ocorreu devido a exposição ao calor e não ao tratamento com citrato, uma vez que uma amostra (controle) também reidratada com citrato, mas não submetida ao choque térmico apresentou volume de massa inferior (15%). Isto pode estar relacionado com a síntese de proteínas de choque térmico ou HSPs (Heat Shock Proteins) que ocorre em diversas situações de estresse no interior das células. Variações em volume de CO₂ não foram observadas.

Tabela 5 - Comparação entre amostras de fermento tratadas com e sem choque térmico a 43°C aplicado a suspensão de células hidratada por 30 min a 26°C em solução de citrato 0,10 mol.L⁻¹ a pH 7,5.

Soluções hidratantes	Choque a 43°C (min)	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
		Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
			mL	Valores relativos		mL	Valores relativos
Citrato ^(a) 0,10 mol.L ⁻¹	0	19,7 ± 2,0	26,0 ± 4,5	1,00	31,0 ± 0,5	57,0 ± 3,0	1,00
Citrato ^(b) 0,10 mol.L ⁻¹	15	25,4 ± 3,1	30,0 ± 2,8	1,15	30,3 ± 0,3	55,0 ± 4,1	0,97

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido na Holanda por "DSM Bakery Ingredients"; ^(a) hidratação por 45 min a temperatura ambiente; ^(b) hidratação por 30 min a temperatura ambiente seguida por tratamento térmico a 43°C por 15 min.

4.3.3 - Tratamentos com soluções de aditivos a 37°C após hidratação (por 15 min) e lavagem com água a temperatura ambiente

A **Tabela 6** descreve o tratamento do fermento seco, previamente hidratado (em água por 15 min a temperatura ambiente: 24°C) e lavado (duas vezes em água), com soluções de aditivos (citrato, glicose e extrato de levedura) por 20 min a 37°C. Considerando apenas a evolução de CO₂ o único aditivo que apresentou melhora foi o extrato de levedura 2% (16% de aumento). Na **Tabela 8**, observa-se que o fermento seco hidratado diretamente a temperatura ambiente em extrato de levedura 2% apresentou um aumento em volume final de CO₂ semelhante (12%) ao obtido com o fermento previamente hidratado, seguido por lavagem com água e, por fim, tratado com solução de extrato de levedura. Assim, a hidratação do fermento previamente hidratado e lavado com água seguido por tratamento com solução de extrato de levedura 2% (**Tabelas 6**) não levou a ganhos em atividade fermentativa quando comparados com os dados da **Tabelas 8**. Tanto para o ensaio da **Tabela 6** quanto para o da **Tabela 8** não foram observadas variações positivas frente ao crescimento da massa em relação ao controle (água pura).

Quando as variações em volumes de massa e CO₂ foram comparadas (em relação ao controle), concluiu-se que os melhores resultados (21% em volume de massa e 28% em volume de CO₂) foram obtidos quando a levedura hidratada e lavada em água a temperatura ambiente passou por tratamento com solução de citrato (pH 6,9-7,5) também a temperatura ambiente (**Tabela 3**). No entanto, quando se compara os volumes de massa e CO₂ mostrados nas **Tabelas 3-6** tem-se, em ambos os casos, o maior volume de massa e um maior volume de CO₂, como se pode ver, na **Tabela 6** (hidratação da levedura seca, previamente hidratada por 15 min a temperatura ambiente e lavada com água, com soluções de aditivos por 20 min a 37°C). Sendo o maior volume de massa (34,0 ± 2,0 mL: controle) obtido após hidratação com

água e o maior volume de CO₂ (81,0 ± 4,5 mL: 16% em relação ao controle) obtido após hidratação com extrato de levedura 2%.

Tabela 6 - Hidratação da levedura seca, previamente hidratada por 15 min a 24°C e lavada com água, com soluções de aditivos por 20 min a 37°C.

Soluções hidratantes	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,15 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,15 g fermento)	
		mL	Valores Relativos		mL	Valores Relativos
Água* (pH 4,2)	30,5 ± 0,9	34,0 ± 2,0	1,00	38,9 ± 0,4	70,0 ± 2,2	1,00
Citrato* 0,15 mol.L ⁻¹ (pH 5,7)	26,7 ± 2,1	31,0 ± 3,2	0,91	36,9 ± 0,6	67,5 ± 2,9	0,96
Glicose* 0,5% (pH 2,9)	28,9 ± 1,4	30,0 ± 2,0	0,88	39,8 ± 0,4	71,0 ± 7,3	1,01
Extrato de levedura* 2% (pH 4,9)	25,4 ± 1,7	31,0 ± 1,4	0,91	43,5 ± 0,8	81,0 ± 4,5	1,16

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido no Chile por "Gist Brocades"; * sem ajuste do pH da suspensão de células.

Os resultados obtidos sobre a levedura seca previamente hidratada permitem concluir que o pH 6,9 da suspensão de células em solução de citrato 0,15 mol.L⁻¹ favoreceu o crescimento da massa, enquanto que a elevação do pH da suspensão para pH 7,5 favoreceu a evolução de CO₂. Quanto ao choque térmico (43°C) em presença de solução de citrato 0,1 mol.L⁻¹ obteve-se aumento em volume de massa e perda do efeito do citrato sobre a evolução de CO₂. Em relação ao tratamento das células (previamente hidratadas e lavadas em água) com aditivos a 37°C somente a solução de extrato de levedura 2% apresentou melhora frente aos parâmetros fermentativos (evolução de CO₂).

4.4 - Hidratação direta do fermento seco com soluções de aditivos a temperatura ambiente (24,6°C a 26,1°C) por 40 min sobre a atividade fermentativa

A hidratação direta do fermento seco a temperatura ambiente foi realizada com o objetivo de simplificar o processo de hidratação (evitar a elevação da temperatura). O tempo de hidratação de 40 min foi selecionado com base em um experimento descrito bem mais a frente (**Figura 7**), pois nesta temperatura as variações em evolução de CO₂ e volume de massa foram insignificantes até 40 min de hidratação a 27°C. A escolha desse tempo de hidratação facilitaria a observação de uma possível melhora, proporcionada por algum dos

aditivos utilizados, sobre os parâmetros fermentativos ensaiados (crescimento de massa e evolução de CO₂). O tempo ótimo de hidratação poderia já ter propiciado os melhores volumes de massa e CO₂ e com isso, poderia dificultar a visualização de possíveis melhoras ocasionadas pelos aditivos.

4.4.1 - Hidratação direta do fermento seco, com soluções de aditivos por 40 min a temperatura ambiente (26,1°C), sobre a atividade fermentativa

Os aditivos ensaiados em um mesmo experimento foram glicose, ácido glutâmico, extrato de levedura (composto rico em proteínas e aminoácidos), ergosterol associado ao tween 80 (protetor osmótico) e citrato. Considerando a evolução de CO₂, somente a adição de glicose teve efeito durante a hidratação do fermento seco (**Tabela 7**). Aumentos em evolução de CO₂ da ordem de 33% e 38% foram obtidos com a adição de glicose 2,0% e 0,5%, respectivamente. Esses aumentos em volumes de CO₂ podem estar relacionados com o fato da glicose (utilizada para a hidratação das células) ser uma fonte de carbono e isso pode ter estimulado a via glicolítica proporcionando uma fermentação mais eficiência e conseqüentemente uma maior liberação de CO₂. Apesar de a glicose extracelular (utilizada para hidratação do fermento) ter sido retirada antes da adição do fermento a massa, tem-se que durante o processo de hidratação parte desse açúcar deve ter sido assimilado pela célula (glicose intracelular) proporcionando o possível estímulo a via glicolítica. Teoricamente quanto maior a evolução de CO₂ maior o volume da massa, no entanto os dados obtidos após hidratação com glicose mostram que na prática nem sempre isto acontece, ou seja, a glicose proporcionou aumentos em evolução de CO₂ (em relação ao controle) enquanto os volumes de massa não apresentaram variações significativas. Portanto conclui-se que o crescimento de massa também está relacionado com a capacidade da massa em reter o CO₂ liberado durante o processo fermentativo e não somente com o volume de CO₂ liberado. As soluções de citrato também mostraram melhoras, sobretudo em crescimento de massa, as quais foram independentes do pH (na faixa de 6,9 a 7,5). Aumentos em crescimento de massa da ordem de 29% e 25% foram obtidos para a hidratação com soluções de citrato a pH 6,9 e 7,5, respectivamente. Isto pode estar relacionado com o fato do citrato estar predominantemente dissociado nesta faixa de pH (6,9-7,5) reduzindo a atividade da via glicolítica necessária a extrusão de prótons (consome ATP) durante o tratamento (PERES et al., 2005). Assim, a solução de glicose favoreceu a evolução de CO₂, enquanto que a solução de citrato favoreceu o crescimento da massa. Em trabalho anterior, a solução de citrato mostrou ser o melhor aditivo, quanto a melhora dos parâmetros fermentativos, quando aplicado á levedura prensada (PERES et al., 2005). No trabalho citado, aumentos na evolução de CO₂ foram observados após três dias de incubação a 30°C.

Ácido glutâmico 0,008 mol.L⁻¹ a pH 4,6, extrato de levedura 0,2% (m/v) a pH 5,2, glicerol 2,0% (v/v) a pH 4,7 e mistura de ergosterol 0,004%, (m/v) e tween 80 0,4%, (v/v) a pH 4,3 foram ensaiados, mas não levaram a melhoras significativas frente aos parâmetros fermentativos.

A solução de glicose favoreceu a evolução de CO₂, enquanto que a solução de citrato favoreceu o crescimento de massa. O tratamento com solução de glicose 0,5% merece uma curva de tempo completa mostrando as variações em viabilidade, evolução de CO₂ e crescimento de massa.

Tabela 7 - Efeitos da hidratação do fermento seco por 40 min a 26,1°C, com soluções de aditivos, frente à atividade fermentativa da massa de pão francês.

Soluções de aditivos	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,2g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
		mL	Valores Relativos		mL	Valores Relativos
Água (pH 4,8) (controle)	32,6 ± 1,6	28,5 ± 2,6	1,00	34,9 ± 0,6	40,5 ± 6,5	1,00
Glicose 0,5% m/v (pH 3,8)	31,5 ± 1,6	29,5 ± 2,7	1,04	39,1 ± 0,7	56,0 ± 4,6	1,38
Glicose 2,0% m/v (pH 3,2)	29,3 ± 0,7	29,5 ± 0,0	1,04	32,3 ± 1,1	53,7 ± 3,7	1,33
Ácido glutâmico 0,008 mol.L ⁻¹ (pH 4,6)	30,4 ± 0,7	27,5 ± 1,9	0,97	29,6 ± 0,7	38,6 ± 4,8	0,95
Extrato de levedura 0,2% m/v (pH 5,2)	30,4 ± 0,7	27,5 ± 1,9	0,97	25,1 ± 0,8	38,1 ± 4,4	0,94
Glicerol 2,0% v/v (pH 4,7)	27,1 ± 0,0	26,5 ± 1,4	0,93	24,3 ± 0,6	37,2 ± 3,3	0,92
Ergosterol 0,004% m/v						
Tween 80 0,4% v/v (pH 4,3)	1,4 ± 0,7	27,5 ± 2,7	0,97	23,6 ± 0,3	37,2 ± 1,5	0,92
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹ (pH 6,9)	38,3 ± 1,0	36,5 ± 1,4	1,29	39,5 ± 0,8	42,6 ± 4,1	1,05
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹ (pH 7,5)	36,4 ± 1,4	35,5 ± 0,0	1,25	40,0 ± 1,8	45,6 ± 3,5	1,13

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido na Holanda por "DSM Bakery Ingredients".

4.4.2 - Efeitos da concentração do extrato de levedura sobre a atividade de fermentação do fermento seco hidratado por 40 min a temperatura ambiente

Na **Tabela 8**, os fermentos hidratados por 40 min a temperatura ambiente (24,6°C) em soluções de extrato de levedura 1% e 2% levaram a aumentos em evolução de CO₂ da ordem de 8% e 12%, respectivamente. Por outro lado, o efeito sobre o crescimento da massa não foi significativo. O extrato de levedura 0,2% não proporcionou variações significativas frente aos parâmetros fermentativos confirmando o dado mostrado na **Tabela 7**.

Tabela 8 - Hidratação direta da levedura seca por 40 min a 25,2°C com soluções de Extrato de levedura.

Soluções hidratantes	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
		mL	Valores relativos		mL	Valores Relativos
Água ^(*) (pH 4,3)	26,0 ± 1,6	31,0 ± 1,41	1,00	33,3 ± 0,9	59,5 ± 2,55	1,00
Extrato de levedura ^(*) 0,2% (pH 4,4)	27,3 ± 0,8	27,0 ± 5,83	0,87	33,7 ± 1,2	59,0 ± 2,24	0,99
Extrato de levedura ^(*) 1% (pH 4,8)	26,4 ± 0,8	30,0 ± 2,00	0,97	33,0 ± 0,8	64,5 ± 3,54	1,08
Extrato de levedura ^(*) 2% (pH 5,0)	25,4 ± 1,7	28,0 ± 0,00	0,90	32,5 ± 1,3	66,5 ± 3,54	1,12

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido no Chile por "Gist Brocades"; ^(*) sem ajuste do pH da suspensão de células.

4.4.3 - Efeitos do ajuste do pH das suspensões de células para pH 7,5 contendo soluções de extrato de levedura sobre a atividade de fermentação do fermento seco hidratado

A **Tabela 9** mostra os efeitos do ajuste do pH das suspensões de células para 7,5 do fermento hidratado com soluções de extrato de levedura 1% por 40 min a 24,6°C. O fermento seco hidratado em solução de extrato de levedura 1% a pH 4,8 (pH da suspensão de células sem ajuste) apresentou um aumento de 8% em evolução de CO₂, enquanto que o fermento hidratado em solução de extrato de levedura 1%, com pH da suspensão de células ao redor de 7,5, não apresentou variações significativas frente aos parâmetros fermentativos. Na **Tabela 8**, o fermento hidratado em solução de extrato de levedura 1% a pH 4,8 (pH da suspensão de células sem ajuste) também apresentou um aumento de 8% em relação à evolução de CO₂,

confirmando o dado mostrado na **Tabela 9**. Considerando a atividade de fermentação na massa (variações em crescimento da massa) ambos os ensaios, mostrados nas **Tabelas 8 e 9**, não apresentaram aumentos em relação ao controle (água pura).

Assim, apenas os tratamentos diretos (40 min de hidratação) com as soluções de glicose 0,5% e 2%, citrato 0,15 mol.L⁻¹ (**Tabela 7**) e extrato de levedura 1% e 2% sem o ajuste do pH da suspensão (**Tabela 8 e 9**) levaram a resultados satisfatórios.

Tabela 9 - Hidratação direta da levedura seca por 40 min a 24,6°C com soluções de Extrato de levedura.

Soluções hidratantes	Variação da massa			Evolução de CO ₂		
	Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)		Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) x 10 ⁻²	Volume final/180 min de fermentação (0,2 g fermento)	
		mL	Valores relativos		mL	Valores Relativos
Água ^(a) (pH 4,6)	30,5 ± 0,9	30,0 ± 2,00	1,00	31,3 ± 0,1	56,5 ± 3,54	1,00
Água ^(b) (pH 7,5)	29,8 ± 0,4	31,0 ± 3,16	1,03	29,8 ± 1,4	55,0 ± 4,12	0,97
Extrato de levedura ^(a) 1% (pH 4,8)	26,7 ± 0,0	29,0 ± 3,16	0,97	33,0 ± 0,4	61,0 ± 3,16	1,08
Extrato de levedura ^(b) 1% (pH 7,5)	25,4 ± 1,5	28,0 ± 2,00	0,93	30,7 ± 0,6	57,5 ± 4,53	1,02

Fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix, Salvador, Bahia e produzido no Chile por "Gist Brocades"; ^(a) sem ajuste do pH da suspensão de células; ^(b) com ajuste do pH 7,5 da suspensão de células.

A partir dos dados obtidos, após a hidratação prévia da levedura seca, é possível concluir que a solução de extrato de levedura apresenta melhoras frente a evolução de CO₂ somente em concentrações acima de 1%. Em relação a variação do pH da suspensão contendo extrato de levedura tem-se que o aumento do pH de 4,8 para 7,5 fez com que o extrato de levedura deixasse de ter efeito sobre a evolução de CO₂. A comparação entre os aditivos mostra que as soluções de glicose 0,5% e 2,0% favoreceram a evolução de CO₂, enquanto o citrato a pH 6,9 e 7,5 favoreceram o crescimento de massa.

4.5 - Efeitos dos tempos de hidratação do fermento seco em água frente as diferentes temperaturas de incubação sobre a atividade de fermentação e viabilidade celular

4.5.1 - Hidratação a temperatura ambiente

A **Figura 6** correlaciona as variações entre velocidades de crescimento de massa e evolução de CO₂, variações em viabilidade e volumes finais de massa e CO₂ durante a hidratação do fermento seco a 27°C. Na **Figura 6**, a viabilidade máxima foi observada na

faixa de tempo de hidratação de 40 min ($16,6 \pm 0,1 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) a 80 min ($16,4 \pm 0,4 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) com queda a partir desta faixa de tempo. No entanto, a atividade fermentativa foi maior no tempo de hidratação no qual a viabilidade foi mínima, diminuindo acima deste ponto. Este dado mostra que a atividade de fermentação não apresentou uma correlação com a viabilidade celular, ou seja, nesse caso a viabilidade e a atividade fermentativa foram inversamente proporcionais. Uma possível explicação para este fato é que a levedura é capaz de fermentar até mesmo antes de completar a regeneração da sua estrutura celular, enquanto que para a obtenção de uma boa retenção de viabilidade é necessária a regeneração da estrutura celular. Isso explica porque a menor retenção de viabilidade e a maior atividade fermentativa foram obtidas no início do processo de hidratação (1-20 min de hidratação) onde a regeneração da estrutura celular ainda não havia sido completada. A maior evolução de CO_2 foi obtida após 1 min e 10 min de hidratação a 27°C (ao redor de $79,0 \pm 1,0 \text{ mL}/180 \text{ min}$ de fermentação), enquanto que o maior volume de massa ocorreu após 10 min de hidratação a 27°C ($36,0 \pm 2,0 \text{ mL}/150 \text{ min}$ de fermentação). Perdas em volume de massa (22% de perda na faixa de 10 a 120 min de hidratação) e em evolução de CO_2 (8% de perda na faixa de 10 a 120 min de hidratação) foram observadas com o tempo de hidratação. Diminuições significativas em velocidades de evolução de CO_2 e crescimento de massa foram observados com tempos de hidratação maiores que 20 min. A Figura 7 (APÊNDICE A) descreve as curvas de tempo para evolução de CO_2 e variações em volume de massa obtidas para os cálculos mostrados na **Figura 6**.

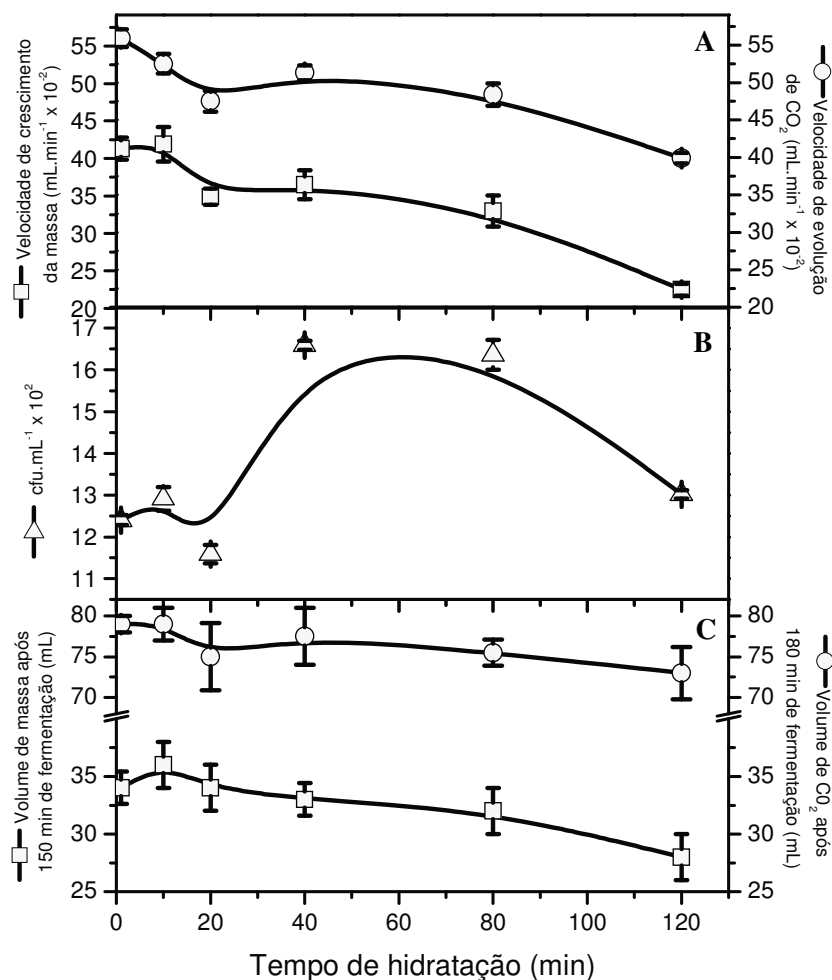


Figura 6 - Efeito do tempo de hidratação, a temperatura ambiente (27°C), sobre as variações em crescimento de massa (□), evolução de CO₂ (○) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO₂ na parte A da figura, viabilidade na parte B e volumes finais de massa após 150 min de fermentação e CO₂ após 180 min na parte C. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.5.2 - Hidratação a 37°C

A hidratação a 37°C (**Figura 8**) apresentou uma viabilidade celular máxima aos 80 min ($14,9 \pm 0,6$ cfu.mL⁻¹ x 10²). Quanto a atividade fermentativa a 37°C não houve melhora significativa em relação à formação de CO₂ ($78,0 \pm 1,0$ mL de CO₂/180 min de fermentação após hidratação de 80 min) e variação do volume de massa (ao redor de $31,3 \pm 1,7$ mL/180 min de fermentação) quando comparados com os resultados obtidos após hidratação a 27°C. A hidratação a 37°C permitiu retenção de viabilidade e evolução de CO₂ máximas aos 80 min de hidratação. Este resultado mostra uma proporcionalidade existente entre viabilidade e

evolução de CO_2 que não foi obtida quando o fermento seco foi hidratado a temperatura ambiente (27°C). A vantagem desta temperatura foi à obtenção de uma atividade constante de variação do volume da massa e por isto esta temperatura foi selecionada para nossos estudos. Diminuições em velocidades de evolução de CO_2 e crescimento de massa foram observados após 20 min de hidratação. A Figura 9 (APÊNDICE B) descreve as curvas de tempo para evolução de CO_2 e variações em volume de massa obtidas para os cálculos mostrados na Figura 8.

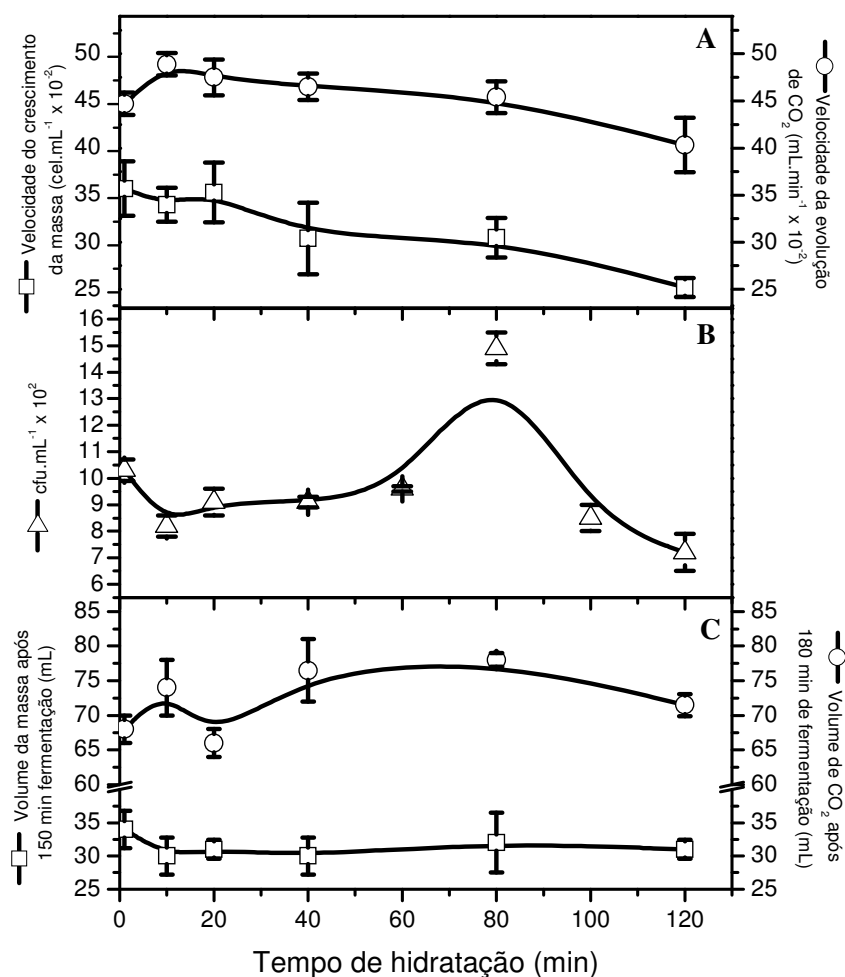


Figura 8 - Efeito do tempo de hidratação, a 37°C , sobre as variações em crescimento de massa (\square), evolução de CO_2 (\circ) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO_2 na parte **A** da figura, viabilidade na parte **B** e volumes finais de massa após 150 min de fermentação e CO_2 após 180 min na parte **C**. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado.

4.5.3 - Hidratação a 40°C

A hidratação a 40°C (**Figura 10**), assim como a hidratação a temperatura ambiente (27°C), apresentou uma viabilidade máxima na faixa de tempo de hidratação de 40 min ($9,5 \pm 0,3 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) a 80 min ($8,5 \pm 0,2 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) com queda a partir desta faixa de tempo. Apesar da viabilidade ter sido máxima na mesma faixa de tempo para hidratações a 27°C e 40°C os valores de retenção de viabilidade obtidos após hidratação a 27°C foram muito maiores. A atividade fermentativa foi maior no tempo de hidratação no qual a viabilidade foi mínima, diminuindo acima deste ponto. Este dado mostra que a atividade fermentativa não possui correlação com a viabilidade celular. A maior evolução de CO₂ foi obtida após 10 min de hidratação a 40°C ($76,5 \pm 3,5 \text{ mL}/180 \text{ min}$ de fermentação), enquanto que o maior volume de massa ocorreu após 10 min de hidratação a 40°C ($34,0 \pm 2,0 \text{ mL}/180 \text{ min}$ de fermentação). Perdas em volume de massa (18% de perda na faixa de 10 a 120 min de hidratação) e em evolução de CO₂ (27% de perda na faixa de 10 a 120 min de hidratação) foram observadas com o tempo de hidratação. Diminuições em velocidades de evolução de CO₂ e crescimento de massa foram observados após 10 min de hidratação. A Figura 11 (**APÊNDICE C**) descreve as curvas de tempo para evolução de CO₂ e variações em volume de massa obtidas para os cálculos mostrados na **Figura 10**.

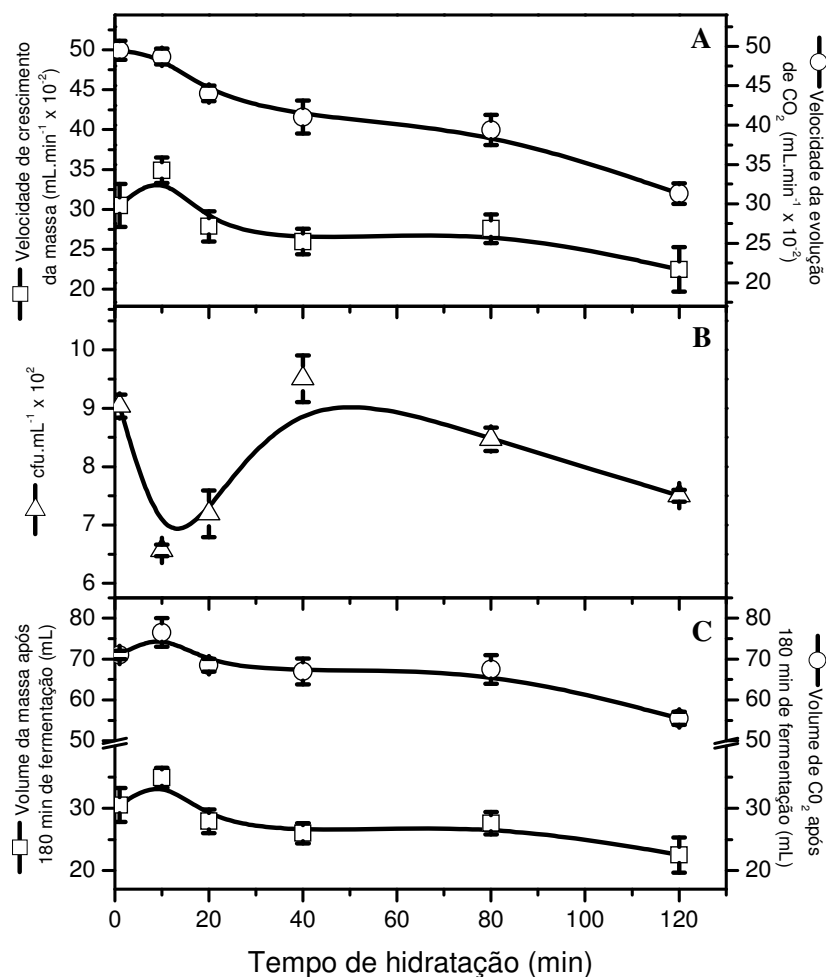


Figura 10 - Efeito do tempo de hidratação, a 40°C, sobre as variações em crescimento de massa (□), evolução de CO₂ (○) e viabilidade (Δ): Velocidades de crescimento de massa e evolução de CO₂ na parte A da figura, viabilidade na parte B e volumes finais de massa após 180 min de fermentação e CO₂ após 180 min na parte C. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istanbul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

As curvas de tempo e temperatura de hidratação permitem concluir que a hidratação a temperatura ambiente (27°C) e 40°C apresentaram os melhores volumes de massa e CO₂ após 10 min de hidratação, enquanto a hidratação a 37°C apresentou volumes de massa e CO₂ praticamente constantes com o tempo de hidratação. Em relação a viabilidade celular a maior retenção foi obtida na faixa de 40-80 min de hidratação para todas as temperaturas ensaiadas, sendo a maior viabilidade obtida após hidratação a temperatura ambiente. Somente a hidratação a 37°C apresentou relação entre viabilidade e os parâmetros fermentativos (evolução de CO₂).

Quanto as velocidades de crescimento da massa e evolução de CO₂ foram observados decréscimos com o tempo de hidratação nas três temperaturas ensaiadas.

4.6 - Efeitos da hidratação direta do fermento seco com soluções de aditivos a 37°C após 120 min de hidratação sobre a viabilidade celular

4.6.1 - Comparação entre aditivos

A **Figura 12** mostra que dentre os aditivos (glicose, citrato, extrato de levedura, ácido glutâmico, lisina e bicarbonato) utilizados para a hidratação do fermento seco somente as soluções de lisina, ácido glutâmico e bicarbonato apresentaram melhoras frente à viabilidade celular em relação ao controle (água pura). A solução de lisina foi o aditivo que apresentou maior viabilidade celular (2,09 vezes) após 120 min de hidratação quando o pH da sua solução foi inicialmente ajustado para pH 8,0. O ajuste do pH da solução de lisina para 8,0 proporciona uma suspensão de células (0,05g/10 mL) com pH ao redor de 7,3. No entanto, aumentos em viabilidade da ordem de 52% e 28% foram obtidos após hidratação direta do fermento seco com soluções de ácido glutâmico 0,08 mol.L⁻¹ a pH 6,6 e pH 6,1 (pHs referentes às suspensões de células), respectivamente, enquanto que um aumento de 39% foi obtido com solução de bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (pH da suspensão de células 7,7). Os demais aditivos ensaiados (glicose 0,5%; citrato 0,15 mol.L⁻¹; extrato de levedura 1% e extrato de levedura 2%) não apresentaram melhoras frente a viabilidade celular.

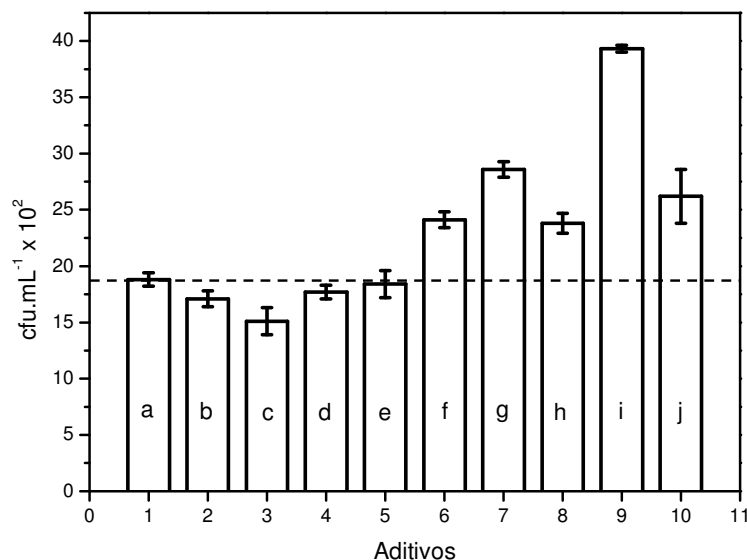


Figura 12 - Efeito da hidratação do fermento seco, em soluções de aditivos por 120 min a 37°C, sobre a viabilidade celular. Os aditivos utilizados na preparação das suspensões de células (0,05g/10mL) para a hidratação foram: **a)** água a pH 4,8 (controle); **b)** glicose 0,5% a pH 3,7; **c)** citrato trissódico 0,15 mol.L⁻¹ a pH 7,0; **d)** extrato de levedura 1% a pH 6,3; **e)** extrato de levedura 2% a pH 6,5; **f)** ácido glutâmico 0,08 mol.L⁻¹ a pH 6,1; **g)** ácido glutâmico 0,08 mol.L⁻¹ a pH 6,6; **h)** lisina 0,08 mol.L⁻¹ a pH 9,5; **i)** lisina 0,08 mol.L⁻¹ a pH 7,3; **j)** bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ a pH 7,7. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.6.2 - Curva do tempo de hidratação do fermento seco com solução de lisina a 37°C sobre a viabilidade

A curva de tempo de hidratação do fermento seco com solução de lisina a 37°C (**Figura 13**) mostrou um aumento em viabilidade celular da ordem de 17% na faixa de 1 min (controle) a 120 min de hidratação e um aumento da ordem de 32% na faixa de 80 min a 120 min de hidratação. No entanto, a curva de tempo de hidratação do fermento seco com água a 37°C (**Figura 8**) mostrou um decréscimo em viabilidade da ordem de 52% na faixa de 80 min a 120 min de hidratação. As curvas de tempo de hidratação do fermento seco com água a 27°C (**Figura 6**) e 40°C (**Figura 10**) também apresentaram decréscimos em viabilidade após os 80 min de hidratação (21% e 12%, respectivamente). O resultado sobre a retenção de viabilidade celular apresentado na **Figura 13** é um tanto curioso, pois a levedura está assimilando a lisina (fonte de nitrogênio) somente após 120 min de hidratação, ou seja, no ápice do estresse proporcionado pela hidratação. Isto é um indicativo que este aminoácido apresenta benefícios sobre a viabilidade da levedura quando esta é submetida às condições de estresse durante o processo de hidratação.

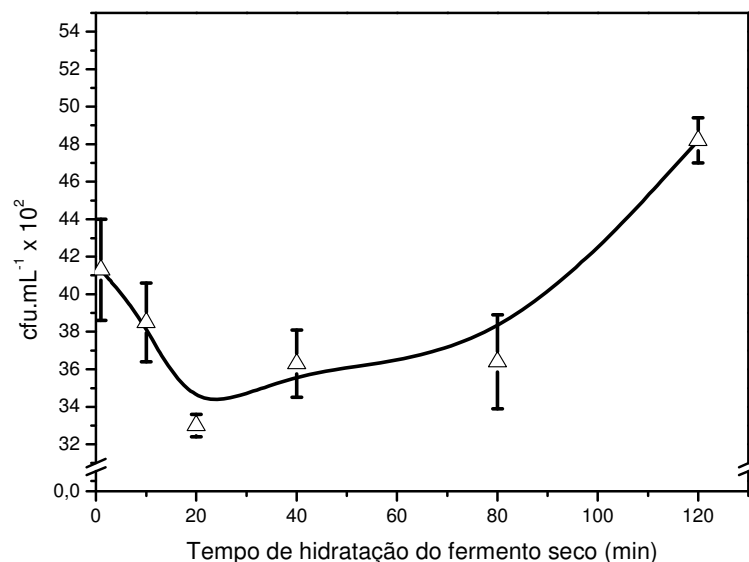


Figura 13 - Curva do tempo de hidratação do fermento seco, em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) a 37°C , sobre a viabilidade celular. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.6.3 - *Comparação da adição da suspensão total das células de levedura diretamente hidratada com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 8,0 (por 20 min a 37°C) com a mesma quantia de levedura tratada da mesma forma, porém resuspensas em água.*

As **Tabelas 10** (evolução de CO_2) e **11** (variação da massa do pão) contêm os cálculos das velocidades de crescimento de massa e evolução de CO_2 obtidos através dos volumes de massa e evolução de CO_2 (**Figura 14**) após 180 min de fermentação. Houve um aumento de 14 % em volume da massa (após 180 min de fermentação), quando o fermento foi hidratado em solução de lisina, coletado por centrifugação e resuspensão em água antes da adição a massa. No entanto, quando o fermento foi hidratado em solução de lisina e adicionado diretamente à massa, sem a centrifugação e resuspensão em água, obteve-se uma queda de 17% em volume final de massa. Quanto à evolução de CO_2 não foram observadas variações significativas em ambos os casos. A **Figura 14** mostra também, que apesar da hidratação com solução de lisina ter apresentado um aumento (14%) em volume final da massa, esta hidratação apresentou velocidades de crescimento da massa e evolução de CO_2 (**Tabelas 10 e 11**) menores (31% e 24%, respectivamente) que as obtidas em água (controle). Os resultados apresentados nas **Tabelas 10 e 11** permitem concluir, em relação a evolução de CO_2

(parâmetro fermentativo de maior importância), que a lisina não deve ser utilizada como aditivo de hidratação.

Tabela 10 - Efeito da hidratação do fermento seco, com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) por 20 min a 37°C , e da resuspensão do fermento após centrifugação sobre a evolução de CO_2 .

Condições de hidratação	pH da suspensão de células	Evolução do CO_2			
		Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) $\times 10^{-2}$	Volume final no ensaio		
			Tempo (min)	Volume (mL)	Valores relativos
Controle: a) hidratação em água; b) centrifugação; c) resuspensão em água; d) determinação do crescimento de massa	5,7	$47,5 \pm 1,9$	150	$60,0 \pm 2,0$	1,00
			180	$66,0 \pm 2,0$	1,00
Condição A: a) hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$; b) centrifugação; c) resuspensão em água; d) determinação do crescimento de massa	6,3	$36,3 \pm 0,6$	150	$55,0 \pm 6,1$	0,92
			180	$66,0 \pm 5,0$	1,00
Condição B: a) hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$; b) determinação do crescimento de massa	6,9	$39,9 \pm 0,7$	150	$53,0 \pm 3,0$	0,88
			180	$63,0 \pm 3,0$	0,95

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado

Tabela 11 - Efeito da hidratação do fermento seco, com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) por 20 min a 37°C , e da resuspensão do fermento após centrifugação sobre a atividade de crescimento da massa.

Condições de hidratação	pH da suspensão de células	Variação da massa			
		Velocidade (mL/min/0,15g de fermento) $\times 10^{-2}$	Volume final no ensaio		
			Tempo (min)	Volume (mL)	Valores relativos
Controle: a) hidratação em água; b) centrifugação; c) resuspensão em água; d) determinação do crescimento de massa	5,7	$35,6 \pm 3,2$	150	$31,0 \pm 2,0$	1,00
			180	$29,0 \pm 3,2$	1,00
Condição A: a) hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$; b) centrifugação; c) resuspensão em água; d) determinação do crescimento de massa	6,3	$24,8 \pm 1,6$	150	$30,0 \pm 2,8$	0,97
			180	$33,0 \pm 1,4$	1,14
Condição B: a) hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$; b) determinação do crescimento de massa	6,9	$22,7 \pm 1,7$	150	$22,0 \pm 2,8$	0,71
			180	$24,0 \pm 2,8$	0,83

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado.

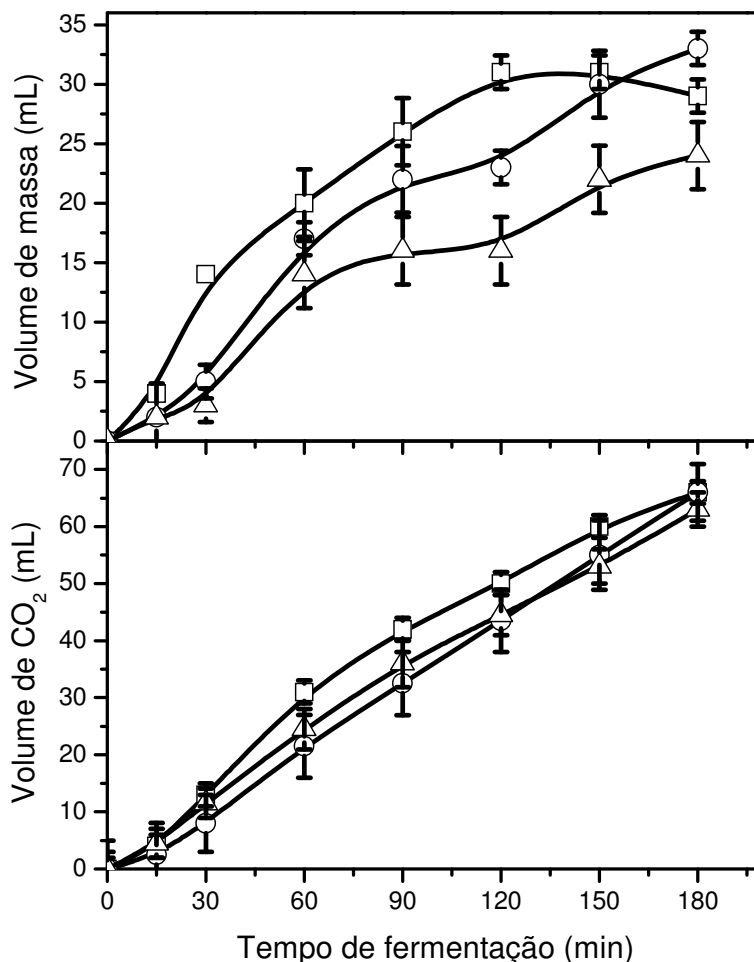


Figura 14 - Efeito da hidratação do fermento seco com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) por 20 min a 37°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO_2 : hidratação em água, coletado por centrifugação e resuspensão em água antes da adição a massa, controle (□); hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$, coletado por centrifugação e resuspensão em água antes da adição a massa (○); hidratação em solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ e adicionado a massa sem centrifugação (△). O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istanbul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.6.4 - Efeitos do tempo de estocagem das embalagens individuais sobre a viabilidade celular de amostras hidratadas com solução de lisina.

A **Tabela 12** mostra os efeitos da hidratação do fermento seco com solução de lisina por 120 min a 37°C sobre a viabilidade celular. Os valores de viabilidade foram sempre menores em ausência de lisina e variaram com a embalagem após 20 dias de abertura. Dois fermentos de duas embalagens distintas, mas da mesma marca, foram ensaiados. O fermento da embalagem denominada C foi ensaiado duas vezes, onde uma amostra foi coletada no

instante da abertura da embalagem e a outra após 20 dias. Observou-se que o efeito positivo proporcionado pela hidratação com solução de lisina foi independente do tempo de abertura da embalagem (considerando 20 dias de abertura) e da procedência (embalagem) do fermento. O fermento da embalagem denominada C apresentou aumentos em viabilidade da ordem de 2,09 vezes (embalagem aberta no instante do ensaio) e 2,18 vezes (embalagem aberta 20 dias antes do ensaio), enquanto que o fermento da embalagem, denominada A, apresentou um aumento de 2,33 vezes (embalagem aberta 10 dias antes do ensaio). Estes dados confirmam o efeito da lisina sobre a retenção de viabilidade mostrada na **Figura 13**.

Tabela 12 - Efeito da hidratação do fermento seco proveniente de pacotes distintos, com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) por 120min a 37°C , sobre a viabilidade celular.

Embalagens	Tempo de abertura da embalagem (dias)	Soluções hidratantes	pH das suspensões de células após 120 min de hidratação	Média do número de colônias/placa	Viabilidade ($\text{cfu.mL}^{-1} \times 10^2$)	Valores relativos
C	Instante do ensaio	Água	4,3	$118,5 \pm 3,5$	$18,8 \pm 0,6$	1,00
		Lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$	7,3	$243,5 \pm 2,1$	$39,3 \pm 0,3$	2,09
C	20	Água	4,7	$54,0 \pm 1,41$	$7,8 \pm 0,2$	1,00
		Lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$	7,4	$95,0 \pm 2,83$	$17,0 \pm 0,5$	2,18
A	10	Água	4,7	$103,0 \pm 4,24$	$16,1 \pm 0,7$	1,00
		Lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$	7,4	$214,5 \pm 6,36$	$37,6 \pm 1,1$	2,33

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado.

4.7 - Efeitos da hidratação do fermento seco, com soluções de aditivos a 37°C , sobre os teores de glicerol interno das células

Os ensaios dos teores de glicerol interno foram realizados com o intuito de explicar fisiologicamente os resultados de retenção de viabilidade e atividade fermentativa obtidos. Estes ensaios foram feitos após tratamentos com lisina, bicarbonato e água (controle), como mostra a **Figura 15**. A **Figura 15** e a **Tabela 13** mostram que os teores de glicerol interno foram menores para as células hidratadas com solução de lisina por 20 min, 50 min e 120 min (32%, 39% e 17%, respectivamente), enquanto que as células hidratadas com solução de bicarbonato apresentaram o menor teor (32%) somente após 80 min de hidratação. Devido a variações em teores de glicerol interno obtidas entre os fermentos hidratados com soluções de lisina e bicarbonato e o fermento hidratado com água, conclui-se que estas soluções minimizam o estresse proporcionado pela hidratação e conseqüentemente os teores de glicerol

interno. Aumentos dos teores de glicerol interno do fermento seco (embalagem aberta no instante do ensaio) em função do tempo de hidratação a 37°C (**Figura 15**) foram observados independentemente da solução hidratante utilizada. No entanto, a água foi à solução hidratante que apresentou os maiores teores de glicerol interno.

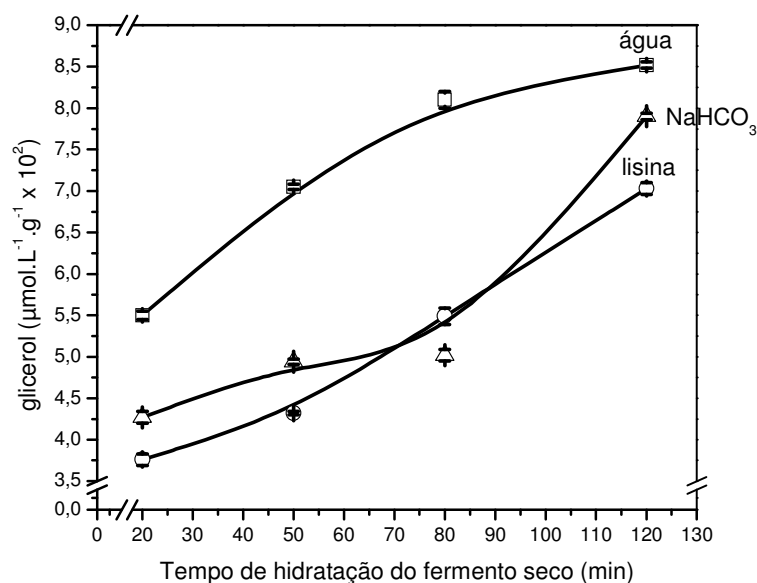


Figura 15 - Variações em níveis internos de glicerol durante a hidratação do fermento seco (embalagem aberta no instante do experimento) em água (□); solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e solução de bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ) a 37°C. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

Tabela 13 - Efeitos da hidratação do fermento seco, com soluções de lisina e bicarbonato a 37°C, frente aos teores de glicerol interno em relação ao controle (água pura).

Tempo de hidratação (min)	Teores de glicerol interno (µmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²)				
	Controle (hidratação em água)	Hidratação em lisina 0,08 mol.L ⁻¹	Diferença em relação ao controle (%)	Hidratação em bicarbonato 0,0147 mol.L ⁻¹	Diferença em relação ao controle (%)
20	5,50 ± 0,05	3,76 ± 0,07	32	4,27 ± 0,07	22
50	7,05 ± 0,03	4,32 ± 0,02	39	4,94 ± 0,03	30
80	8,10 ± 0,10	5,49 ± 0,10	32	5,02 ± 0,07	38
120	8,52 ± 0,04	7,03 ± 0,07	17	7,90 ± 0,04	7

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.8 - Estabilidade do fermento seco durante sua estocagem a temperatura ambiente após a abertura da embalagem

Estudos detalhados sobre os efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco sobre a viabilidade celular, a atividade fermentativa e os teores de glicerol interno foram realizados após a hidratação do fermento seco com soluções de aditivos (lisina e bicarbonato) por tempos variáveis a 37°C. Para os ensaios de viabilidade celular e glicerol interno a hidratação do fermento foi realizada em lisina e bicarbonato, enquanto que para os ensaios de atividade fermentativa a hidratação do fermento foi realizada em lisina, bicarbonato e citrato.

4.8.1 - Efeitos sobre a viabilidade celular

A **Figura 16** mostra de forma ilustrativa os efeitos do tempo de estocagem (temperatura ambiente) das embalagens abertas do fermento seco sobre a viabilidade celular após hidratação com água. Observou-se que o tempo de exposição do fermento seco ao oxigênio e a umidade do ar foi determinante para a viabilidade celular, ou seja, quanto maior o tempo de abertura da embalagem menor a viabilidade celular. Isto ocorre devido ao processo oxidativo a que a levedura é submetida quando entra em contato com o oxigênio e umidade do ar após a abertura da embalagem. Este estudo permite concluir que o fermento seco deve ser consumido o mais rapidamente possível após a abertura da embalagem.

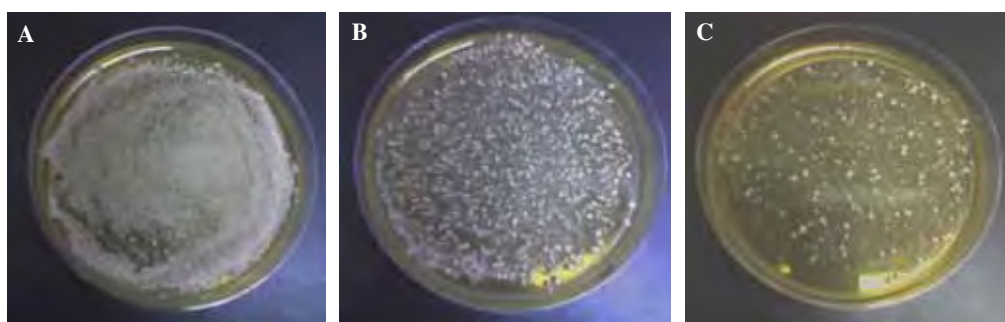


Figura 16 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco sobre a viabilidade celular. Parte **A**: embalagem aberta 10 dias antes do ensaio; Parte **B**: embalagem aberta 30 dias antes do ensaio; Parte **C**: embalagem aberta 60 dias antes do ensaio. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

Estudo sobre as variações em viabilidade foram realizados com amostras de uma levedura seca, durante a estocagem da embalagem aberta por 30 dias a temperatura ambiente. As diferenças resultantes da hidratação em água (controle), solução de lisina e bicarbonato foram comparadas usando-se as amostras retiradas da embalagem aberta durante tempos de hidratações diferentes (20 min de hidratação Parte A da figura, 50 min na Parte B, 80 min na Parte C e 120 min na Parte D). A **Figura 17** mostra as variações em viabilidade (cfu.mL^{-1}) com o tempo de estocagem e hidratação. Os valores de viabilidade variaram tanto com a

solução quanto com o tempo de hidratação. Os maiores valores de viabilidade foram obtidos por ocasião da abertura da embalagem usando-se solução de bicarbonato. Os ensaios realizados em diferentes tempos de hidratação mostraram o seguinte: a) aumentos após 10 dias de estocagem em todos os tempos de hidratação em água; b) quedas da viabilidade em solução de bicarbonato até 15-20 dias de estocagem, durante a hidratação em bicarbonato em todos os tempos de hidratação ensaiados, seguidas por aumentos acima de 20 dias; c) em lisina, os aumentos mais significativos da viabilidade ocorreram após 20 dias (10 min de hidratação) e acima de 20 dias (50 min de hidratação). Assim, a recuperação parcial da viabilidade pode ocorrer dependendo do aditivo e do tempo de hidratação, mas nunca superior ao valor obtido no instante da abertura da embalagem. Este experimento dá uma idéia das perdas em viabilidade durante a estocagem de uma embalagem de fermento seco a temperatura ambiente e recomenda o uso de solução de bicarbonato como solução hidratante a ser usada no instante da sua abertura.

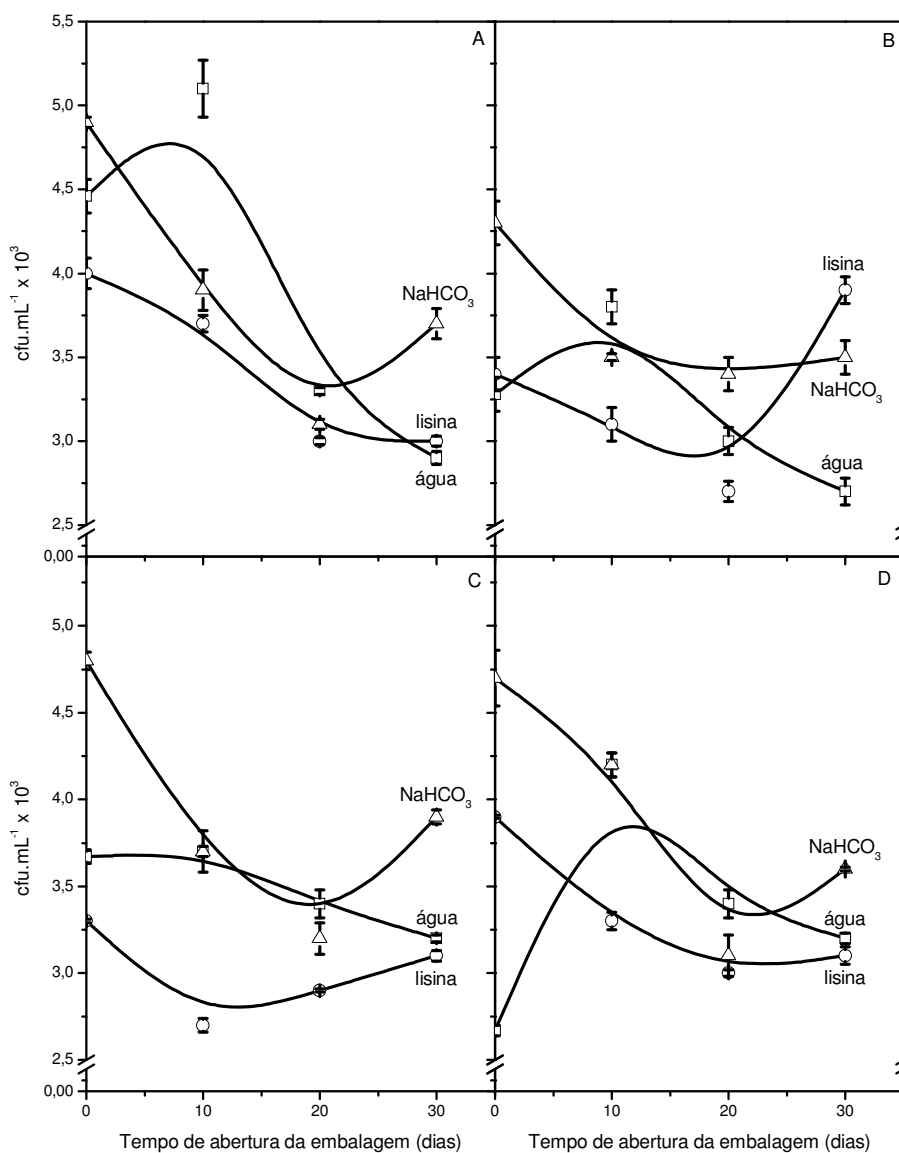


Figura 17 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco e do tempo de hidratação (20 min de hidratação **Parte A** da figura, 50 min na **Parte B**, 80 min na **Parte C** e 120 min na **Parte D**) a 37°C sobre a viabilidade celular: água (□), lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ). O fermento biológico seco (embalagem contendo 110g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.8.2 - Efeitos sobre os teores de glicerol interno para amostras de fermento de mesma marca, mas de embalagens distintas

A) Embalagem 1 contendo 10g de fermento seco instantâneo

A **Figura 18** e a **Tabela 14** mostram os efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco (embalagem aberta 30 dias antes do ensaio) sobre as variações nos teores de glicerol interno em função do tempo de hidratação a 37°C. O mesmo efeito observado para o fermento com a embalagem aberta no instante do ensaio (**Figura 16**) foi observado para o fermento com a embalagem aberta 30 dias antes do ensaio. No entanto, os teores de glicerol interno foram menores de acordo com o aumento do tempo de abertura da embalagem. Considerando as diminuições em teores de glicerol interno devido ao tempo de abertura da embalagem, aumentos nos níveis de glicerol interno do fermento seco também foram observados independentemente da solução hidratante utilizada. A água além de apresentar os maiores teores de glicerol interno foi a única solução hidratante que apresentou um decréscimo após hidratação por 120 min. Analisando os teores de glicerol interno em função de cada tempo de hidratação, em relação ao controle (água pura), observa-se que as células que apresentaram os menores teores foram às células hidratadas com solução de lisina por 20 min, 50 min e 120 min (35%, 30% e 1%, respectivamente), enquanto que as células hidratadas com solução de bicarbonato apresentaram o menor teor (24%) somente aos 80 min de hidratação (**Tabela 14**). Variações pouco significativas foram observadas quando o fermento foi hidratado com água e com soluções de lisina e bicarbonato por 120 min, devido a uma queda no nível de glicerol interno obtida com o fermento hidratado em água. Assim, variações nos teores de glicerol interno obtidas entre os fermentos hidratados com soluções de lisina e bicarbonato e o fermento hidratado em água, minimizaram o estresse proporcionado pela hidratação e consequentemente os teores de glicerol interno, independentemente do tempo de abertura da embalagem.

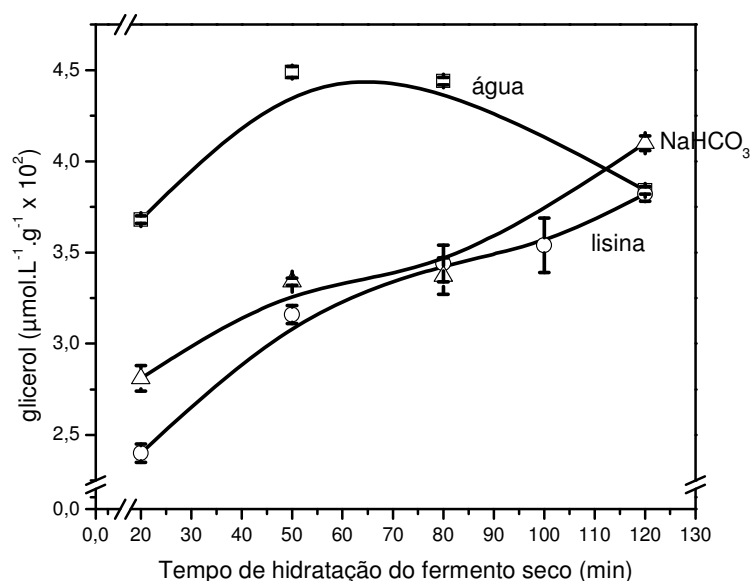


Figura 18 - Variações em níveis internos de glicerol durante a hidratação do fermento seco (embalagem aberta 30 dias antes do experimento) em água (□); solução de lisina 0,08 mol.L⁻¹ (○) e solução de bicarbonato de sódio 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ) a 37°C. O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

Tabela 14 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem (aberta 30 dias antes do ensaio) e hidratação do fermento seco com soluções de lisina e bicarbonato a 37°C frente aos teores de glicerol interno em relação ao controle (água pura).

Tempo de hidratação (min)	Teores de glicerol interno (µmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²)				
	Controle (hidratação em água)	Hidratação em lisina 0,08 mol.L ⁻¹	Diferença em relação ao controle (%)	Hidratação em bicarbonato 0,0147 mol.L ⁻¹	Diferença em relação ao controle (%)
20	3,68 ± 0,02	2,40 ± 0,05	35	2,81 ± 0,07	24
50	4,49 ± 0,03	3,16 ± 0,05	30	3,34 ± 0,02	26
80	4,44 ± 0,02	3,44 ± 0,10	20	3,37 ± 0,10	24
120	3,84 ± 0,02	3,82 ± 0,04	1	4,10 ± 0,04	-7

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

B) Embalagem 2 contendo 110g de fermento seco instantâneo (embalagem selada a vácuo)

Estudo sobre as variações nos teores de glicerol interno foram realizados com amostras de uma levedura seca, durante a estocagem da embalagem aberta por 30 dias a temperatura ambiente. As diferenças resultantes da hidratação em água (controle), solução de lisina e bicarbonato foram comparadas usando-se as amostras retiradas da embalagem aberta durante tempos de hidratações diferentes (20 min de hidratação Parte A da figura, 50 min na

Parte B, 80 min na Parte C e 120 min na Parte D). A **Figura 19** mostra as variações em glicerol interno com o tempo de estocagem e hidratação. Os valores de glicerol interno variaram com o tempo de estocagem mostrando valores ótimos ao redor de 20 dias de estocagem tanto com o meio usado quanto com o tempo de hidratação, mostrando valores máximos somente em hidratações de 120 min de duração. As soluções de lisina e bicarbonato induziram o maior acúmulo de glicerol interno durante a hidratação. Os aumentos em glicerol interno constituem uma resposta de defesa frente aos estresses gerados durante a estocagem da embalagem aberta do fermento seco. Parece que acima de 20 dias de estocagem da embalagem a célula perde sua capacidade de tolerar os diversos estresses. Comparando-se com as curvas de viabilidade (**Figura 17**) as quedas em viabilidade (crescimento de colônia indicando capacidade das células em realizar o ciclo de divisão celular) ocorreram apesar dos aumentos do glicerol interno. Os aumentos em viabilidade (**Figura 17**) ocorreram quando a capacidade de acumular glicerol diminuiu, ou seja, acima de 20 dias de estocagem. Tudo indica que a célula deixa de se dividir quando acumula glicerol interno por razões energéticas.

Sabe-se que o acúmulo de glicerol intracelular é um indicativo de estresse. Portanto, sabe-se que quando as células são submetidas a condições de estresse (processos de estocagem, secagem e hidratação) os teores de glicerol interno tendem a aumentarem para proteção da estrutura celular. O glicerol é um estabilizante osmótico intracelular por proteger as estruturas celulares frente ao calor e a altas concentrações internas de sais. Os teores de glicerol interno obtidos foram maiores quando o fermento foi hidratado em lisina e bicarbonato do que quando hidratado em água pura. Apesar da levedura ter passado pelos mesmos processos de estocagem, desidratação e hidratação, em ambos os casos (hidratação com e sem aditivos), têm-se que a hidratação com aditivos (lisina e bicarbonato) pode ter proporcionado algum tipo de estresse que a água pura não proporcionou, possivelmente por isso obteve-se teores de glicerol interno maiores quando a hidratação foi realizada com aditivos.

Os dados da **Figura 19** contradizem os dados das **Figuras 15 e 18** onde foram apresentados teores de glicerol interno maiores após hidratação em água e menores após hidratação em lisina e bicarbonato. Este fato deixa claro que variações fisiológicas, variações em atividade fermentativa e variações em viabilidade celular podem existir entre fermentos de embalagens distintas. Isto pode ocorrer possivelmente devido ao controle de qualidade nas fábricas de fermento ainda deixar muito a desejar.

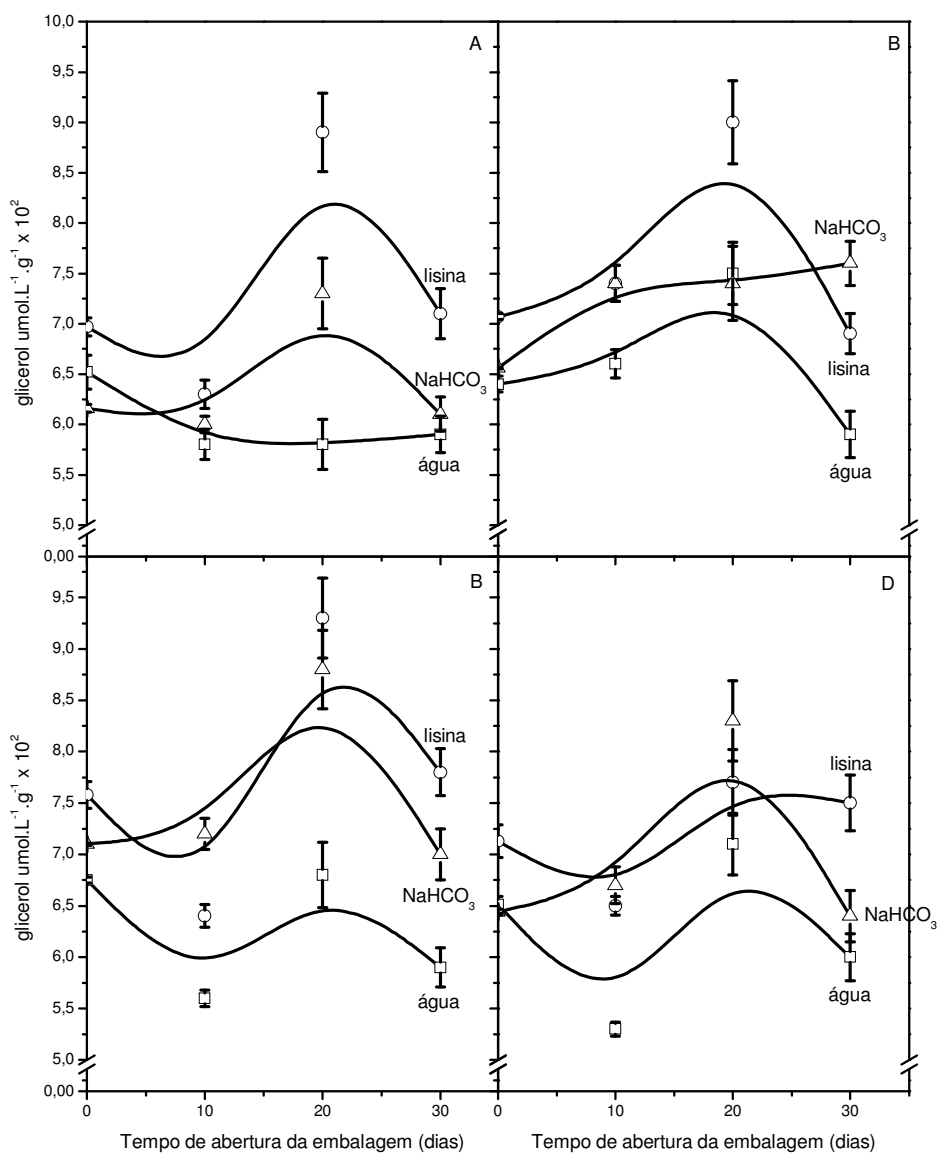


Figura 19 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco e do tempo de hidratação (20 min de hidratação **Parte A** da figura, 50 min na **Parte B**, 80 min na **Parte C** e 120 min na **Parte D**) a 37°C sobre os teores de glicerol interno: água (\square), lisina 0,08 mol.L⁻¹ (\circ) e bicarbonato 0,0147 mol.L⁻¹ (Δ). O fermento biológico seco (embalagem contendo 110g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

4.8.3 - Efeitos sobre a atividade de fermentação na massa de pão

A) Quanto ao crescimento da massa (embalagem do fermento aberta no instante do ensaio)

A **Tabela 15** mostra que os maiores volumes de massa foram obtidos quando amostras do fermento seco coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio foram hidratadas com água. Os volumes de massa foram levemente superiores, aos obtidos com os aditivos (lisina, bicarbonato e citrato), quando a hidratação foi realizada com água por 50 e 80 min ($30,0 \pm 3,2$ mL e $31,0 \pm 3,2$ mL), respectivamente. No entanto, desvios relativamente grandes foram obtidos devido aos dispositivos de medidas de massa não serem apropriados para realização dessas medidas. Dessa forma os volumes de massa obtidos foram praticamente constantes independentemente do tempo de hidratação. O fermento hidratado com lisina apresentou crescimento de massa máximo após 50 min de hidratação ($30,0 \pm 2,0$ mL). Quedas no crescimento de massa foram observadas após 80 e 120 min de hidratação ($26,0 \pm 2,0$ mL e $24,0 \pm 1,4$ mL), respectivamente. A hidratação com bicarbonato não apresentou efeitos positivos frente ao crescimento de massa, sendo o maior volume de massa obtido $27,0 \pm 3,2$ mL (após 50 min de hidratação). A hidratação com citrato foi a que apresentou volumes de massa mais regulares dentre os aditivos ensaiados. A curva de crescimento de massa em função do tempo de hidratação foi praticamente constante, no entanto, volumes de massa extremamente baixos foram obtidos (25,0-26,0 mL). Nesse caso, onde a embalagem do fermento foi aberta no instante do ensaio, quando se compara os volumes de massa obtidos após hidratação com água (controle) com as hidratações com soluções de aditivos (lisina, bicarbonato e citrato) tem-se que a melhor opção para hidratação do fermento é a água.

B) Quanto a evolução de CO₂ (embalagem do fermento aberta no instante do ensaio)

A **Tabela 15** mostra que a evolução de CO₂ permaneceu praticamente constante após hidratação do fermento seco com água por 20, 50 e 80 min ($49,5 \pm 1,6$ mL, $49,0 \pm 2,0$ mL, $50,5 \pm 3,5$ mL, respectivamente). No entanto, queda na evolução de CO₂ foi observada após hidratação por 120 min ($46,0 \pm 2,0$ mL). O fermento hidratado com lisina apresentou evolução de CO₂ crescente com o tempo de hidratação (20, 50, 80 e 120 min), onde uma variação de $48,0 \pm 3,2$ mL (20 min de hidratação) a $53,5 \pm 3,5$ mL (120 min de hidratação) foi obtida. Quando o fermento foi hidratado com bicarbonato a evolução de CO₂ foi relativamente baixa ($46,5 \pm 0,7$ mL) após 20 min de hidratação tornando-se praticamente constante aos 50, 80 e 120 min de hidratação ($50,5 \pm 2,5$ mL, $50,0 \pm 2,0$ mL e $48,5 \pm 2,9$ mL, respectivamente). Para o fermento hidratado com citrato o maior volume de CO₂ foi obtido após 50 min de hidratação ($46,5 \pm 3,8$ mL) e o menor volume após 20 min de hidratação ($42,0 \pm 3,2$ mL). A água e o bicarbonato apresentaram uma faixa de tempo de hidratação, enquanto que a lisina e o citrato apresentaram tempos ótimos de hidratação. A hidratação com água deve ser realizada na faixa de 20-80 min para obtenção de um volume de CO₂ da ordem de

49,7 ± 1,4 mL e a hidratação com bicarbonato deve ser realizada na faixa de 50-120 min de hidratação para obtenção de um volume de CO₂ da ordem 49,7 ± 1,4 mL, exatamente o mesmo volume de CO₂ obtido com hidratação em água. No caso da hidratação com lisina, tem-se que quanto maior o tempo de hidratação maior o volume de CO₂, podendo-se chegar a 53,5 ± 3,5 mL após 120 min de hidratação. A hidratação com citrato apresentou um tempo ótimo de hidratação de 50 min. No entanto, o volume de CO₂ obtido (46,5 ± 3,8 mL) foi inferior aos volumes de CO₂ obtidos com água e com os demais aditivos (lisina e bicarbonato) ensaiados.

C) Quanto ao crescimento da massa (embalagem do fermento aberta a 30 dias)

A **Tabela 15** mostra que com o tempo de abertura da embalagem do fermento seco a constância em volume de massa obtida para amostras coletadas no instante da abertura da embalagem e hidratadas em água deixa de existir. O único tempo de hidratação que apresentou volume de massa semelhante, em relação às amostras coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio, foi 20 min de hidratação (28,0 ± 0,0 mL). No entanto, os demais tempos de hidratação ensaiados (50, 80 e 120 min) apresentaram quedas significativas em volume de massa (15%, 29% e 21%, respectivamente) com o tempo de abertura da embalagem (30 dias). A hidratação do fermento, coletado da embalagem aberta a 30 dias, com lisina apresentou dados totalmente discrepantes dos obtidos com as amostras coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio. No ensaio inicial (embalagem aberta no instante do ensaio) obteve-se o maior volume de massa após 50 min de hidratação (30,0 ± 2,0 mL) seguido por queda após este tempo de hidratação. No entanto, as amostras coletadas da embalagem aberta a 30 dias apresentaram o menor volume de massa após 50 min de hidratação (24,0 ± 0,0 mL) com aumentos a partir desse tempo de hidratação. A hidratação com bicarbonato foi a única que apresentou melhoras frente ao crescimento de massa com o tempo de abertura da embalagem. Nesse tempo de abertura da embalagem (30 dias) volumes de massa semelhantes aos obtidos para o fermento hidratado com lisina foram obtidos após hidratação por 20, 80 e 120 min. No entanto, após 50 min de hidratação o volume de massa para o fermento hidratado com bicarbonato foi superior (17%). A hidratação com citrato foi novamente a que apresentou volumes de massas mais regulares dentre os aditivos ensaiados. A curva de crescimento de massa em função do tempo de hidratação foi praticamente constante, no entanto, volumes de massa extremamente baixos foram obtidos (23,0-25,0 mL). Portanto, para obtenção de volumes de massa razoavelmente bons após abertura da embalagem recomenda-se hidratar o fermento seco com bicarbonato. Apesar do bicarbonato juntamente com o citrato ter apresentado os menores volumes de massa no instante da

abertura da embalagem, ele tornou-se um eficiente agente regenerador da estrutura celular após 30 dias de abertura da embalagem, ou seja, proporcionou aumentos em volumes de massa com o tempo de abertura da embalagem. O bicarbonato pode não ter proporcionado volumes de massa muito maiores do que os obtidos com os demais aditivos, no entanto apresentou volumes que não variaram com o tempo de hidratação. Dessa forma o bicarbonato pode ser considerado o melhor aditivo hidratante (dentre os ensaiados) frente ao volume de massa após a abertura da embalagem. Sabe-se que o crescimento da massa é dependente da retenção do CO₂ liberado no processo de fermentação conduzido pelo fermento (levedura) em presença de açúcar. Por sua vez o bicarbonato, também conhecido como fermento químico, também libera CO₂ proporcionando assim um desempenho mais satisfatório do bicarbonato (frente ao crescimento de massa) quando comparado com os demais aditivos ensaiados.

D) Quanto a evolução de CO₂ (embalagem do fermento aberta a 30 dias)

A **Tabela 15** mostra que tanto a hidratação com água quanto a hidratação com aditivos (lisina, bicarbonato e citrato) apresentaram quedas significativas em evolução de CO₂ após 30 dias de abertura da embalagem. A hidratação do fermento seco, coletado da embalagem aberta no instante do ensaio, com água havia apresentado volume de CO₂ máximo após 80 min de hidratação ($50,5 \pm 3,5$ mL), enquanto o volume máximo de CO₂ para a amostra coletada da embalagem aberta a 30 dias foi obtido após 50 min de hidratação ($44,5 \pm 2,5$ mL). Apesar do melhor tempo de hidratação (50 min) para a amostra coletada após 30 dias de abertura da embalagem ter sido menor do que o melhor tempo (80 min) obtido para a amostra coletada no instante do ensaio, ocorreu uma perda em volume de CO₂ da ordem de 13% após 30 dias de abertura da embalagem. A redução do tempo de hidratação é um resultado interessante, no entanto a perda em evolução de CO₂ não. Quedas em volume de CO₂ da ordem de 19%, 25% e 19% foram observadas quando as amostras coletadas da embalagem aberta a 30 dias foram hidratadas com lisina, bicarbonato e citrato respectivamente em relação ao ensaio realizado com amostras da embalagem aberta no instante do ensaio.

Tabela 15 - Efeitos da hidratação do fermento seco instantâneo com soluções de aditivos a 37°C e do tempo de abertura da embalagem (**embalagem aberta a 0 e 30 dias**) sobre os parâmetros fermentativos (crescimento de massa e evolução de CO₂).

Solução Hidratante	Tempo de hidratação (min)	Volumes finais (mL) após 3h00min de fermentação			
		Embalagem aberta a 0 dias		Embalagem aberta a 30 dias	
		Massa	CO ₂	Massa	CO ₂
Água	20	29,0 ± 3,2 (pH 5,3)	49,5 ± 1,6 (pH 5,3)	28,0 ± 0,0 (pH 5,1)	38,5 ± 1,6 (pH 5,1)
	50	29,0 ± 1,4 (pH 4,9)	49,0 ± 2,0 (pH 4,9)	26,0 ± 2,0 (pH 4,9)	44,5 ± 2,5 (pH 4,9)
	80	31,0 ± 3,2 (pH 4,9)	50,5 ± 3,5 (pH 4,9)	24,0 ± 0,0 (pH 4,9)	43,5 ± 2,5 (pH 4,9)
	120	29,0 ± 3,2 (pH 5,0)	46,0 ± 2,0 (pH 5,0)	24,0 ± 0,0 (pH 5,0)	41,0 ± 2,0 (pH 5,0)
Lisina 0,08 mol.L ⁻¹	20	28,0 ± 2,0 (pH 5,8)	48,0 ± 3,2 (pH 5,8)	27,0 ± 1,4 (pH 6,4)	36,0 ± 2,2 (pH 6,4)
	50	30,0 ± 2,0 (pH 5,5)	49,0 ± 1,0 (pH 5,5)	24,0 ± 0,0 (pH 6,1)	41,5 ± 4,7 (pH 6,1)
	80	26,0 ± 2,0 (pH 5,3)	50,5 ± 1,6 (pH 5,3)	28,0 ± 2,8 (pH 6,0)	45,0 ± 3,2 (pH 6,0)
	120	25,0 ± 1,4 (pH 5,1)	53,5 ± 3,5 (pH 5,1)	27,0 ± 3,2 (pH 6,0)	44,0 ± 3,2 (pH 6,0)
Bicarbonato 0,0147 mol.L ⁻¹	20	24,0 ± 0,0 (pH 6,4)	46,5 ± 0,7 (pH 6,4)	28,0 ± 0,0 (pH 6,3)	37,0 ± 4,0 (pH 6,3)
	50	27,0 ± 3,2 (pH 6,3)	50,5 ± 2,5 (pH 6,3)	28,0 ± 2,0 (pH 6,3)	40,5 ± 3,5 (pH 6,3)
	80	26,0 ± 2,0 (pH 6,2)	50,0 ± 2,0 (pH 6,2)	27,0 ± 1,4 (pH 6,3)	40,5 ± 2,5 (pH 6,3)
	120	25,0 ± 1,4 (pH 6,2)	48,5 ± 2,9 (pH 6,2)	27,0 ± 3,2 (pH 6,2)	40,5 ± 3,5 (pH 6,2)
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹	20	26,0 ± 2,8 (pH 6,5)	42,0 ± 3,2 (pH 6,5)	25,0 ± 3,2 (pH 6,5)	34,5 ± 3,5 (pH 6,5)
	50	26,0 ± 2,0 (pH 6,4)	46,5 ± 3,8 (pH 6,4)	24,0 ± 2,8 (pH 6,4)	39,0 ± 3,0 (pH 6,4)
	80	25,0 ± 3,2 (pH 6,4)	43,5 ± 3,5 (pH 6,4)	23,0 ± 3,2 (pH 6,4)	35,5 ± 1,6 (pH 6,4)
	120	25,0 ± 1,4 (pH 6,4)	43,5 ± 1,6 (pH 6,4)	23,0 ± 1,4 (pH 6,4)	33,5 ± 3,5 (pH 6,4)

O fermento biológico seco (embalagem contendo 110g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado.

4.8.4 - Correlação entre viabilidade celular, atividade fermentativa (crescimento de massa e evolução de CO₂) e teores de glicerol interno

A **Figura 20** mostra a correlação entre a viabilidade celular, a atividade fermentativa e os teores de glicerol interno para amostras do fermento coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio e após 30 dias de abertura em função do tempo de hidratação do fermento com soluções de aditivos.

A) Embalagem aberta no instante do ensaio

A hidratação com água pura (**Figura 20-A e C**) não apresentou correlação entre retenção de viabilidade e os teores de glicerol interno, enquanto as hidratações com lisina e bicarbonato mostraram-se inversamente proporcionais. A hidratação com água apresentou a menor retenção de viabilidade (juntamente com a lisina) e os menores teores de glicerol interno (juntamente com o bicarbonato). No entanto, a água apresentou os maiores volumes de massa e CO₂ (**Figura 20-E e G**) independentemente do tempo de hidratação. Portanto, conclui-se que a hidratação das amostras do fermento seco com água não apresentou correlação entre viabilidade, teores de glicerol interno e atividade fermentativa.

A lisina foi o aditivo que proporcionou a menor retenção de viabilidade (**Figura 20-A**) e os maiores teores de glicerol interno (**Figura 20-C**), enquanto o bicarbonato foi o aditivo que apresentou a maior retenção de viabilidade (**Figura 20-A**) e os menores teores de glicerol interno (**Figura 20-C**). Com lisina, onde os teores de glicerol interno foram mínimos (50 min de hidratação) o volume de massa foi máximo (**Figura 20-E**), enquanto onde os teores de glicerol interno foram máximos (80 min de hidratação) o volume de massa foi mínimo, ou seja, os teores de glicerol interno foram inversamente proporcionais ao crescimento de massa. Por sua vez a evolução de CO₂ (**Figura 20-G**) não apresentou correlação com os parâmetros analisados (viabilidade, glicerol interno e crescimento da massa).

A hidratação com bicarbonato apresentou viabilidade e volume de CO₂ (**Figura 20-A e G**) relativamente altos, enquanto os teores de glicerol interno e o volume de massa (**Figura 20-C e E**) foram baixos. Supõe-se que a retenção de viabilidade proporcionada pelo bicarbonato levou a uma evolução de CO₂ elevada, com isso teoricamente o volume de massa deveria ter sido alto, no entanto o crescimento da massa não depende somente do volume de CO₂ liberado, mas depende também da capacidade da massa reter o CO₂ produzido durante o processo de fermentação.

A hidratação com citrato apresentou os menores volumes de massa e CO₂ dentre os aditivos ensaiados (**Figura 20-E e G**). A viabilidade e os teores de glicerol interno não foram determinados com citrato por falta de tempo para realização do ensaio, uma vez que este ensaio demanda um tempo relativamente grande.

B) Embalagem aberta a 30 dias do ensaio

A hidratação com água proporcionou a menor retenção de viabilidade e os menores teores de glicerol interno (**Figura 20-B e D**), assim como ocorrido com as amostras coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio (**Figura 20-A e C**). Isso indica uma proporcionalidade entre a viabilidade e os teores de glicerol interno, ou seja, quanto maior a retenção de viabilidade, maiores os teores de glicerol interno e quanto menor a retenção de

viabilidade, menores os teores de glicerol interno. O glicerol interno é um indicativo de estresse, portanto tem-se que a hidratação do fermento seco com água proporciona a levedura uma condição de estresse menor quando comparada com a hidratação com os demais aditivos (lisina e bicarbonato). No entanto, essa redução no nível de estresse que a levedura é submetida, praticamente não tem importância, uma vez que se tem retenção de viabilidade baixa. Em relação ao crescimento da massa (**Figura 20-F**) nenhum tipo de correlação com os teores de glicerol interno (**Figura 20-D**) e com a evolução de CO₂ (**Figura 20-H**) foi observado. No entanto, o crescimento de massa foi inversamente proporcional a retenção de viabilidade, ou seja, onde o volume de massa foi máximo (20 e 50 min de hidratação) a viabilidade foi mínima, enquanto onde o volume de massa foi mínimo (80 e 120 min de hidratação) a viabilidade foi máxima.

A hidratação do fermento seco com lisina proporcionou retenção de viabilidade (**Figura 20-B**) máxima e teores de glicerol interno (**Figura 20-D**) mínimos após 50 min de hidratação, enquanto retenção de viabilidade mínima e teores de glicerol interno máximos foram obtidos após 80 min de hidratação. Portanto, conclui-se que a retenção de viabilidade foi inversamente proporcional aos teores de glicerol interno. Em relação ao crescimento da massa (**Figura 20-F**) os volumes obtidos foram praticamente constantes, exceto aos 50 min de hidratação onde o volume de massa foi levemente inferior aos obtidos nos demais tempos de hidratação ensaiados (20, 80 e 120 min). Por sua vez, a evolução de CO₂ (**Figura 20-H**) não apresentou correlação com os parâmetros analisados (viabilidade, glicerol interno e crescimento da massa).

A hidratação com bicarbonato apresentou retenção de viabilidade (**Figura 20-B**) e volumes de massa (**Figura 20-F**) relativamente altos, independente do tempo de hidratação, enquanto os teores de glicerol interno (**Figura 20-D**) foram altos somente aos 50-80 min de hidratação. Nesse caso observou-se uma correlação entre a viabilidade e o volume de massa, ou seja, quanto maior a viabilidade maior o volume de massa. Esses dados não se reproduziram quando amostras de fermento seco foram coletadas da embalagem aberta no instante do ensaio (**Figura 20-A e E**). Isso é um indicativo de que o bicarbonato é um aditivo de hidratação com alto poder de regeneração da estrutura celular, quando esta passa por processo de oxidação devido a exposição ao oxigênio e umidade do ar.

A hidratação com citrato apresentou os menores volumes de massa e CO₂ (**Figura 20-F e H**) dentre os aditivos ensaiados. A viabilidade e os teores de glicerol interno não foram determinados com citrato por falta de tempo para realização do ensaio, uma vez que este ensaio demanda um tempo relativamente grande.

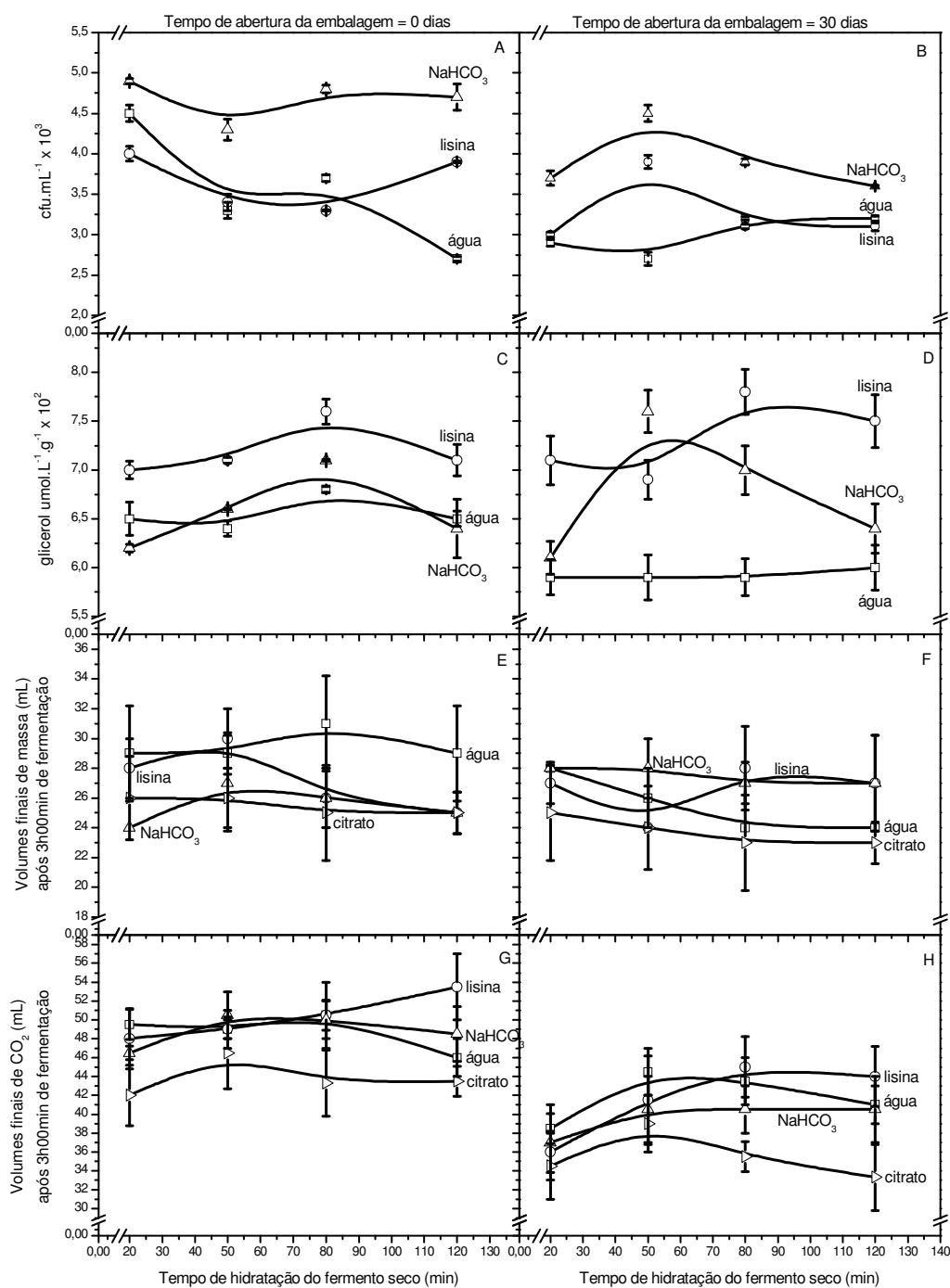


Figura 20 - Relação entre os dados descritos nas **Figuras 17-19** e **Tabela 16** para embalagens abertas no instante do ensaio (**Partes: A, C, E e G**) e após 30 dias (**Partes: B, D, F e H**): Soluções hidratantes utilizadas: água (□), lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (○), bicarbonato $0,0147 \text{ mol.L}^{-1}$ (△) e citrato $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ (▷). O fermento biológico seco (embalagem contendo 110g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

5 - CONCLUSÃO

5.1 - Quanto ao crescimento da massa

As hidratações diretas do fermento seco instantâneo com soluções de citrato $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 6,9 e 7,5 por 40 min a temperatura ambiente proporcionaram aumentos de 25-29% (35,4-36,6 mL/180 min de fermentação) em relação ao controle (28,3 mL/180 min de fermentação). No entanto, a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água por 10 min a temperatura ambiente proporcionou um volume de massa (36,0 mL/150 min de fermentação) tão bom quanto aos obtidos com citrato, mas com tempo de hidratação e fermentação menores. Portanto, conclui-se que a hidratação direta com água foi a melhor condição de hidratação obtida em relação ao crescimento de massa por necessitar de um menor tempo de hidratação (10 min) e um menor tempo de fermentação (150 min).

5.2 - Quanto a evolução de CO_2

As hidratações diretas do fermento seco instantâneo com soluções de glicose 2,0% e 0,5% por 40 min a temperatura ambiente proporcionaram aumentos de 33-38% (53,7-56,0 mL/180 min de fermentação) em relação ao controle (40,5 mL/180 min de fermentação). No entanto, a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água por 10 min a temperatura ambiente proporcionou um volume de CO_2 (79,0 mL/180 min de fermentação) maior que os anteriores obtidos com hidratação em glicose. Portanto, conclui-se que a hidratação direta com água por 10 min a temperatura ambiente foi a melhor condição de hidratação obtida em relação a evolução de CO_2 .

5.3 - Quanto a viabilidade celular

A hidratação direta do fermento seco instantâneo com solução de lisina $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ por 120 min a 37°C proporcionou aumento de 2,09 vezes ($15,1 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) em relação ao controle ($7,2 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$). No entanto, a hidratação direta do fermento seco instantâneo com água na faixa de 40-80 min a temperatura ambiente proporcionou viabilidades ($16,6 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$ e $16,4 \text{ cfu.mL}^{-1} \times 10^2$) maiores que as obtidas anteriormente (após hidratação com lisina). Portanto, conclui-se que a hidratação direta com água na faixa de 40-80 min a temperatura ambiente foi a melhor condição de hidratação obtida em relação a viabilidade celular.

5.4 - Como explicar, fisiologicamente, os aumentos em viabilidade celular não proporcionais a atividade de fermentação?

Este foi um resultado inesperado. O fermento requer energia para a sua multiplicação, mas parece que a fermentação não é a principal ou única via de geração de energia para a síntese de material celular. Os resultados obtidos com lisina, água e solução de bicarbonato

para os valores de glicerol interno indicam um desvio da via glicolítica para o acúmulo de glicerol que é um protetor osmótico bastante conhecido acumulado em situação de estresse de diversas formas. Assim, o aumento na síntese de glicerol seria devido mobilização de parte da trealose e isto deixaria uma quantidade menor deste açúcar de reserva para a atividade de fermentação da massa. Esta previsão só pode ser confirmada com o ensaio do teor de trealose.

Sabe-se que a proteólise celular aumenta em situação de estresse e assim espera-se que o teor de proteína interna diminua com o aumento da quantidade de glicerol interno.

5.5 - Melhor condição de hidratação

Para a escolha da melhor condição de hidratação deve-se levar em conta quais os parâmetros de maior importância. No caso, onde a levedura é hidratada e prontamente adicionada a massa sem nenhum tipo de estocagem (ex.: estocagem em congelador), acredita-se que a ordem de importância dos parâmetros é evolução de CO₂, crescimento de massa, e viabilidade celular. Aumento em viabilidade celular durante a hidratação seria de extrema importância no caso da estocagem de massa em congelador. Isto proporcionaria possivelmente a obtenção de uma massa congelada com menor perda em atividade de fermentação após a estocagem. **Portanto, conclui-se que a melhor condição de hidratação consiste em hidratar diretamente o fermento seco instantâneo com água por 10 min a temperatura ambiente.** Este resultado contraria os dados mais recentes encontrados na literatura (não foi realizado ensaio comparativo), onde se recomenda hidratar diretamente a levedura seca por 20 min a 37°C (ROUSTAN e SABLAYROLLES, 2002) e/ou por 20 min a 38°C (BELLISSIMI e INGLEDEW, 2004).

6 - PREVISÕES DE APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO

Espera-se que o aumento da viabilidade celular durante a hidratação permita obter uma massa congelada que perca menos atividade de fermentação durante a estocagem em congelador. Isto seria sem dúvida uma grande aplicação tanto com ou sem a presença de aditivo.

REFERÊNCIAS

- BÁGUENA, R.; SORIANO, M. D.; MARTINEZ-ANAYA, M. A.; DE BARBER, C. B. Viability and performance of pure yeast strains in frozen wheat dough. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 1690-1698, 1991.
- BECKER, M. J.; BLUMBERGS, J. E.; VENTINA, E. J.; RAPOPORT, A. I. Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 347-352, 1984.
- BELLISSIMI, E.; INGLEDEW, W. M. Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2205-2213, Sept. 2004.
- BENEY, L.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 513-516, June 2001.
- BRONN, W. K. Technology of dry baker's yeast production. In: _____. **The technology of yeast production**. cap. 8. Disponível em: <www.biotechnologie-kempe.de/part8.pdf>. Acesso em: 15 maio 2006.
- BURROWS, S.; HARRISON, J. S. Routine method for determination of activity of baker's yeast. **Journal of the Institute Brewing**, v. 65, p. 39-45, 1959.
- CLEGG, J. L. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. **Comparative Biochemistry Physiology Biochemistry Molecular Biology**, v. 128, n. 4, p. 613-624, Apr. 2001.
- CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 73-103, Oct. 1998.
- GERVAIS, P.; MARECHAL, P. A.; MOLIN, P. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeasts viability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 11, p. 165-170, Dec. 1992.
- GUGERLI, R.; BREGUET, V.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Immobilization as a tool control fermentation in yeast-leavened refrigerated dough. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 703-715, Sept. 2004.
- IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.10, p. 3604-3608, Oct. 1995.
- KETS, E. P. W.; BONT, J. A. M. Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. **FEMS Microbiology Letters**, v. 116, n. 3, p. 251-256, Mar. 1994.
- KRALLISH, I.; JEPSSON, H.; RAPOPORT, A.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 447-451, Apr. 1997.

KYOWA HAKKO KOGYO CORPORATION (Japan). T. Ano; K. Akawakami; Kumamaota-shi; K. Endo; Machida-shi. **Producing sake and baker's dry yeast**. US 3,536,498, 3 Aug. 1967, 27 Oct. 1970. 3 p.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, Oct. 1995.

MADIN, K. A. C.; CROWE, J. H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. **Journal of Experimental Zoology**, v. 193, n. 3, p. 335-342, 1975.

MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 617-622, Dec. 1994.

MURAKAMI, Y.; YOKOIGAWA, K.; KAWAI, F.; KAWAI, H. Lipid composition of commercial baker's yeasts having different freeze-tolerance in frozen dough. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 11, p. 1874-1876, Nov. 1996.

PEÑA, A.; SALVADOR, U.; CLEMENT, M.; SÁNCHEZ, N. Rehydration temperature is critical for metabolic competence and for membrane integrity in active dry yeast (ADY). **Archives of Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 75-80, July 1992.

PERES, M. F. S. **Caracterização fisiológica e estabilidade da levedura de panificação prensada armazenada após a lavagem com soluções de ácidos orgânicos fracos**. 2001. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências/Área-Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

PERES, M. F. S.; TININIS, R. C. S.; SOUZA, C. S.; WALKER, G. M.; LALUCE, C. Physiological responses of compressed baker's yeast cells pre-treated with citric, malic and succinic acids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 537-543, June 2005.

POIRIER, I.; MARECHAL, P. A.; RICHARD, S.; GERVAIS, P. *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 87-92, Jan. 1999.

RECONSTITUTION or rehydration of active dry wine yeast. Disponível em: <http://www.winegrowers.info/wine_making/yeast.htm>. Acesso em: 15 maio 2006.

ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M. Trehalose and glycogen in wine-making yeasts: methodological aspects and variability. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1059-1064, Apr. 2002.

SOUBEYRAND, V.; JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M. Rehydration protocols for active dry wine yeasts and the search for early indicators of yeast activity. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 57, n. 4, p. 474-480, 2006.

TAN, S. S.; VAN INGEN, C. W.; TALSMA, H.; VAN MILTENBURG, J. C.; STEFFENSEN, C. L.; VLUG, I. J. A.; STALPERS, J. A. Freeze-drying of fungi: influence of composition e glass transition temperature of the protectant. **Cryobiology**, v. 32, n. 1, p. 60-67, Feb. 1995.

TININIS, R. C. S. **Quantificação de parâmetros de fisiologia de leveduras relevantes na produção de massas congeladas para panificação**. 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

VAN DIJCK, P.; COLAVIZZA, D.; SMET, P.; THEVELEIN, J. M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 109-115, Jan. 1995.

VELLOSA, C. **Resistência ao calor e a secagem de fermentos comerciais de panificação quando pré-tratados com soluções de aditivos**. Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2006. 10 f. Relatório Bolsa CNPq PIBIC.

YEAST: treatese: section I. Disponível em:
<http://www.theartisan.net/The_Artisan_Yeast_Treatise_Section_One.htm>. Acesso em: 17 jan. 2006.

7 - APÊNDICE

APÊNDICE A - Figura 7: Curvas dos tempos de hidratação a temperatura ambiente em função do tempo de fermentação sobre a variação do volume de massa e evolução de CO_2 .

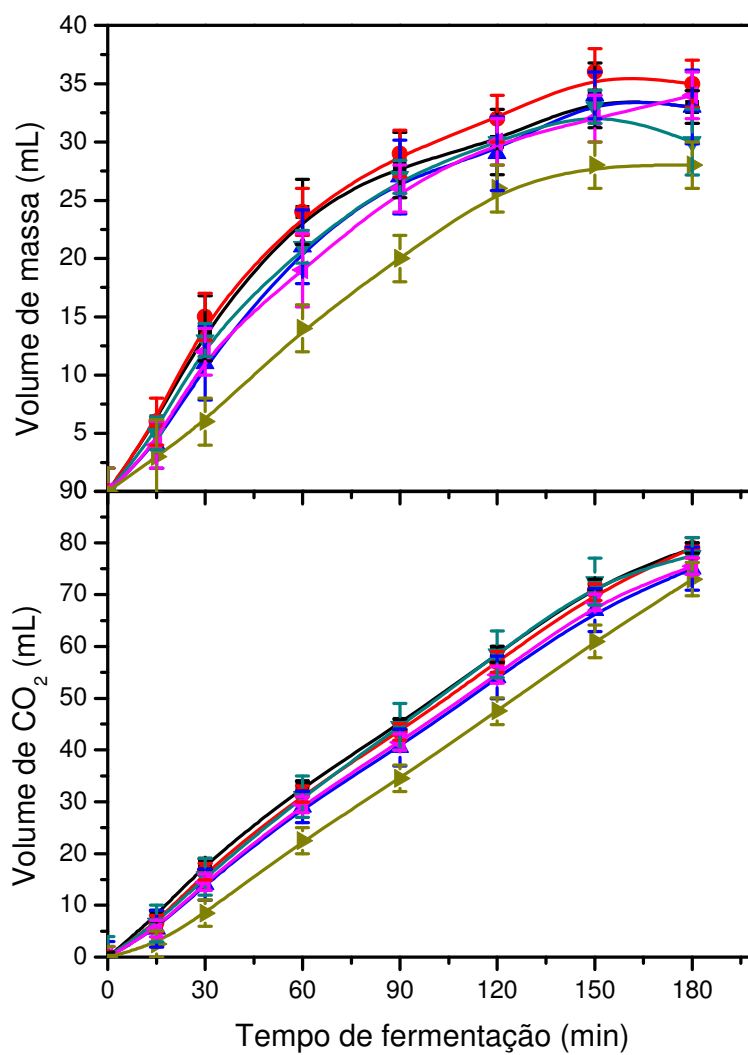


Figura 7 - Curva do tempo de hidratação a temperatura ambiente (27°C) sobre a variação no volume de massa e volume de CO_2 : 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (◆) e 120 min (▴). O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

APÊNDICE B - Figura 9: Curvas dos tempos de hidratação a 37°C em função do tempo de fermentação sobre a variação do volume de massa e evolução de CO₂.

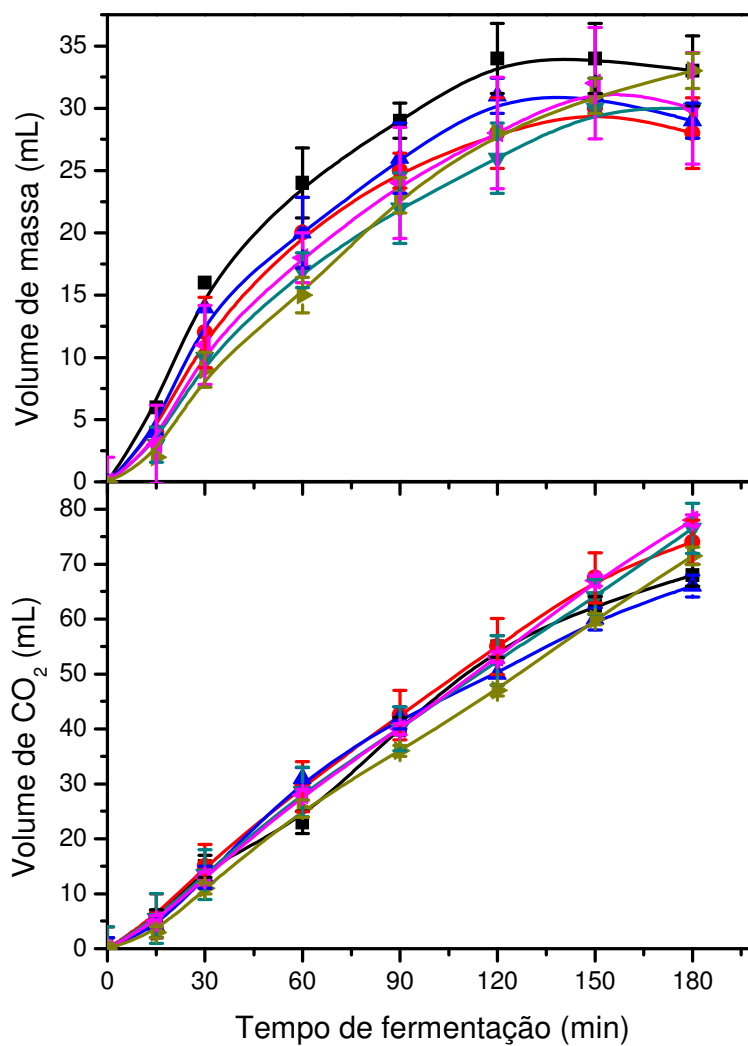


Figura 9 - Curva de tempo de hidratação a 37°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO₂: 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (★) e 120 min (▶). O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

APÊNDICE C - Figura 11: Curvas dos tempos de hidratação a 37°C em função do tempo de fermentação sobre a variação do volume de massa e evolução de CO₂.

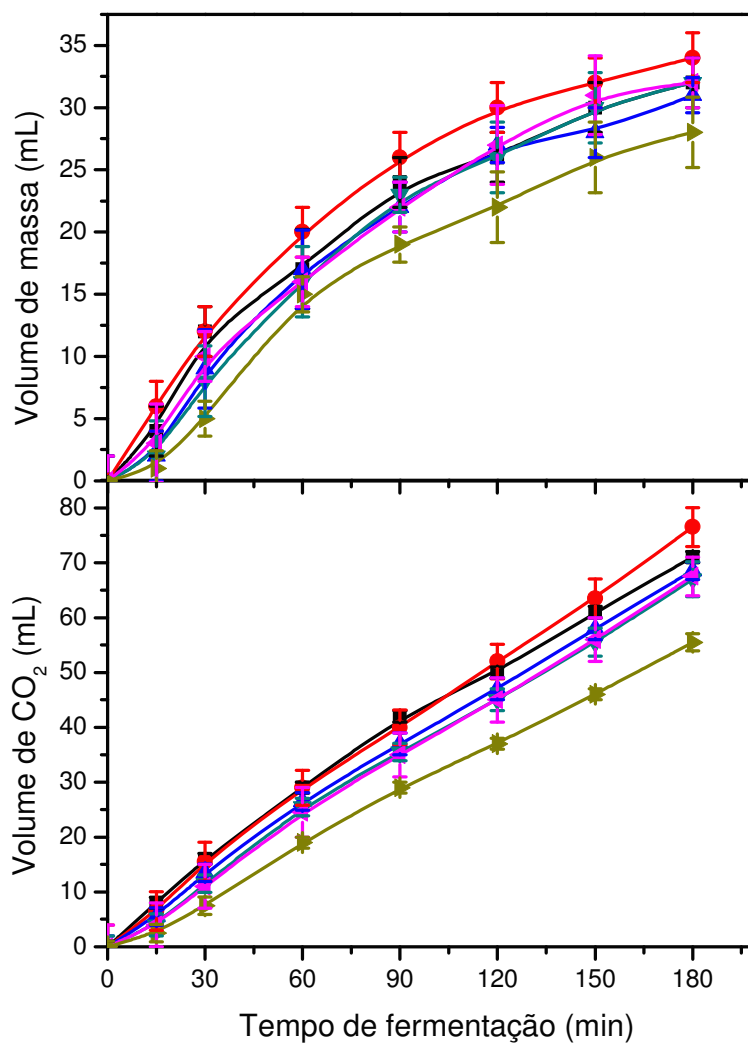


Figura 11 - Curva de tempo de hidratação a 40°C sobre a variação no volume de massa e volume de CO₂: 1 min (■); 10 min (●); 20 min (▲); 40 min (▼); 80 min (◆) e 120 min (▶). O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por “PAK GIDA” foi utilizado.

8 - DADOS EXPERIMENTAIS

Tabela 1 - Curva analítica do glicerol (referente a figura 4).

[$\mu\text{mol/L}$]	Padrão 2,26mM/L	Reagente (mL)	H ₂ O (μL)	Abs (570nm)	Média Abs
0	0	2	40,0	0,000 0,000	0,000 \pm 0,000
5	5,3	2	34,7	0,070 0,047	0,059 \pm 0,016
10	10,6	2	29,4	0,138 0,133	0,136 \pm 0,004
15	15,9	2	24,1	0,205 0,199	0,202 \pm 0,004
20	21,2	2	18,8	0,270 0,272	0,271 \pm 0,001
25	26,5	2	13,5	0,372 0,334	0,353 \pm 0,027
30	31,9	2	8,1	0,398 0,409	0,404 \pm 0,008
35	37,2	2	2,8	0,471 0,478	0,475 \pm 0,005

Tabela 2 - Comparação de dados das Figuras 6, 8 e 10. (referente as figuras 6, 8 e 10)

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de hidratação (min)	Velocidades (mL/min/0,15g de fermento $\times 10^{-2}$)		Volumes finais (mL)		Viabilidade (cfu.mL ⁻¹ $\times 10^2$)
		Crescimento de massa	Evolução de CO ₂	Massa	CO ₂	
27	10	41,9 \pm 2,3	52,5 \pm 1,3	36,0 \pm 2,0	79,0 \pm 2,0	12,91 \pm 0,28
	20	34,9 \pm 1,1	47,5 \pm 1,4	34,0 \pm 2,0	75,0 \pm 4,1	11,59 \pm 0,22
	40	36,5 \pm 1,9	51,3 \pm 1,0	33,0 \pm 1,4	77,5 \pm 3,5	16,59 \pm 0,11
	80	33,0 \pm 2,1	48,4 \pm 1,5	32,0 \pm 2,0	75,5 \pm 1,6	16,36 \pm 0,36
	120	22,5 \pm 0,8	39,9 \pm 0,7	28,0 \pm 2,0	73,0 \pm 3,2	13,02 \pm 0,10
37	10	34,3 \pm 1,8	48,9 \pm 1,2	30,0 \pm 0,0	74,0 \pm 4,0	8,19 \pm 0,39
	20	35,6 \pm 3,2	47,5 \pm 1,9	31,0 \pm 1,4	66,0 \pm 2,0	9,13 \pm 0,47
	40	30,7 \pm 3,8	46,5 \pm 1,4	30,0 \pm 0,0	76,5 \pm 4,5	9,05 \pm 0,22
	80	30,8 \pm 2,1	45,4 \pm 1,7	32,0 \pm 4,5	78,0 \pm 1,0	14,91 \pm 0,61
	120	25,5 \pm 1,0	40,3 \pm 2,9	31,0 \pm 1,4	71,5 \pm 1,6	7,19 \pm 0,66
40	10	34,9 \pm 1,6	48,7 \pm 1,0	34,0 \pm 2,0	76,5 \pm 3,5	6,56 \pm 0,09
	20	27,9 \pm 1,9	44,0 \pm 1,0	31,0 \pm 1,4	68,5 \pm 1,6	7,19 \pm 0,44
	40	26,0 \pm 1,6	41,0 \pm 2,1	32,0 \pm 1,4	67,0 \pm 3,2	9,51 \pm 0,35
	80	27,6 \pm 1,8	39,4 \pm 1,9	32,0 \pm 2,0	67,5 \pm 3,5	8,47 \pm 0,20
	120	22,5 \pm 2,8	31,3 \pm 1,3	28,0 \pm 2,8	55,5 \pm 1,6	7,50 \pm 0,11

O fermento biológico seco (embalagem contendo 10g) distribuído por Fermix e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA" foi utilizado

Tabela 3 - Efeito da hidratação do fermento seco^(*), com soluções de aditivos por 120 min a 37°C, sobre a viabilidade celular (referente a figura 12).

(Parte A) Solução hidratante	Média do nº de colônias/placa	V (µL) p/ obter 400 col/placa	cfu.mL ⁻¹ x 10 ²	(Parte B) Solução hidratante	Média do nº de colônias/placa	V (µL) p/ obter 400 col/placa	cfu.mL ⁻¹ x 10 ²
Água (controle) pH _{final} 4,7	52,0 ± 1,4	63	18,8 ± 0,6 (controle)	Água (controle) pH _{final} 4,3	118,5 ± 3,5	63	18,8 ± 0,6 (controle)
Glicose 0,5% pH _{final} 3,7	42,0 ± 1,4	62	17,1 ± 0,7	Glutâmico 0,08M pH _{final} 6,1	140 ± 4,2	58	24,1 ± 0,7
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹ pH _{final} 7,0	39,0 ± 2,8	55	15,1 ± 1,2	Glutâmico 0,08M (pH _{inicial} 7,5, ajustado) pH _{final} 6,6	163 ± 4,2	57	28,6 ± 0,7
Extrato de Levedura 1,0% pH _{final} 6,3	46,5 ± 0,7	58	17,7 ± 0,6	Lisina 0,08M pH _{final} 9,5	123,5 ± 4,9	52	23,8 ± 0,9
Extrato de Levedura 2,0% pH _{final} 6,5	46,0 ± 2,8	59	18,4 ± 1,2	Lisina 0,08M (pH _{inicial} 7,5, ajustado) pH _{final} 7,3	243,5 ± 2,1	62	39,3 ± 0,3
Bicarbonato 0,0147M (pH _{inicial} da solução 8,3 sem ajuste) pH _{final} da suspensão 7,7	31,5 ± 2,1	56	26,2 ± 2,4	---	---	---	---

^(*) Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 10g) e produzido em Istanbul, Turquia por "PAK GIDA".

Tabela 4 - Curva de tempo de hidratação do fermento seco instantâneo com Lisina 0,08 mol.L⁻¹ (ajustar o pH da solução 8,0) a 37°C (referente a figura 13).

Tempo de hidratação (min)	Média do nº de colônias/placa	V (µL) p/ obter 200 col/placa	cfu.mL ⁻¹ x 10 ²
1 (controle)	260,0 ± 17,0	63	41,3 ± 2,7
10	219,5 ± 12,0	57	38,5 ± 2,1
20	231,0 ± 4,2	70	33,0 ± 0,6
40	232,0 ± 11,3	64	36,3 ± 1,8
80	240,5 ± 16,3	66	36,4 ± 2,5
120	289,0 ± 7,1	60	48,2 ± 1,2

Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 10g) e produzido em Istanbul, Turquia por "PAK GIDA".

Tabela 5 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco instantâneo sobre a viabilidade celular (referente a figura 17).

Solução Hidratante	Tempo de abertura da embalagem	Viabilidade celular (cfu.mL ⁻¹ x10 ³)			
		20 min hidratação	50 min hidratação	80 min hidratação	120 min hidratação
Água	0	4,5 ± 0,10 (pH 4,8)	3,3 ± 0,10 (pH 4,6)	3,7 ± 0,04 (pH 4,4)	2,7 ± 0,03 (pH 4,3)
	10	5,1 ± 0,17 (pH 4,8)	3,8 ± 0,10 (pH 4,5)	3,7 ± 0,12 (pH 4,4)	4,2 ± 0,07 (pH 4,4)
	20	3,3 ± 0,02 (pH 5,0)	3,0 ± 0,08 (pH 4,5)	3,4 ± 0,08 (pH 4,4)	3,4 ± 0,08 (pH 4,3)
	30	2,9 ± 0,04 (pH 5,1)	2,7 ± 0,08 (pH 4,7)	3,2 ± 0,02 (pH 4,6)	3,2 ± 0,03 (pH 4,5)
Lisina 0,08 mol.L ⁻¹	0	4,0 ± 0,09 (pH 7,8)	3,4 ± 0,10 (pH 7,6)	3,3 ± 0,01 (pH 7,5)	3,9 ± 0,01 (pH 7,4)
	10	3,7 ± 0,05 (pH 7,6)	3,1 ± 0,10 (pH 7,6)	2,7 ± 0,04 (pH 7,3)	3,3 ± 0,05 (pH 7,3)
	20	3,0 ± 0,02 (pH 7,6)	2,7 ± 0,06 (pH 7,5)	2,9 ± 0,01 (pH 7,4)	3,0 ± 0,02 (pH 7,4)
	30	3,0 ± 0,03 (pH 7,6)	3,9 ± 0,08 (pH 7,6)	3,1 ± 0,03 (pH 7,5)	3,1 ± 0,05 (pH 7,5)
NaHCO ₃ 0,0147 mol.L ⁻¹	0	4,9 ± 0,03 (pH 7,5)	4,3 ± 0,13 (pH 7,4)	4,8 ± 0,05 (pH 7,4)	4,7 ± 0,16 (pH 7,4)
	10	3,9 ± 0,12 (pH 7,4)	3,5 ± 0,02 (pH 7,4)	3,7 ± 0,03 (pH 7,3)	4,2 ± 0,07 (pH 7,3)
	20	3,1 ± 0,03 (pH 7,5)	3,4 ± 0,10 (pH 7,4)	3,2 ± 0,09 (pH 7,4)	3,1 ± 0,12 (pH 7,3)
	30	3,7 ± 0,09 (pH 7,4)	3,5 ± 0,10 (pH 7,4)	3,9 ± 0,04 (pH 7,3)	3,6 ± 0,01 (pH 7,3)

Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 110g) e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA".

Tabela 6 - Efeitos do tempo de abertura da embalagem do fermento seco instantâneo sobre os teores de glicerol interno (referente a figura 19).

Solução Hidratante	Tempo de abertura da embalagem	Teores de glicerol interno ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \times 10^2$)			
		20 min de hidratação	50 min hidratação	80 min hidratação	120 min hidratação
Água	0	6,5 ± 0,17 (pH 4,9)	6,4 ± 0,08 (pH 4,6)	6,8 ± 0,03 (pH 4,7)	6,5 ± 0,08 (pH 4,8)
	10	5,8 ± 0,15 (pH 5,1)	6,6 ± 0,14 (pH 4,8)	5,6 ± 0,08 (pH 4,8)	5,3 ± 0,07 (pH 4,9)
	20	5,8 ± 0,25 (pH 5,0)	7,5 ± 0,31 (pH 4,7)	6,8 ± 0,32 (pH 4,7)	7,1 ± 0,30 (pH 4,9)
	30	5,9 ± 0,18 (pH 5,2)	5,9 ± 0,23 (pH 4,9)	5,9 ± 0,19 (pH 4,9)	6,0 ± 0,23 (pH 5,1)
Lisina 0,08 mol.L ⁻¹	0	7,0 ± 0,09 (pH 5,6)	7,1 ± 0,03 (pH 5,3)	7,6 ± 0,13 (pH 5,3)	7,1 ± 0,16 (pH 5,4)
	10	6,3 ± 0,14 (pH 5,9)	7,4 ± 0,18 (pH 5,6)	6,4 ± 0,11 (pH 5,6)	6,5 ± 0,09 (pH 5,5)
	20	8,9 ± 0,39 (pH 5,9)	9,0 ± 0,41 (pH 5,6)	9,3 ± 0,39 (pH 5,4)	7,7 ± 0,32 (pH 5,4)
	30	7,1 ± 0,25 (pH 6,1)	6,9 ± 0,20 (pH 5,9)	7,8 ± 0,23 (pH 5,8)	7,5 ± 0,27 (pH 6,4)
NaHCO ₃ 0,0147 mol.L ⁻¹	0	6,2 ± 0,04 (pH 6,2)	6,6 ± 0,01 (pH 6,2)	7,1 ± 0,01 (pH 6,3)	6,4 ± 0,03 (pH 6,4)
	10	6,0 ± 0,08 (pH 6,2)	7,4 ± 0,18 (pH 6,0)	7,2 ± 0,15 (pH 6,1)	6,7 ± 0,18 (pH 6,1)
	20	7,3 ± 0,35 (pH 6,4)	7,4 ± 0,37 (pH 6,3)	8,8 ± 0,38 (pH 6,2)	8,3 ± 0,39 (pH 6,2)
	30	6,1 ± 0,17 (pH 6,4)	7,6 ± 0,22 (pH 6,3)	7,0 ± 0,25 (pH 6,3)	6,4 ± 0,25 (pH 6,2)

Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 110g) e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA".

Tabela 7 (parte A) - Efeitos da hidratação do fermento seco instantâneo com soluções de aditivos a 37°C e do tempo de abertura da embalagem (embalagem aberta a 0 e 30 dias) sobre viabilidade celular, parâmetros fermentativos (crescimento de massa e evolução de CO₂) e teores de glicerol interno (referente a figura 20).

Solução Hidratante	Tempo de hidratação (min)	Embalagem aberta a 0 dias				Embalagem aberta a 30 dias			
		cfu.mL ⁻¹ x 10 ³	Massa (mL)	CO ₂ (mL)	[glicerol] μmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²	cfu.mL ⁻¹ x 10 ³	Massa (mL)	CO ₂ (mL)	[glicerol] μmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²
Água	20	4,5 ± 0,10 (pH 4,8)	29 ± 3,2 (pH 5,3)	49,5 ± 1,6 (pH 5,3)	6,5 ± 0,17 (pH 4,9)	2,9 ± 0,04 (pH 5,1)	28 ± 0,0 (pH 5,1)	38,5 ± 1,6 (pH 5,1)	5,9 ± 0,18 (pH 5,2)
	50	3,3 ± 0,10 (pH 4,6)	29 ± 1,4 (pH 4,9)	49 ± 2 (pH 4,9)	6,4 ± 0,08 (pH 4,6)	2,7 ± 0,08 (pH 4,7)	26 ± 2,0 (pH 4,9)	44,5 ± 2,5 (pH 4,9)	5,9 ± 0,23 (pH 4,9)
	80	3,7 ± 0,04 (pH 4,4)	31 ± 3,2 (pH 4,9)	50,5 ± 3,5 (pH 4,9)	6,8 ± 0,03 (pH 4,7)	3,2 ± 0,02 (pH 4,6)	24 ± 0,0 (pH 4,9)	43,5 ± 2,5 (pH 4,9)	5,9 ± 0,19 (pH 4,9)
	120	2,7 ± 0,03 (pH 4,3)	29 ± 3,2 (pH 5,0)	46 ± 2 (pH 5,0)	6,5 ± 0,08 (pH 4,8)	3,2 ± 0,03 (pH 4,5)	24 ± 0,0 (pH 5,0)	41,0 ± 2,0 (pH 5,0)	6,0 ± 0,23 (pH 5,1)
Lisina 0,08 mol.L ⁻¹	20	4,0 ± 0,09 (pH 7,8)	28 ± 2 (pH 5,8)	48 ± 3,2 (pH 5,8)	7,0 ± 0,09 (pH 5,6)	3,0 ± 0,03 (pH 7,6)	27 ± 1,4 (pH 6,4)	36,0 ± 2,2 (pH 6,4)	7,1 ± 0,25 (pH 6,1)
	50	3,4 ± 0,10 (pH 7,6)	30 ± 2 (pH 5,5)	49 ± 1 (pH 5,5)	7,1 ± 0,03 (pH 5,3)	3,9 ± 0,08 (pH 7,6)	24 ± 0,0 (pH 6,1)	41,5 ± 4,7 (pH 6,1)	6,9 ± 0,20 (pH 5,9)
	80	3,3 ± 0,01 (pH 7,5)	26 ± 2 (pH 5,3)	50,5 ± 1,6 (pH 5,3)	7,6 ± 0,13 (pH 5,3)	3,1 ± 0,03 (pH 7,5)	28 ± 2,8 (pH 6,0)	45,0 ± 3,2 (pH 6,0)	7,8 ± 0,23 (pH 5,8)
	120	3,9 ± 0,01 (pH 7,4)	25 ± 1,4 (pH 5,1)	53,5 ± 3,5 (pH 5,1)	7,1 ± 0,16 (pH 5,4)	3,1 ± 0,05 (pH 7,5)	27 ± 3,2 (pH 6,0)	44,0 ± 3,2 (pH 6,0)	7,5 ± 0,27 (pH 6,4)
NaHCO ₃ 0,0147 mol.L ⁻¹	20	4,9 ± 0,03 (pH 7,5)	24 ± 0 (pH 6,4)	46,5 ± 0,71 (pH 6,4)	6,2 ± 0,04 (pH 6,2)	3,7 ± 0,09 (pH 7,4)	28 ± 0,0 (pH 6,3)	36,0 ± 2,2 (pH 6,4)	6,1 ± 0,17 (pH 6,4)
	50	4,3 ± 0,13 (pH 7,4)	27 ± 3,2 (pH 6,3)	50,5 ± 2,5 (pH 6,3)	6,6 ± 0,01 (pH 6,2)	3,5 ± 0,10 (pH 7,4)	28 ± 2,0 (pH 6,3)	41,5 ± 4,7 (pH 6,1)	7,6 ± 0,22 (pH 6,3)
	80	4,8 ± 0,05 (pH 7,4)	26 ± 2 (pH 6,2)	50 ± 2 (pH 6,2)	7,1 ± 0,01 (pH 6,3)	3,9 ± 0,04 (pH 7,3)	27 ± 1,4 (pH 6,3)	45,0 ± 3,2 (pH 6,0)	7,0 ± 0,25 (pH 6,3)
	120	4,7 ± 0,16 (pH 7,4)	25 ± 1,4 (pH 6,2)	48,5 ± 2,9 (pH 6,2)	6,4 ± 0,03 (pH 6,4)	3,6 ± 0,01 (pH 7,3)	27 ± 3,2 (pH 6,2)	44,0 ± 3,2 (pH 6,0)	6,4 ± 0,25 (pH 6,2)

Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 110g) e produzido em Istambul, Turquia por "PAK GIDA".

Tabela 7 (parte B) - Efeitos da hidratação do fermento seco instantâneo com soluções de aditivos a 37°C e do tempo de abertura da embalagem (embalagem aberta a 0 e 30 dias) sobre os parâmetros fermentativos (crescimento de massa e evolução de CO₂) (referente a figura 20).

Solução Hidratante	Tempo de hidratação (min)	Embalagem aberta a 0 dias				Embalagem aberta a 30 dias			
		cfu.mL ⁻¹ x 10 ³	Massa (mL)	CO ₂ (mL)	[glicerol] μmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²	cfu.mL ⁻¹ x 10 ³	Massa (mL)	CO ₂ (mL)	[glicerol] μmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ x 10 ²
Citrato 0,15 mol.L ⁻¹	20	---	26 ± 2,8 (pH 6,5)	42 ± 3,2 (pH 6,5)	---	---	34,5 ± 3,5 (pH 6,5)	---	
	50	---	26 ± 2 (pH 6,4)	46,5 ± 3,8 (pH 6,4)	---	---	39,0 ± 3,0 (pH 6,4)	---	
	80	---	25 ± 3,2 (pH 6,4)	43,5 ± 3,5 (pH 6,4)	---	---	35,5 ± 1,6 (pH 6,4)	---	
	120	---	25 ± 1,4 (pH 6,4)	43,5 ± 1,6 (pH 6,4)	---	---	33,5 ± 3,5 (pH 6,4)	---	

Fermento biológico seco distribuído por Fermix (embalagem contendo 110g) e produzido em Istanbul, Turquia por "PAK GIDA".

