

MICHELLE SILVA RAMOS

**EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO OBTIDO DE FOLHAS
DE TRIGO NA CRIOPROTEÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Ramos, Michelle Silva, 1981-
R175e Extrato de proteínas estruturadoras de gelo obtido de folhas
2017 de trigo na crioproteção de *Saccharomyces cerevisiae* / Michelle
Silva Ramos. – Viçosa, MG, 2017.
xviii, 94f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mônica Ribeiro Pirozi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 72-86.

1. Alimentos - Conservação. 2. Fermento biológico. 3. ISP.
4. Massas congeladas. 5. Proteínas anticongelantes.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

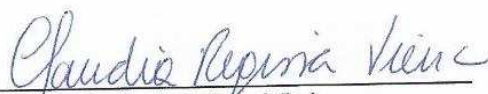
CDD 22 ed. 664.028

MICHELLE SILVA RAMOS

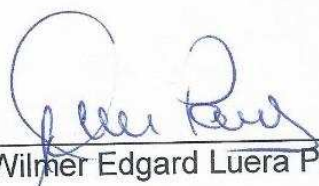
EXTRATO DE PROTEÍNAS ESTRUTURADORAS DE GELO OBTIDO DE FOLHAS DE TRIGO NA CRIOPROTEÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 01 de dezembro de 2017.



Claudia Regina Vieira
(Coorientadora)



Wilmer Edgard Luera Peña




Isabela Campelo de Queiroz



Monique Renon Eller



Alexandre Fontes Pereira



Mônica Ribeiro Pirozi
(Orientadora)

Aos meus pais,
pelo apoio, amor e princípios morais.
que formaram os alicerces da minha história de vida.

DEDICO

"Se cheguei até aqui foi porque me apoiei em ombros de gigantes"

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus, por essa grande conquista e por me guiar nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Afrânio e Emília e ao meu irmão Michel pelas orações, apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

À professora Mônica Ribeiro Pirozi (DTA/UFV), pela orientação, amizade, oportunidade e confiança.

À professora Edimar Aparecida Filomeno Fontes (DTA/UFV), pela orientação, auxílio e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Claudia Regina Vieira (ICA/UFMG), pela orientação, sugestões e disposição em dividir seus conhecimentos contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À professora Isabela Campelo Queiroz (IFSudeste/Campus Rio Pomba) pela amizade, auxílio, sugestões e contribuição com seus conhecimento para realização deste trabalho.

À professora Monique Renon Eller (DTA/UFV), pelo auxílio, sugestões e contribuição com seus conhecimentos que muito engrandeceu este trabalho.

Ao professor Wilmer Edgard Luera Peña (DTA/UFV), pela disponibilidade, auxílio, sugestões que foram de grande relevância para este trabalho.

Ao professor Alexandre Fontes Pereira (DEQ/UFV), pela amizade, disponibilidade, colaboração e sugestões que foram de grande importância para este trabalho.

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva (DZO/UFV), pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar nas análises estatísticas.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira (DPF/UFV) pelo empréstimo do medidor de luz (luxímetro).

Ao professor Paulo Regis Bandeira de Melo (IFSudeste/Campus Rio Pomba), pelas dicas e disponibilidade em contribuir com meu experimento.

Aos demais professores do (DTA/UFV) que contribuíram na minha formação transmitindo os seus conhecimentos.

À Embrapa Trigo pelo fornecimento das sementes de trigo BRS Guabiju usadas nesta pesquisa e ao professor Moacil Alves de Souza (DFT/UFV), por gentilmente intermediar a aquisição das sementes.

À empresa Vilma Alimentos, especialmente à Fernanda por gentilmente intermediar o fornecimento sem custos da farinha de trigo para realização do experimento com as massas de pão.

À empresa Macrogen Inc., Seoul Korea, pelo sequenciamento das leveduras isoladas dos fermento biológicos comerciais.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV), Lorena, Pollyana, Nélio, Pio, Perereca e Pererequinha, por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos (DTA/UFV) especialmente à laboratorista Talita, por me auxiliar nas análises de proteína.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL/UFV), especialmente à Claudia por me auxiliar na realização da eletroforese e ao Pedro pelo auxílio na análise de dados do sequenciamento das leveduras.

Ao Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos (DTA/UFV) pelo uso dos equipamentos, materiais e empréstimo de meios de cultura no início do experimento.

Ao Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (DTA/UFV) pela amizade e pelo uso da autoclave.

Ao Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos (DTA/UFV) por disponibilização de reagentes e equipamentos e, em especial à Mayara e Maria Ximena, por me auxiliar e dividir comigo seus conhecimentos.

Ao Laboratório de Micorrizas (Bioagro/UFV), ao Conrado, Marliane e Camila por me auxiliar na visualização microscópica das leveduras isoladas dos fermentos biológicos e por possibilitar a visualização microscópica das leveduras.

Ao Laboratório de Biotoxicologia e Biofisiologia (Entomologia/UFV), especialmente ao Wagner, Mateus Chediak, Angélica e Khalid pela boa vontade em me auxiliar na utilização do respirômetro nas análises de CO₂ das massas de pão.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais (IFSudeste – Campus Rio Pomba/MG) pela oportunidade de crescimento profissional, amizade, apoio e compreensão em relação aos meus horários e às minhas atividades de pesquisa na UFV.

Ao Pedro, da Oficina de Ótica/UFV, pela confecção das câmaras de vidro usadas nas análises de CO₂ das massas no respirômetro.

Ao Nelson, pela confecção das mini fôrmas para o acondicionamento das massas congeladas.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Cereais e Laboratório de Massas e Panificação, Ana Paula, Bruna Bernabé, Roberta, Lívia, Carol, Isabela, Rana, Mariana, Bruna Tonole, Talita, Juliana, Beatriz, Genilson, Thalles, Eduardo, Antônio Maradini e Cristiano pela colaboração na realização deste trabalho, amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração.

Ao meu amigo Wemerson Castro pelas valiosas dicas e sugestões de análises durante a elaboração do meu projeto de doutorado.

Aos meus amigos João Paulo de Sá, Daniele Ribeiro, Joashlenny Oliveira e Marcelle Rodrigues pela amizade, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis durante o meu doutorado.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

MICHELLE SILVA RAMOS, filha de Afrânio Cléber Ramos e Emília Fernandes da Silva Ramos, nasceu no Rio de Janeiro, no dia 13 de novembro de 1981.

Em 2005 ingressou no curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa/MG (UFV) concluído em 2009.

Em 2010, iniciou o curso de Especialização em Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Ouro Preto/MG (UFOP) com conclusão em 2012.

Ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa/MG (UFV) em 2011, com dissertação defendida em 2013. Neste mesmo ano, iniciou o Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa/MG (UFV) submetendo-se à defesa de tese no dia 01/12/2017.

Durante o doutorado, foi professora substituta no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais (IFSudeste – Campus Rio Pomba/MG) no período de março/2015 a fevereiro/2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
3.2. Aspectos gerais do fermento biológico na elaboração de massas	8
3.3. Congelamento de massas de pão	10
3.4. Efeito do congelamento na viabilidade das leveduras em massas	12
3.5. Consequências do congelamento nas propriedades da massa	15
3.6. Alternativas para minimizar os efeitos do congelamento na viabilidade do fermento biológico	18
3.7. Proteínas estruturadoras de gelo (ISP)	20
3.7.1. Formação e estrutura dos cristais de gelo	21
3.7.2. Interação entre as ISP e os cristais de gelo	23
3.7.3. Aplicação das ISP na manutenção da qualidade dos alimentos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Delineamento estatístico	27
4.2. Desenho experimental	28
4.3. Obtenção do extrato	29
4.3.1. Obtenção das folhas de trigo	29
4.3.2. Obtenção do extrato de ISP	30
4.3.3. Caracterização físico química do extrato de ISP	30
4.4. Caracterização dos fermentos biológicos comerciais	32
4.4.1. Análises físico-químicas	32
4.4.2. Isolamento e quantificação de leveduras	33
4.4.3. Confirmação da identidade de leveduras	33
4.4.4. Avaliação do crescimento microbiano	35
4.5. Efeito dos extratos sobre a viabilidade das leveduras	36

4.5.1. Avaliação do efeito da adição dos extratos de ISP sobre a viabilidade das leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais quanto ao congelamento em meio de cultura.....	36
4.6. Análise microscópica das estirpes de leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais congeladas em meio contendo diferentes concentrações de ISP	38
4.7. Efeito do extrato de ISP sobre as leveduras durante o congelamento em massas	39
4.7.1. Determinação da resistência das leveduras na massa após o congelamento	42
4.7.2. Avaliação da produção de CO ₂ pelas leveduras	42
4.7.3. Avaliação do volume da massa	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Análise físico-química dos extratos de ISP.....	44
5.2. Análise da composição físico química dos fermentos biológicos comerciais	47
5.3. Isolamento e quantificação das estirpes de leveduras dos fermentos biológicos comerciais	48
5.4. Confirmação da identidade das leveduras dos fermentos biológicos comerciais	48
5.5. Avaliação do crescimento das leveduras isoladas dos fermentos biológicos comerciais	49
5.6. Avaliação do efeito da adição do extrato de ISP sobre a viabilidade das leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais quanto ao congelamento em meio de cultura.....	51
5.7. Análise microscópica das estirpes de leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais congeladas em meio contendo diferentes concentrações de ISP	57
5.8. Determinação do efeito do extrato de ISP sobre a viabilidade das leveduras na massa após o congelamento.....	63
5.9. Avaliação da produção de CO ₂ pelas leveduras	65
5.10. Avaliação do volume da massa	68
6. CONCLUSÃO	69
7. PERSPECTIVAS	71

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO 1 - Etapas de obtenção do extrato de ISP de folhas de trigo e etapas da elaboração de massas congeladas.	87
ANEXO 2 – Confirmação da identidade das leveduras.....	89
ANEXO 3 – Resumo das análises de variância	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de oligonucleotídeos para reação de amplificação.	34
Tabela 2- Formulação da massa de pão francês.	39
Tabela 3- Valores de médias e desvio padrão do teor de umidade ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), de sólidos totais ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), proteínas ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e cinzas (%) nos fermentos biológicos fresco e seco instantâneo.	47
Tabela 4- Contagem em placas de leveduras dos fermentos biológicos comerciais.	48
Tabela 5- Identificação molecular dos isolados dos fermento biológicos comerciais fresco e seco instantâneo por sequenciamento da região D1/D2 do rRNA do gene 26S via <i>software</i> BLAST.	49
Tabela 6- Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> ($\log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	51
Tabela 7- Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> ($\log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	51
Tabela 8- Contagem de células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> em câmara de Neubauer ($\log \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	53
Tabela 9- Contagem de células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> em câmara de Neubauer ($\log \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	53
Tabela 10- Porcentagem de perda de viabilidade de células de <i>S. cerevisiae</i> em isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	55
Tabela 11- Porcentagem de perda de viabilidade de células de <i>S. cerevisiae</i> isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.	56
Tabela 3A - Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento ($- 25 \text{ }^\circ\text{C}$) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.	90

Tabela 3B - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (viabilidade) isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	90
Tabela 3C - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (inviabilidade) isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	91
Tabela 3D - Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	91
Tabela 3E - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (viabilidade) isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	92
Tabela 3F - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (inviabilidade) isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	92
Tabela 3G - Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) contendo 0 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	93
Tabela 3H - Resumo da análise de variância da avaliação da produção de CO ₂ pelas leveduras em massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) 0 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	93
Tabela 3I - Resumo da análise de variância da avaliação do volume das massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) contendo 0 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g ⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Micrografia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes estágios de brotamento.	4
Figura 2- Esquema simplificado das principais vias do metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figura 3- Representação esquemática de um cristal de gelo.	22
Figura 4- Morfologia de um cristal de gelo. A: Sem a presença da ISP, crescimento em todas os planos; B: Com a presença da ISP, crescimento ao longo do plano prisma.	24
Figura 5- Modelo “botão colchão” da interação das ISP com a superfície do gelo. A: aderência das ISP na superfície do gelo. B: alteração da morfologia do gelo após a aderência das ISP na superfície.	24
Figura 6- Esquema experimental.	28
Figura 7- Etapas da preparação da massa de pão francês congelada.	41
Figura 8- Respirômetro do tipo CO ₂	43
Figura 9- Medição do volume da massa. A: massa pressionada até 10 mL antes da incubação; B: aumento do volume da massa após a incubação (30 °C/3 h).	44
Figura 10- Perfil proteico em SDS-PAGE do extrato obtido pelo cultivar de trigo BRS Guabiju aclimatado ao frio. As setas indicam as bandas de proteínas presentes no extrato.	45
Figura 11- Curvas de crescimento das estirpes de leveduras isoladas de fermento biológico fresco (MScF) e fermento biológico seco instantâneo (MScS) em meio de cultura YPG.	50
Figura 12- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico fresco antes do congelamento (tempo 0) (aumento de 100 x).	58
Figura 13- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo antes do congelamento (tempo 0) (aumento de 100 x). .	59
Figura 14- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico fresco após o congelamento (tempo 40) (aumento de 100 x). As setas indicam injúria celular.	61
Figura 15- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo após o congelamento (tempo 40) (aumento de 100 x). As setas indicam injúria celular.	62

Figura 16- Viabilidade de leveduras ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) em massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.	64
Figura 17- Variação da produção de CO_2 pelas leveduras ($\mu\text{L.h}^{-1}$) em massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.	66
Figura 18- Variação do volume (mL) das massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.	68
Figura 1A- Resumo das etapas da obtenção do extrato de ISP de folhas de trigo da cultivar BRS Guabiju. A: Plantio do trigo em condições aclimatadas ao frio; B: Impregnação à vácuo das folhas; C: Obtenção das folhas impregnadas; D: Folhas trituradas; E: Filtração à vácuo após centrifugação; F: Extrato de ISP obtido após pasteurização.	87
Figura 1B- Resumo das etapas de elaboração das massas congeladas. A: Mistura em masseira; B: Boleamento; C: Pesagem da massa em porções de 25 g; D: Boleamento após pesagem e modelagem manual; E: Acondicionamento em mini fôrmas; F: Acondicionamento em embalagens individuais após congelamento.	88
Figura 2A- Alinhamento das sequências consenso de leveduras isoladas de fermento biológico comercial. 25MIC: Levedura isolada de fermento biológico fresco; 26MIC: Levedura isolada de fermento biológico seco instantâneo.	89

RESUMO

RAMOS, Michelle Silva, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Extrato de proteínas estruturadoras de gelo obtido de folhas de trigo na crioproteção de *Saccharomyces cerevisiae***. Orientadora: Mônica Ribeiro Pirozi. Coorientadoras: Edimar Aparecida Filomeno Fontes e Claudia Regina Vieira.

O fermento biológico é o elemento responsável pela fermentação dos açúcares presentes na massa de pão produzindo etanol, produtos secundários responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor e dióxido de carbono, indispensável para conferir volume aos pães. Durante o congelamento de massas, podem ocorrer diversas alterações fisiológicas que comprometem o metabolismo das leveduras e, conseqüentemente, a sua atuação como ingrediente, afetando consideravelmente a qualidade dos pães. Proteínas estruturadoras de gelo (ISP) são substâncias obtidas a partir de fontes naturais e apresentam grande potencial na manutenção da qualidade de alimentos congelados. O principal objetivo deste estudo foi investigar o efeito crioprotetor do extrato de ISP obtido a partir de folhas de trigo da variedade BRS Guabiju durante o congelamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Extratos de ISP foram obtidos após 25 dias de aclimação e a existência de ISP no extrato foi confirmada por eletroforese (SDS-PAGE) pela presença de duas bandas proteicas, uma de 20,1 kDa e outra na faixa de 20,1 kDa - 30,0 kDa. Diferentes concentrações do extrato de ISP (0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína .100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG) foram utilizados para avaliar o efeito crioprotetor de leveduras isoladas de fermento biológico fresco e seco instantâneo congeladas a - 25 °C durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias. A concentração de 8 µg de proteína .100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG foi a que apresentou melhor crioproteção (P<0,05) na manutenção da sobrevivência das leveduras, durante o tempo de estocagem. Considerando estes resultados, a concentração de 8 µg de proteína foi incorporada em massas de pão francês (8 µg de proteína .100 g⁻¹ massa). As massas foram congeladas a - 25 °C durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias e a viabilidade, capacidade fermentativa do fermento biológico e o volume das massas foram avaliados. As ISP apresentaram propriedades crioprotetoras para o fermento biológico (P<0,05) apresentando menor redução de células durante o tempo de congelamento comparado ao controle, embora ambas tenham produzido quantidade similar de CO₂, houve um declínio progressivo da produção de CO₂ de ambos os tratamentos em função do tempo de

armazenamento da massa. A concentração de 8 μg de proteína. 100 g^{-1} massa exerceu crioproteção às leveduras durante o tempo de armazenamento das massas ($P < 0,05$). Com base em estudos anteriores, acredita-se que este resultado também esteja associado ao efeito crioprotetor do extrato de ISP na estrutura da rede de glúten. Concluiu-se que o extrato de ISP da variedade de trigo BRS Guabiju exerceu atividade crioprotetora no fermento biológico sugerindo a possibilidade de utilização comercial dessas proteínas em massas de pão congeladas.

ABSTRACT

RAMOS, Michelle Silva, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, December, 2017 **Extract ice structuring proteins obtained from wheat leaves in the cryoprotection of *Saccharomyces cerevisiae***. Advisor: Mônica Ribeiro Pirozi. Co-Advisors: Edimar Aparecida Filomeno Fontes and Claudia Regina Vieira.

The yeast is the element responsible for the fermentation of the sugars present in the bread dough producing ethanol, secondary products responsible for the development of aroma and flavor and carbon dioxide, indispensable to give volume to the bread. During the freezing of dough, several physiological changes can occur that compromise the metabolism of the yeasts and, consequently, their action as an ingredient, affecting considerably the quality of the breads. Ice structuring proteins (ISP) are substances obtained from natural sources and have great potential in maintaining the quality of frozen foods. The main objective of this study was to investigate the cryoprotective effect of the ISP extract obtained from wheat leaves of the BRS Guabiju variety during the freezing of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ISP extracts were obtained after 25 days of acclimation and the existence of ISP in the extract was confirmed by electrophoresis (SDS-PAGE) by the presence of two protein bands, one of 20,1 kDa and another in the range of 20,1 kDa-30,0 kDa. Different concentrations of the ISP extract (0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg and 12 µg of protein. 100 mL⁻¹ of YPG culture medium) were used to evaluate the cryoprotectant effect of yeasts isolated from fresh and dry yeast frozen at -25 ° C for 0, 10, 20, 30 and 40 days. The concentration of 8 µg of protein. 100 mL⁻¹ of YPG culture medium was the one that presented better cryoprotection (P<0,05) in maintaining yeast survival during storage time. Considering these results, the concentration of 8 µg of protein was incorporated into French bread doughs (8 µg of protein .100 g⁻¹ dough). The dough was frozen at -25 ° C for 0, 10, 20, 30 and 40 days and the viability, fermentative capacity of the yeast and the volume of the dough were evaluated. The ISP presented cryoprotectant properties for the yeast (P<0,05), presenting lower cell reduction during the freezing time compared to the control, although both produced similar amount of CO₂, there was a progressive decline in CO₂ production of both treatments as a function of storage time of the dough. The concentration of 8 µg protein. 100 g⁻¹ dough exerted cryoprotection to the yeasts during the time of dough storage (P<0,05). Based on previous studies, it is believed that this result is also associated with the

cryoprotective effect of the ISP extract on the structure of the gluten network. It was concluded that the ISP extract of wheat variety BRS Guabiju exercised cryoprotective activity in yeast suggesting the possibility of commercial use of such proteins in frozen doughs.

1. INTRODUÇÃO

O congelamento como metodologia de conservação de massas de pão é cada vez mais desejável para o setor de panificação devido à comodidade e flexibilidade de produção, além de atender as exigências dos consumidores por produtos frescos, ou seja, forneados recentemente e disponíveis a qualquer horário do dia (KECHINSKI et al., 2010; SASANO et al., 2012; VIEIRA, 2011). Esses alimentos, quando submetidos ao congelamento e descongelamento, podem sofrer variações na qualidade, pois este processo pode desencadear uma série de modificações nas propriedades de panificação, como danos na rede de glúten, redução da capacidade de retenção de CO₂, alterações na textura, comprometimento na viabilidade do fermento biológico, modificando as características finais do produto (SASANO et al., 2012; USTUN e TURHAN, 2015; XU et al., 2009; YI e KERR, 2009).

Saccharomyces cerevisiae é a levedura responsável pela fermentação dos açúcares presentes na massa de pão, produzindo etanol, produtos secundários como aldeídos, ácidos, cetonas e ésteres responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor e dióxido de carbono (BIRCH et al, 2013; HEITMANN, 2017; MAEDA et al. 2009; STRUYF et al., 2017; THOMAZ, 2008), indispensável para conferir volume. A conservação da massa sob congelamento afeta a viabilidade do fermento biológico, pois à medida que ocorre a diminuição da temperatura, a fração aquosa contida na célula da levedura é reduzida. Dessa forma ocorre a concentração e precipitação de solutos extra e intracelulares, ruptura de membranas, encolhimento das células, desidratação e toxicidade iônica, que podem resultar em prejuízos para a qualidade do pão (PANADERO; RANDEZ-GIL e PRIETO 2005; RIBOTTA e TADINI, 2009). Diante disso, tem-se buscado desenvolver e utilizar métodos que minimizem os efeitos adversos em massas congeladas causados pelas baixas temperaturas de forma a prolongar a sua durabilidade (SELOMULYO e ZHOU, 2007) e garantir a integridade do produto final.

As proteínas estruturadoras de gelo (*Ice Structuring Proteins* - ISP) também reportadas na literatura como proteínas anticongelantes (*Antifreeze Proteins* - AFP) ou proteínas da histerese térmica (*Thermal Hysteresis Proteins* - THP), são substâncias encontradas em várias plantas de inverno e em diversos gêneros de organismos que habitam regiões frias ou toleram baixas

temperaturas. Estes anticongelantes biológicos possuem a capacidade de interagir com as nucleações dos cristais de gelo, alterando sua morfologia e impedindo a recristalização. Suas propriedades crioprotetoras se baseiam na diminuição da temperatura de expansão macroscópica do gelo, sem alteração do ponto de fusão e pressão osmótica. Dessa forma, sendo estas substâncias têm sido propostas para o aumento da vida de prateleira e melhoria da qualidade de alimentos submetidos ao congelamento (HASSAS-HUDSARI, 2012; MISHRA e PATTNAIK, 1999). Alguns pesquisadores têm relatado o potencial das ISP na preservação da rede de glúten durante o congelamento de massas (VIEIRA, 2011; XU et al., 2009; ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2015), mas ainda não foram encontrados registros do impacto dessas substâncias na viabilidade das leveduras na massa durante seu armazenamento sob congelamento.

As características das ISP sugerem sua potencial aplicação na manutenção da viabilidade da levedura em massas congeladas, evitando alterações na atividade celular, conseqüentemente no incremento da vida de prateleira além de garantir um produto de qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ✓ Investigar o efeito crioprotetor do extrato de proteínas estruturadoras de gelo das folhas de trigo na viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato proteico das folhas de trigo aclimatadas ao frio;
- ✓ Analisar a composição físico-química dos extratos e a presença de ISP por eletroforese em SDS-PAGE;
- ✓ Caracterizar os fermentos biológicos fresco e seco instantâneo quanto a composição físico química, confirmar a identidade e avaliar o crescimento das estirpes isoladas dos fermentos;
- ✓ Avaliar a viabilidade da levedura isolada de fermento biológico fresco e seco instantâneo na ausência e presença do extrato proteico das folhas de trigo;
- ✓ Examinar o efeito crioprotetor do extrato proteico das folhas de trigo no fermento biológico em massa de pão francês congelada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

O gênero *Saccharomyces* é um dos principais micro-organismos que fazem parte do grupo das leveduras, sendo o principal representante a espécie *cerevisiae* (SILVA et al., 2011). As leveduras do gênero *Saccharomyces* são fungos ubiquitários, unicelulares, com ausência de filamentos, morfologicamente esféricas ou ovais, assexuados, multiplicam-se por brotamento ou gemulação (leveduras de brotamento) e se dividem formando células diferenciadas. À medida que as células se dividem, a população de leveduras aumenta exponencialmente. A sua multiplicação consiste na formação de uma protuberância ou broto na região periférica da levedura (célula parental), que com o passar do tempo este broto se separa da célula parental e cresce até formar uma célula normal (Figura 1) (CAUVAIN e YOUNG, 2009; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

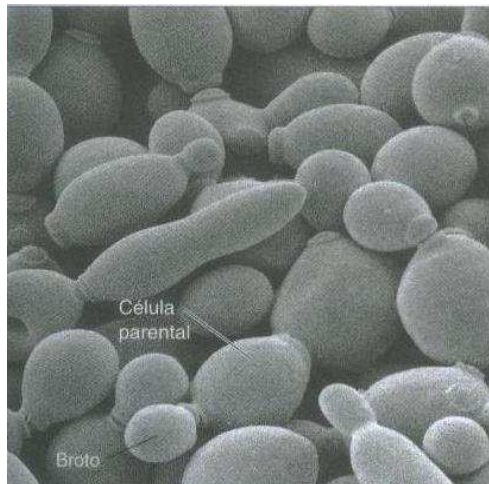


Figura 1- Micrografia de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes estágios de brotamento.

Fonte: Tortora, Funke e Case (2000).

Em condições adversas, a levedura pode se reproduzir por esporulação. Este evento ocorre quando não há nutrientes suficiente para a célula. Para cada célula, quatro esporos podem ser formados sendo estes liberados no ambiente. Na forma esporulada, a viabilidade das células se mantém por longos períodos

e posteriormente, quando a célula encontrar condições favoráveis, a levedura assumirá a sua forma vegetativa (WILLIAMS e PULLEN, 2009).

As leveduras são aeróbias facultativas, o que permite a sua sobrevivência em qualquer ambiente. Na presença de oxigênio, as leveduras utilizam o seu metabolismo aeróbico, o carboidrato é metabolizado resultando a formação de CO₂ e água. Anaerobicamente, o carboidrato é metabolizado com formação de CO₂ e etanol. Em leveduras utilizadas em processos de panificação, a capacidade respiratória e fermentativa são equivalentes, o metabolismo oxidativo corresponde a 40 % a 50 % do catabolismo celular (BROCK et al., 1994; KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990; RAY, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012; WILLIAMS e PULLEN, 2009).

A principal fonte energética para *S. cerevisiae* são os carboidratos. Dentre os carboidratos utilizados para o metabolismo do carbono pelas leveduras, os mais amplamente estudados são os dissacarídeos (maltose e sacarose) e as hexoses (glicose, frutose, galactose ou manose) (RODRIGUES et al., 2005). No entanto, *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar as pentoses. Na maioria das vias metabólicas, a glicose é o principal substrato (FELDMANN, 2012; NELSON e COX et al., 2007), podendo ser utilizada para obtenção de energia e atua como precursor na síntese de diversos compostos e macromoléculas essenciais para a célula (PASTORE; BICAS e JÚNIOR 2013).

A glicólise ou a via Embden-Myerhof-Parnas (EMP) é a principal via utilizada pelas leveduras para o catabolismo de carboidratos. De acordo com Pastore, Bicas e Júnior (2013), a glicose, uma vez dentro da célula, é catabolizada por diversos processos de degradação resultando na formação do ácido pirúvico. O ácido pirúvico pode ser levado por duas vias distintas para produção de energia celular: a via oxidativa e a via fermentativa (Figura 2) (FELDMANN, 2012; LEHNINGER et al., 2007).

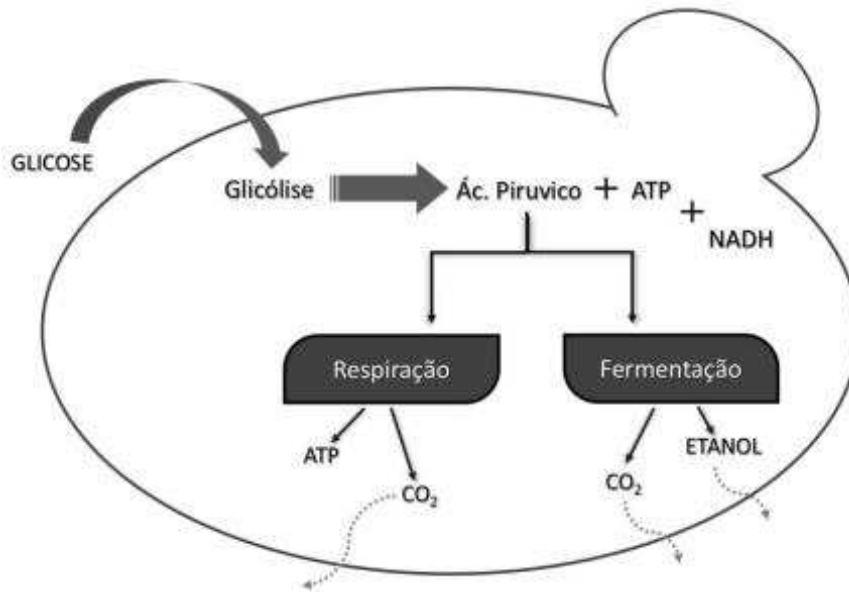


Figura 2- Esquema simplificado das principais vias do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

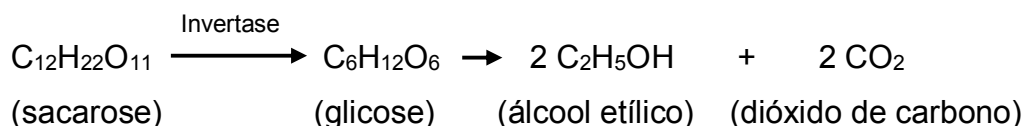
Fonte: Xavier (2015)

Cada célula é delimitada por uma parede celular que envolve a membrana plasmática. A parede celular é composta por glicoproteínas altamente glicosiladas, identificadas por manoproteínas, devido à presença de manose e duas classes de β -glucanas, as solúveis em água e altamente ramificadas, 1,6- β -glucanas que interliga a maioria das manoproteínas à 1,3- β -glucanas que são insolúveis em água. Esta última, associada à quitina, é responsável pela resistência mecânica da parede celular (DICKINSON e SCHWEIZER, 2004). Dentro desta estrutura encontra-se o citoplasma que é permeado pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. No interior do citoplasma, são dispostos o núcleo, as mitocôndrias e o vacúolo. A parede celular da levedura pode exibir cicatrizes, que são causadas no momento de reprodução (brotamento) (CAUVAIN e YOUNG, 2009; LEWIS e YOUNG, 1995).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem morfologia arredondada caracterizadas por células esféricas, ovais ou alongadas de tamanho entre 5 a 10 micra. O metabolismo de *S.cerevisiae* é influenciado pelo pH, sendo sua faixa de tolerância entre 2,5 a 8,5. A faixa de pH ótimo para crescimento de *S. cerevisiae* pode variar de 4 a 6, dependendo da cultura, da temperatura e da presença de oxigênio (NARENDRANATH e POWER, 2005), sendo que, em processos de panificação, o pH deve estar em torno de 5,5. (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012; WILLIAMS e

PULLEN, 2009). A temperatura ótima para fermentação situa-se entre 28 °C a 32 °C, portanto é classificada como um micro-organismo mesofílico. Temperaturas menores aumentam o período de fermentação e acima de 40 °C a fermentação é reduzida ou interrompida (BADIN, 2010; NOGUEIRA e VENTURINI-FILHO, 2005; STUPIELLO e HORII, 1981).

Cientificamente, *Saccharomyces cerevisiae* significa “um bolor que fermenta açúcar de cereal (sacaro-mucus cerevisiae)” (WILLIAMS e PULLEN, 2009), sendo amplamente utilizada como ingrediente essencial em processos de panificação (HEITMANN, 2017) devido à sua atividade fermentativa produzindo CO₂ e conferindo também propriedades de sabor e aroma do pão proveniente do seu metabolismo secundário, elementos estes desejáveis para as características sensoriais de pães. Cerca de 1,5 x 10¹⁰ células de leveduras estão presentes em 1 g de fermento (BIRCH et al, 2013; CAUVAIN e YOUNG, 2009; MAEDA et al. 2009; SILVA et al., 2011; STRUYF et al., 2017; WILLIAMS e PULLEN 2009). Além desses atributos associados à levedura, o fermento biológico também influencia diretamente nas propriedades reológicas da massa, definindo a sua consistência, a aeração e a leveza da massa (PAVANELLI, 2000; QUAGLIA, 1991). A ação do fermento biológico pode ser demonstrada da seguinte forma:



A produção de CO₂ na massa pelas leveduras depende do número de células viáveis, da atividade celular e a quantidade de açúcares fermentáveis. (PHIMOLSIRIPOL et al., 2008).

Durante a fermentação, as leveduras também provocam modificações nas proteínas presentes na massa. Enzimas proteolíticas sintetizadas por estes micro-organismos quebram as cadeias proteicas formando peptídeos menores. Esses por sua vez são utilizados pelas leveduras como nutrientes. As peptidases quebram os peptídeos em aminoácidos, os quais conferem características sensoriais na massa (GUERREIRO, 2006).

A capacidade fermentativa das leveduras representada pelo poder de gaseamento e volume de massas frescas foi classificada por Meziani et al.

(2012) em 3 fases designadas como: fase lag, fase exponencial e fase de redução da produção de CO₂. Estes autores observaram que a fase lag, à temperatura de 28 °C, apresenta duração de 0 a 30 min e é neste momento que ocorre a adaptação do metabolismo da levedura à massa. Na fase exponencial, a fermentação é máxima e constante com elevada produção de CO₂ entre 65 a 180 min. Após 180 min de fermentação, ocorre a redução da produção de gás pelas leveduras.

3.2. Aspectos gerais do fermento biológico na elaboração de massas

O fermento biológico é definido como um produto obtido de culturas puras de leveduras (*S. cerevisiae*) por procedimento tecnológico adequado e empregado para dar sabor próprio e aumentar volume e a porosidade de produtos forneados, podendo ser empregados no preparo de pães e certos tipos de biscoitos e produtos afins de confeitaria” (BRASIL, 1977).

Na produção comercial de fermento biológico por reprodução, é necessária uma fonte de carboidrato, atualmente, utiliza-se preferencialmente o melaço, por ser uma fonte de açúcar de baixo custo. Normalmente, é utilizado o melaço de beterraba, cana ou a misturas de ambas (WILLIAMS e PULLEN 2009).

O processo de obtenção do fermento biológico pode ser de diversas formas, de acordo com as exigências específicas relacionadas ao processo de produção em que será empregado. Em processos de panificação, o fermento biológico utilizado pode apresentar-se como fresco, seco ou seco instantâneo, cremoso e encapsulado (imobilização celular) (BONA, 2002; WILLIAMS e PULLEN, 2009).

De acordo com a Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 38/1977 o fermento fresco, também designado como fermento verde, fermento prensado ou levedura prensada deve possuir características de massa prensada, pastosa, homogênea e de consistência firme, exibindo coloração creme claro característico, com odor e sabor próprio. O teor de umidade máximo deve ser de 75 % e cinzas 5 % (BRASIL, 1977). Devido ao seu alto teor de umidade, este fermento deve ser armazenado em temperaturas de refrigeração entre 4 °C a 8 °C até que seja utilizado para a elaboração de massas. Normalmente, este produto é comercializado em blocos

de 15 g a 500 g e embalado em papel encerado e sua durabilidade sob refrigeração é em torno de 15 dias (BRANDÃO e LIRA, 2011; CASTRO e MARCELINO, 2012; CAUVAIN e YOUNG, 2009).

O fermento biológico seco é obtido a partir da secagem do fermento biológico fresco por ar quente. Este fermento é fracionado em pequenos grânulos adquirindo textura grossa e coloração creme acinzentado ou amarelo palha escuro. Possui umidade em torno de 7 % a 9 %, podendo ser encontrados em embalagens metalizadas, a vácuo ou com atmosfera modificada podendo variar entre 7 g a 1 kg. Neste tipo de fermento, as células estão num estado latente. A reidratação deste produto consiste na utilização de água com temperatura entre 37 °C a 38° C por 20 min (CASTRO e MARCELINO, 2012; THOMAZ, 2008).

O fermento seco instantâneo apresenta-se em grânulos muito pequenos, de coloração branca ao castanho claro, com odor e sabor característicos. A umidade deverá estar em torno de 4 % a 6 %, sendo diretamente incorporado à massa. Este produto é comercializado em embalagens laminadas à vácuo ou sacos plásticos e possui durabilidade de até 2 anos em embalagem fechada, não havendo necessidade de reidratação no momento de uso uma vez que possui características peculiares que permite a sua adição diretamente à farinha (CASTRO e MARCELINO, 2012; THOMAZ, 2008; WILLIAMS e PULLEN, 2009). O processo de obtenção deste tipo de fermento consiste extração da água das células por desidratação em leite fluidizado (THOMAZ, 2008).

O fermento cremoso possui consistência pastosa e pode substituir o prensado numa proporção de 1,5:1. Em formulações que utilizam este tipo de fermento, o conteúdo de água extra presente deve ser contrabalanceado durante a elaboração (WILLIAMS e PULLEN, 2009).

A imobilização celular ou encapsulamento têm como objetivo aprisionar o micro-organismo em uma matriz denominada suporte. O fermento biológico encapsulado foi desenvolvido para misturas semiprontas, no entanto, este tipo de fermento é pouco utilizado devido ao seu custo elevado (BATISTA, 2005; WILLIAMS e PULLEN, 2009).

Alguns ingredientes podem influenciar a atividade do fermento biológico. O sal e o açúcar têm efeito significativo sobre a pressão osmótica do meio reduzindo a viabilidade celular. Quanto maior a porcentagem desses

ingredientes na formulação, maior será o tempo necessário para a atuação das leveduras (BRANDÃO e LIRA, 2011; WILLIAMS e PULLEN, 2009).

O fermento fresco é o mais utilizado em processos de panificação, devido a maior produção de gás durante a fermentação, resultando em massas com maior volume. Considerando a velocidade de fermentação, o fermento atua na seguinte ordem: fermento fresco > fermento seco instantâneo > fermento seco ativo. (HEITMANN, 2017).

A temperatura de fermentação exerce efeito significativo na produção de gás pelas leveduras (STRUYF et al., 2017). No processo de produção de massa de pães, se forem utilizadas temperaturas elevadas, haverá produção de CO₂ de forma acelerada e a estrutura da massa não apresentará elasticidade adequada para reter o gás, proporcionando um volume reduzido do produto final. Se a temperatura utilizada for muito baixa, a rede de glúten se desenvolverá, mas a quantidade de CO₂ e de outros compostos oriundos da fermentação será reduzida, exibindo uma massa grosseira, aumentando conseqüentemente, o tempo de fermentação da massa para se obter as características desejáveis do produto final (GUERREIRO, 2006).

Vale ressaltar que, a expansão da massa só pode ocorrer se o CO₂ for aprisionado na mesma. A proporção de aprisionamento depende da integridade da matriz de glúten dentro do qual pode ser realizada a retenção do gás. A manutenção de CO₂ na massa está, portanto, intimamente ligada ao grau de desenvolvimento da mesma (CAUVAIN, 2001).

3.3. Congelamento de massas de pão

O pão fresco é um produto de curta vida de prateleira e durante o seu armazenamento diversas alterações físico-químicas podem ocorrer modificando as suas características sensoriais (GIANNOU, KESSOGLOU e TZIA, 2003).

O congelamento de massas de pão é um processo bastante difundido nas indústrias de panificação permitindo um grande volume de produção de pães em locais centrais para, posteriormente, serem distribuídos nos pontos de venda (CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013; ROUILLÉ, LE BAIL e COURCOUX, 2000). Na década de 20, experimentos já haviam sido realizados na tentativa de produzir massa de pão congelada com o objetivo de retardar o processo fermentativo da massa (GUTKOSKI et al., 2005; WATANABE e BENASSI, 2000).

Entre as décadas de 50 e 60, novas tentativas de obter massas congeladas foram realizadas, no entanto, os equipamentos disponíveis não eram adequados para produção. Além disso, a curta vida de prateleira e o procedimento de preparo inadequado por parte dos consumidores foram os fatores determinantes para o fracasso da produção (GIANNOU e TZIA, 2007; JACKEL, 1991; WATANABE e BENASSI, 2000). A partir da década de 70, devido ao aumento do número de setores de panificação nos Estados Unidos, o congelamento de massas de pão se generalizou aumentando a flexibilidade de produção (WATANABE e BENASSI, 2000).

Diante da praticidade que o congelamento de massas de pão oferece, o setor de panificação começou a demonstrar interesse por esta alternativa, optando pela comercialização de massas congeladas, pães pré-assados congelados ou pães assados congelados. Este procedimento apresenta diversas vantagens tais como: independência de mão de obra especializada, elimina a necessidade de equipamento para produção da massa, conveniência, padronização do produto, redução de espaço físico, redução de custos, agilidade e flexibilidade para a produção permitindo a aquisição de pães recém assados a qualquer hora do dia (CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013; FUNCK e FRANCISCO, 2006; HUTKINS, 2006; KECHINSKI et al., 2010; QUEIROZ, 2015; ROMEU, TADINI e MATUDA 2006; SASANO et al., 2012; SELOMULYO e ZHOU, 2007; STRUYF et al., 2017) evitando ao mesmo tempo o funcionamento noturno das padarias e a necessidade da habilidade de funcionários treinados para elaboração de produtos de panificação (FUNCK e FRANCISCO, 2006; QUEIROZ, 2015).

Apesar das vantagens que o congelamento oferece na conservação de massas (YI e KERR, 2009), o processo de congelamento e o descongelamento podem alterar a atividade fermentativa devido a da viabilidade da levedura e causar mudanças nas propriedades reológicas, físicas e sensoriais da massa (CHEN et al., 2012; QUEIROZ, 2015; RIBOTTA, LEON e ANON 2003; STRUYF et al., 2017; YI e KERR, 2009). Portanto, o armazenamento de massas congeladas por períodos prolongados sem alterar a sua qualidade ainda é um desafio para este segmento de mercado (RESENDE, 2011).

3.4. Efeito do congelamento na viabilidade das leveduras em massas

Um dos desafios mais relevantes relacionados à conservação de massas sob congelamento é a manutenção da viabilidade das leveduras assim como manter a sua capacidade fermentativa (GUTIKOSK et al., 2005; RESENDE, 2011).

O processo de congelamento muitas vezes é letal para a levedura em massas congeladas uma vez que existem muitos efeitos negativos como a desnaturação de macromoléculas, ruptura das membranas celulares e encolhimento das células, causadas por perda de água causando impactos negativos na qualidade do pão (PANADERO et al., 2005; STRUYF et al., 2017).

A criopreservação da levedura é fortemente influenciada pelo tempo de armazenamento da massa congelada, pela temperatura da massa antes de ser submetida ao congelamento, oscilações de temperatura e taxas de congelamento e descongelamento, sendo este último um dos principais problemas que ocasionam dano sobre massas congeladas devido à formação de cristais de gelo (GIANNOU, KESSOGLOU e TZIA, 2003; NEMETH, PAULLEY e PRESTON 1996; VARRIANO-MARSTON et al., 1980).

Kechinski et al. (2010) investigou a influência do congelamento de massas de pão francês armazenadas em câmara de congelamento (- 18 °C) e armazenadas em ultrafreezer (- 40 °C) sobre a viabilidade do fermento biológico. Esses autores observaram que houve uma redução de 50 % na contagem de células de leveduras viáveis para ambas as temperaturas com um tempo de estocagem de aproximadamente 25 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por Salas-Mellado e Chang (2003) que investigaram a estabilidade do fermento em massas de pão armazenadas a - 15 °C durante 45 dias. Os autores verificaram uma diminuição da viabilidade do fermento de 53 % a 99 %.

Meziani et al. (2012) estudaram a influência da velocidade de congelamento de massas de pão doce em temperaturas de - 20 °C, - 30 °C e - 40 °C em cabines congeladoras com jato de ar e em nitrogênio líquido. Esses autores verificaram que a atividade fermentativa diminuiu significativamente em massas congeladas com nitrogênio líquido, causando uma redução de 70 % na população de leveduras.

Associados aos danos causados pelo processo de congelamento na membrana das células de levedura, acredita-se que este método de

conservação pode provocar a morte da levedura e a liberação de substâncias redutoras provenientes das células que podem ter efeitos prejudiciais na estrutura do glúten, dentre essas substâncias destaca-se a glutathiona que possui compostos sulfidrilas redutores (-SH). Esses grupos sulfidrilas interagem com as pontes dissulfetos do glúten responsáveis pelo intercruzamento afetando a redistribuição da fase aquosa devido à mudança da capacidade de absorção de água pela farinha (RIBOTTA e TADINI, 2009; STRUYF et al., 2017).

O efeito do congelamento e estocagem de massas sobre a qualidade final do pão e as consequências do congelamento sobre a viabilidade celular e a liberação de substâncias pelas células de levedura foram analisadas por Ribotta et al. (2003). Esses autores observaram que massas congeladas armazenadas a - 18 °C apresentaram redução da produção de CO₂, sugerindo que a redução da produção de gás esteja associada ao aumento da quantidade de substâncias redutoras lixiviada a partir da levedura. Segundo estes autores, este último evento aumentou a solubilidade de algumas proteínas de glúten e foi responsável pela diminuição do volume do pão. Além disso, o congelamento e a estocagem de massa causou perdas significativas no número de células viáveis com uma diminuição de 52,4 % após 90 dias de estocagem. Entretanto, estudos realizados por Autio e Sinda (1992) verificaram que as propriedades reológicas da massa não foram afetadas pela presença de células mortas de leveduras. Dessa forma, alterações estruturais na massa submetida ao congelamento e descongelamento estão associadas somente à ação mecânica dos cristais de gelo.

O congelamento da levedura contido num sistema de massa é diferente do congelamento direto da levedura. Em massas congeladas, possíveis alterações metabólicas podem ocorrer nas células pois nestas condições, as leveduras estão sob pressão osmótica além de estar num estado de fermentação ativa. A membrana plasmática das células de leveduras ativas é mais fina do que a das células latentes; conseqüentemente, tornam-se mais suscetíveis a danos celulares provocados pelo congelamento, diminuindo assim a sua atividade fermentativa. Além disso, os compostos orgânicos estão concentrados na fase aquosa devido ao processo de congelamento causando a autólise celular (LORENZ e KULP, 1995; STAUFFER, 1993; WOLT e D'APOLLONIA, 1984). Entretanto, outros autores acreditam que a massa promove efeito protetor na

viabilidade da levedura (WOLT e D'APOLLONIA, 1984). Para o congelamento de massas de pão, é desejável que a temperatura da massa esteja abaixo de 20 °C, evitando que as leveduras iniciem a fermentação antes do congelamento (GUTKOSKI et al., 2005).

A perda de viabilidade das células de levedura mediante congelamento tem sido atribuído ao congelamento extra e intracelular em temperaturas abaixo de – 15 °C causando danos na estrutura celular. À medida que ocorre a diminuição da temperatura, a fração aquosa contida na célula da levedura também é reduzida, devido a perda de água através da membrana celular, ocorrendo desidratação e concentração de solutos intra celulares, causando alterações do pH devido à precipitação de solutos, toxicidade iônica, danos nos processos de membrana essenciais, comprometimento dos elementos do citoesqueleto e redução da atividade de enzimas glicolíticas. As concentrações elevadas de solutos produzido pelo congelamento também afetam os lipídeos de membrana tornando-a mais permeável. No descongelamento, a célula sofre choque osmótico, como resultado da entrada de água para a região interna, reduzindo a sua capacidade fermentativa (RIBOTTA e TADINI, 2009; STRUYF et al., 2017). Dessa forma, é indicado que a levedura seja ativada após o processo de congelamento, pois os maiores danos ao fermento estão associados aos produtos inerentes do seu metabolismo (WATANABE e BENASSI, 2000).

Para o congelamento de alimentos, dois tipos de processos podem ser empregados: o congelamento rápido e o congelamento lento. No congelamento rápido, é reduzida a temperatura dos alimentos em torno de – 20 °C em 30 minutos. Este método oferece vantagens em relação ao congelamento lento, uma vez que ocorre a formação de pequenos cristais de gelo, o que minimiza os danos nos tecidos, além de provocar o choque térmico, não favorecendo a adaptação dos micro-organismos às baixas temperaturas. No congelamento lento, os cristais de gelo são formados após 3 h a 72 h de estocagem. Neste caso, ocorre a formação de cristais de gelo grandes, intra e intercelulares que podem causar rompimento físico de membranas, paredes celulares e estruturas internas, além de alterar negativamente a qualidade do alimentos após o descongelamento (AZEREDO, 2012; JAY, 2005).

Em massas, embora a ação mecânica dos grandes cristais de gelo formados durante o congelamento lento possa causar danos na rede de glúten, reduzindo a capacidade de retenção de CO₂ produzido pelas leveduras, este tipo de congelamento preserva a atividade do fermento biológico (BERGLUND et al., 1991; HAVET, MANKAI e LE BAIL 2000). Neste processo, o congelamento é mais acentuado na superfície da massa do que na região central. A variação na velocidade de congelamento e a cristalização do gelo são fatores que podem influenciar a atividade do fermento no interior da massa (HAVET, MANKAI e LE BAIL, 2000; NEYRENEUF e DELPUECH, 1993). Sugere-se que, no congelamento lento ocorra a migração da água intracelular da levedura para o exterior, formando cristais de gelo não causando comprometimento à célula uma vez que a sua membrana age formando uma barreira de proteção. Entretanto, algumas investigações sugerem que o congelamento rápido pode ser letal para as células de levedura devido ao crescimento de cristais intracelulares que durante o descongelamento se recristalizam com formação de cristais que podem ser prejudiciais às leveduras. Sugere-se que o dano ocorra porque a recristalização produz uma força suficiente para romper a membrana celular ou membranas das organelas tais como mitocôndrias (CASEY e FOY, 1995; LORENZ e KULP, 1995).

Segundo HSU et al. (1979b) a diferença entre a temperatura mínima alcançada no produto durante o processo de congelamento e a temperatura de armazenamento da massa congelada são os parâmetros mais importantes para a sobrevivência das leveduras.

3.5. Consequências do congelamento nas propriedades da massa

O congelamento apresenta algumas limitações que podem prejudicar o volume e a estrutura de pães de massas congeladas, a atividade da levedura como ingrediente e, conseqüentemente, diminuindo o potencial de panificação durante o descongelamento da massa, com potencial perda de água com o tempo de estocagem (GUTKOSKI et al., 2005; MATUDA et al., 2004; RIBOTTA e TADINI, 2009; SELOMULYO e ZHOU, 2007; WATANABE e BENASSI 2000). Essas conseqüências dependem do tipo e da velocidade de congelamento, descongelamento empregado e tempo de estocagem (LORENZ e KULP, 1995). Flutuações de temperatura devem ser evitadas durante o congelamento,

transporte, distribuição e estocagem do produto. Essas oscilações provocam a recristalização e promovem o aumento do tamanho dos cristais de gelo afetando as características inerentes ao produto, além de reduzir a viabilidade das leveduras e produção de gás (EVANGELISTA, 1989; GUTKOSKI et al., 2005; PARDI et al., 2001; PHIMOLSIRIPOT et al., 2008).

De acordo com Meziani et al. (2012), longos períodos de armazenamento a baixas temperaturas com conseqüente formação de cristais de gelo pode prejudicar a estrutura da massa danificando a rede de glúten por ação mecânica do gelo, causando queda da consistência e elasticidade da massa afetando a capacidade de retenção de CO₂, além de reduzir a contagem de leveduras viáveis, prolongar o tempo de fermentação aumentando a susceptibilidade ao dano celular e prejudicar a qualidade do produto final, causando modificações como volume reduzido, miolo com estrutura mais aberta e firme e alterações no sabor, aroma e textura (HAVET, MANKAI e LE BAIL, 2000; MATUDA et al., 2004; RIBOTTA e TADINI, 2009; SELOMULYO e ZHOU, 1997).

Os efeitos do congelamento durante o armazenamento foram estudadas por Lu e Grant (1999) na textura de massas congeladas. Pedacos de massas foram mantidas a - 72 °C com congelamento interno a - 16 °C durante 90 minutos. Após este procedimento, as massas foram armazenadas em congelador de cabine a - 23 °C durante 16 semanas. Foi verificado que, após o descongelamento a 4 °C durante 16 horas, a resistência à extensão máxima reduziu em função do tempo de estocagem resultando na separação da fração aquosa da matriz proteica, com a diminuição da flexibilidade da rede do glúten

Massas congeladas de pão francês foram avaliadas por Havet, Mankai e Le Bail (2000) para verificar a influência de baixas temperaturas sobre a perda de elasticidade e de qualidade do pão elaborado com essa massa. Esses autores submeteram as massas ao congelamento a - 20 °C em congelador de ar forçado em três velocidades, 1 m.s⁻¹, 2 m.s⁻¹ e 3 m.s⁻¹, até atingir -19 °C no centro. Após atingir a temperatura de - 19 °C no centro da massa, as amostras foram embaladas e armazenadas em caixa térmica com paredes de 10 cm de poliestireno e as mesmas foram transferidas para uma sala resfriada a - 20 °C durante 7 dias. Foi observado que houve diminuição no volume do pão, redução da elasticidade da massa, danos na rede de glúten e comprometimento da

atividade fermentativa da levedura demonstrando o efeito sinérgico da taxa de congelamento sobre a qualidade do pão.

Os fatores de qualidade do pão preparado a partir de massa congelada sob diferentes condições de congelamento e armazenamento foram observados por Yi e Kerr (2009). Neste estudo foi verificado que houve redução no volume do pão e alterações na textura e na atividade fermentativa da levedura. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribotta et al. (2003), esses autores demonstraram que o congelamento e estocagem de massas provocam efeitos negativos no produto final, com maior contagem de células mortas e pães com volume reduzido.

Vieira (2011), verificou por análise de microscopia eletrônica de varredura que a estrutura da rede de glúten após o congelamento de massas de pão apresentou alteração na uniformidade, com menor adesão dos grânulos de amido à estrutura proteica. Esses resultados indicam que a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento provocou a ruptura da matriz proteica.

A estabilidade de massas congeladas também está associada à qualidade do fermento biológico, da fermentação antes do abaixamento da temperatura, dos ciclos de congelamento e descongelamento e da presença de compostos sulfidrilas, como por exemplo, a glutathione liberados a partir do metabolismo deste micro-organismo (EL-HADY et al., 1996; RIBOTTA e TADINI, 2009). Para Hsu et al. (1979a) a integridade das propriedades viscoelásticas da massa durante o processo de congelamento e a boa atividade do fermento biológico após o descongelamento está diretamente associada à qualidade do fermento.

A fermentação ocorre durante o período de descanso da massa, logo após a moldagem e a colocação nas fôrmas (MARTINBIANCO, 2011). É recomendável que a temperatura da massa esteja entre 18 °C a 20 °C afim de evitar a fermentação precoce antes do congelamento e inibir a formação de cristais de gelo no miolo que podem causar alterações indesejáveis na massa durante o descongelamento e crescimento do pão (GUERREIRO, 2006).

Diante das adversidades que o processo de congelamento pode oferecer ao fermento biológico, a conservação de massas congeladas deve ser criteriosamente considerada a fim de assegurar as características de qualidade do produto final (GIANNOU, KESSOGLOU e TZIA, 2003). Portanto, considera-

se a necessidade de estudos acerca da possibilidade de uso de um agente de preservação que possua a habilidade de reduzir ou até mesmo eliminar os problemas envolvidos durante o processo de congelamento de massas.

3.6. Alternativas para minimizar os efeitos do congelamento na viabilidade do fermento biológico

Diante dos problemas associados à conservação por baixas temperaturas em combinação com as crescentes demandas por produtos de panificação congelados, novas tecnologias foram adotadas com o objetivo de aperfeiçoar a conservação dos mesmos. A literatura relata diferentes maneiras de minimizar o estresse microbiano ao congelamento em massas congeladas tais como o uso de maior quantidade de fermento, uso de estirpes de leveduras criorresistentes, modificação no processo de panificação e o emprego de aditivos (GIANNOU, KESSOGLOU e TZIA, 2003).

O emprego de maior quantidade de fermento é uma alternativa para superar a perda potencial da atividade celular durante o congelamento de massas (QUEIROZ, 2015). Em comparação ao processo convencional, que utiliza cerca de 3 % de levedura o aumento da quantidade do fermento varia de 4 % a 6,5 %. Entretanto, alguns fatores como o tempo de armazenamento da massa sob congelamento, formulação utilizada e o tempo de fermentação após o descongelamento da massa são influenciados pela quantidade de fermento (BRUINSMA e GIESENSCHLAG, 1984; GIANNOU, KESSOGLOU e TZIA, 2003).

A escolha de linhagens de leveduras também é um critério importante. Leveduras resistentes a longos períodos de estocagem sob congelamento, associada à elevada atividade fermentativa e menor sensibilidade aos ciclos de congelamento e descongelamento são as de maior interesse tecnológico (FRANCISCHI et al., 1998; MATUDA, 2008). Outras espécies de levedura como *Saccharomyces rouxxi* e *Saccharomyces rosei* tem sido utilizadas em processos de panificação (HUI et al., 2006). Alguns estudos demonstram que *Saccharomyces rouxxi* apresenta maior tolerância a condições inóspitas como uma ampla gama de acidez e concentrações de açúcar e sal (ENGLISH, 1954; HUI et al., 2006). Já a *Saccharomyces rosei* é empregada em panificação

exercendo função fermentativa na elaboração de massas doces (HUI et al., 2006; REIS, 2006).

A utilização de substâncias crioprotetoras é outra opção adotada na preservação da viabilidade do fermento em massas congeladas. A trealose é um dissacarídeo capaz de conferir crioproteção à levedura contra diversos tipos de estresse (SALAS-MELLADO e CHANG, 2003; STEFANELLO, 2014). Stefanello (2014) utilizou diferentes concentrações de trealose (0 %, 10 % e 15 %) como agente crioprotetor na formulação de pães tipo *sourdough* elaborados com fermento natural liofilizado. Neste estudo, observou-se que a adição de 10 % e 15 % de trealose foi capaz de melhorar a criorresistência do fermento.

Técnicas modernas como a recombinação de DNA, mutações induzidas e metodologias de seleção também podem ser empregadas, como cepas de leveduras mais estáveis, tolerantes às variações de pH e temperatura e a altas pressões osmóticas com propriedades melhoradas para panificação (BEKATOROU, PSARIANOS E KOUTINAS, 2006).

Sasano et al. (2012) produziu uma cepa de levedura de panificação diploide de autoclonagem que acumula prolina e trealose simultaneamente em que foi avaliada sua tolerância ao congelamento e a sua capacidade de fermentação após o congelamento em massa de pão. Neste estudo foi observado que a estirpe de levedura de panificação que acumulava tanto prolina quanto trealose apresentou maior tolerância ao congelamento e capacidade fermentativa após o congelamento.

Algumas modificações podem ser inseridas durante o processo de panificação de forma minimizar o processo de fermentação. Conforme Inoue e Bushuk (1991) pode-se usar o método rápido, designado “sem tempo”, na produção de massas congeladas. Este procedimento tem como objetivo reduzir a atividade fermentativa das leveduras durante a elaboração da massa.

Diante disso, tem se pesquisado outras metodologias que possam minimizar os efeitos prejudiciais relacionados ao congelamento de alimentos e que tenham o potencial de controlar as alterações provocadas em produtos congelados.

3.7. Proteínas estruturadoras de gelo (ISP)

As proteínas estruturadoras de gelo (ISP) também conhecidas como proteínas anticongelantes (AFP) são substâncias encontradas em uma ampla variedade de plantas que habitam regiões frias e em diversos organismos como peixes, insetos, artrópodes, fungos e bactérias do solo. Essas proteínas conferem a capacidade de aumentar a resistência ao congelamento auxiliando a capacidade à sobrevivência em ambientes inóspitos (JIA e DAVIES, 2002; JØRGENSEN et al., 2008).

A atividade crioprotetora das ISP presentes em plantas se apresenta somente nas de inverno ou em plantas que foram cultivadas em regime de aclimação ao frio. Essa aclimação ocorre com a atuação de temperaturas de resfriamento e de congelamento (- 3 °C a - 5 °C). Este evento provoca alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares nos vegetais tornando-as mais resistentes tanto à baixas temperaturas quanto à desidratação provocada pelas temperaturas congelantes. No caso do trigo, a aclimação ocorre abaixo de 2 °C (GUSTA et al., 2004; VÁGÚJFALVI et al., 1999). As ISP podem ser encontradas em diversas partes da planta como: sementes, caules, cascas, ramos, brotos, flores, gomo, frutos, raízes, rizomas e tubérculos, sendo secretados no xilema, parede celular e espaços intracelulares dos tecidos (GRIFFITH e YAISH, 2004; MISHRA e PATTAIK, 1999). Dentre as plantas mais estudadas quanto à presença das ISP, destaca-se o centeio e o trigo (CAMPELO, 2014; CREVEL, FEDYK e SPURGEON 2002; HASSAS ROUDSARI, 2011; HON et al, 1994; QUEIROZ, 2015; VIEIRA, 2011).

As ISP presente nas plantas para atuarem na modificação dos cristais de gelo durante a exposição à baixas temperaturas, são sintetizadas endogenamente pelas células sendo, posteriormente, secretadas pela membrana plasmática dentro dos espaços intercelulares (ATICI e NALBANTOĞLU, 2003).

A identificação e caracterização de ISP isoladas de folhas trigo foi estudada por Vieira (2011). Foi verificado através de imagens dos géis obtidos por eletroforese SDS-PAGE, que o cultivo dessas plantas em ambiente aclimatado apresentou diferentes peptídeos com valores de massas moleculares que estão dentro da faixa das ISP presentes em plantas aclimatadas ao frio e com atividade crioprotetora.

As IPS são conhecidas pela capacidade de interagir com os cristais de gelo reduzindo o ponto de congelamento sem modificar o ponto de fusão e a pressão osmótica, além de retardar a recristalização durante a estocagem sob temperaturas de congelamento evitando o aparecimento de cristais de gelo maiores (PIROZI e MACRITCHIE, 2002).

3.7.1. Formação e estrutura dos cristais de gelo

É essencialmente importante a precaução com relação à formação de cristais de gelo na porção interna dos organismos durante o processo de congelamento, uma vez que a cristalização pode provocar o rompimento das membranas celulares e desidratação. O congelamento ocorre em temperaturas de - 18° C ou menores. Nesta temperatura ocorre a cristalização da água e a formação dos cristais de gelo (CAMPELO, 2014; FELLOWS, 2000).

A formação do cristal de gelo é resultante do arranjo espacial das moléculas de água em que cada molécula de água estabelece uma ligação de hidrogênio com outra molécula de água nas proximidades dando origem a uma conformação tetraédrica. O arranjo das moléculas de água favorece o crescimento de forma orientada do cristal de gelo ao longo de dois planos: plano basal e plano do prisma. Em condições normais (água pura), a formação do cristal de gelo assume formato hexagonal, com planos e eixos como mostrado na Figura 3. O plano com os eixos a é chamado de plano basal, onde esses eixos são distribuídos em a1, a 2 e a 3 situados ao longo da base do prisma e o plano do eixo c é denominado plano do prisma que se situa perpendicular ao eixo a (GUPTA e DESWAL, 2014; WHATEN e JIA, 2005).

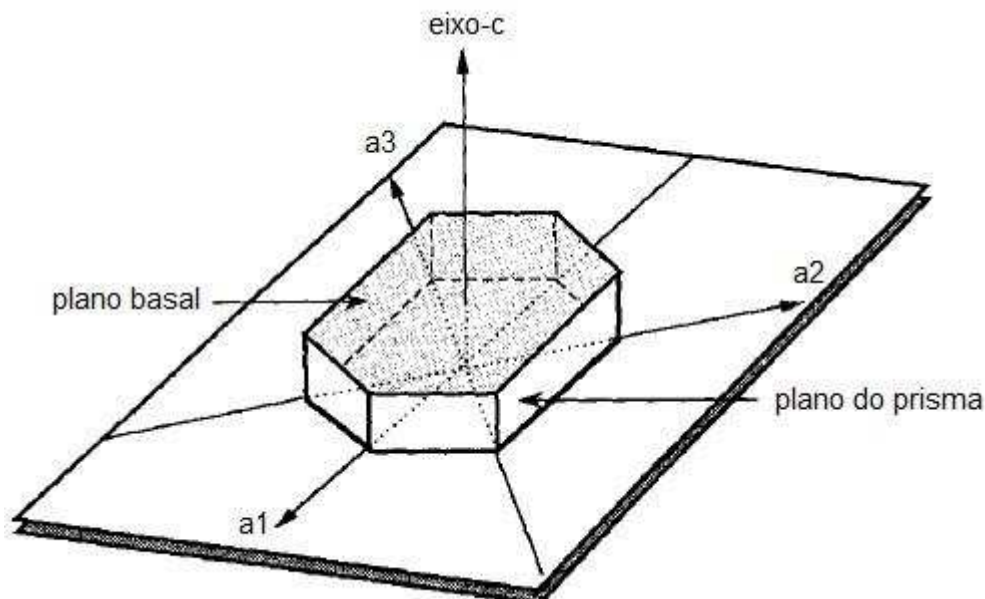


Figura 3- Representação esquemática de um cristal de gelo.

Fonte: Hew e Yang (1992).

O crescimento em direção ao plano do prisma ocorre de forma mais acelerada do que na direção da base do plano. Essa diferença está associada à diferentes configurações da molécula de água e das posição das ligações de hidrogênio alterando o comportamento estrutural do cristal durante a sua formação (GUPTA e DESWAL, 2014; TOKAREW, 2011; WHATEN e JIA, 2005). Além disso, a temperatura exerce papel importante quanto à morfologia dos cristais. Em temperaturas ligeiramente abaixo de 0 °C, os cristais de gelo assumem configuração de discos arredondados e em temperaturas mais baixas apresentam formas irregulares (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

A recristalização de gelo ocorre em temperaturas menores que 0 °C. Este fenômeno acontece quando há flutuações na temperatura provocando o aumento do número de ciclos de congelamento e descongelamento, devido a uma maior taxa de recristalização. O processo de recristalização promove o desaparecimento de cristais de gelo menores e o crescimento de cristais de gelo maiores, sendo estes últimos responsáveis pela ruptura de células e tecidos (GRIFFITH e EWART, LIN e HEW, 1999; TOKAREW, 2011; ZARITZKY, 2000).

3.7.2. Interação entre as ISP e os cristais de gelo

Em temperaturas de congelamento, as ISP se caracterizam pela habilidade de interagir com a nucleação do gelo ligando-se em pontos específicos na superfície do cristal influenciando o crescimento e a sua morfologia e impedindo a recristalização do gelo (BARRET, 2001; CREVEL et al., 2002; KONTOGIORGOS, GOFF e KASAPIS, 2008; MISHRA e PATTNAIK, 1999). Além disso, essas proteínas são capazes de diminuir a temperatura de expansão macroscópica do gelo, reduzir o ponto de congelamento e ao mesmo tempo retardar a recristalização sem alterar a temperatura de fusão e a pressão osmótica, de uma forma não coligativa, evento este conhecido como histerese térmica (BARRET, 2001; FEENEY e YEH, 1993; PROVESI e AMANTE, 2015; YEH e FEENEY, 1996). A histerese térmica é a diferença entre a temperatura de fusão e o ponto de congelamento de uma solução na presença de ISP (ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN, 2000). Devido a essas características, as ISP também são conhecidas como proteínas da histerese térmica.

De acordo com Atici e Nalbantoğlu (2003), na ausência de ISP, o cristal de gelo cresce de forma arredondada e planar, paralelo ao eixo basal (eixo a) apresentando pouco crescimento perpendicular ao eixo c. Na presença das ISP, essas proteínas se aderem à superfície do cristal no plano do prisma, deixando o plano basal livre para crescimento. Dessa forma, o crescimento do cristal será alterado morfologicamente, assumindo uma forma alongada, bipiramidal ou forma de agulha, uma vez que o crescimento ocorre preferencialmente ao longo do eixo c (Figura 4) (ANTIKAINEN e GRIFFITH, 1997; HON et al., 1994; JIA e DAVIES, 2002; PROVESI e AMANTE, 2015).

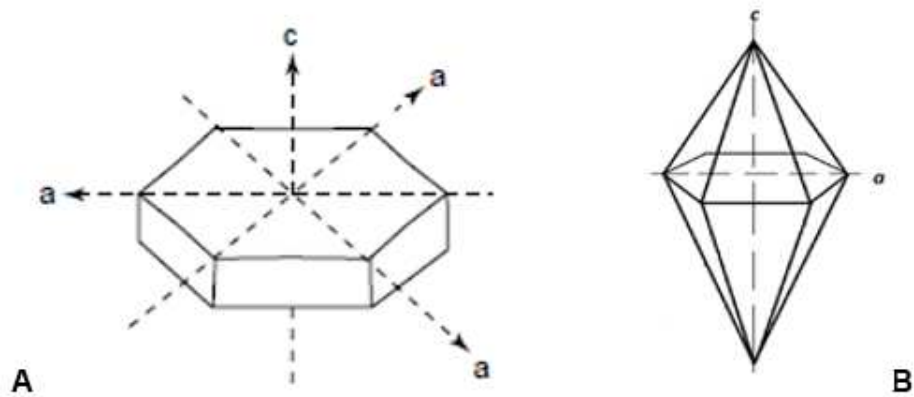


Figura 4- Morfologia de um cristal de gelo. **A:** Sem a presença da ISP, crescimento em todas os planos; **B:** Com a presença da ISP, crescimento ao longo do plano prisma.
 Fonte: Jia e Davies (2002), Provesi e Amante (2015), adaptado.

Segundo Barret (2001), a associação de ISP à superfície do cristal de gelo promove a inibição do crescimento dos cristais em pontos específicos, permitindo assim o crescimento dos cristais apenas entre as moléculas de ISP. Essa interação entre a ISP e a superfície do gelo foi sugerida no modelo “botão colchão” (Figura 5) por Knight, Cheng e Devries (1991) uma vez que esta aderência é de forma irreversível e provoca curvaturas na superfície do gelo. De acordo com este modelo, a proteínas interagem no cristal de gelo por adsorção (KONTOGIORGOS, GOFF e KASAPIS, 2008).

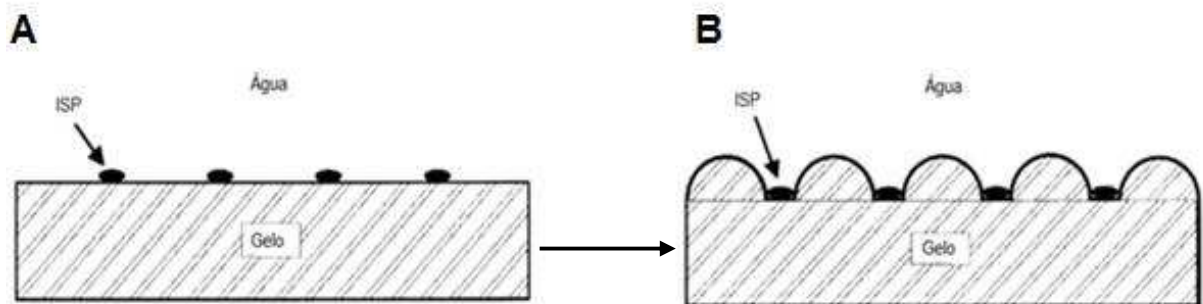


Figura 5- Modelo “botão colchão” da interação das ISP com a superfície do gelo. **A:** aderência das ISP na superfície do gelo. **B:** alteração da morfologia do gelo após a aderência das ISP na superfície.
 Fonte: Barret (2001).

A hipótese de que a adsorção molecular numa superfície é essencialmente irreversível, baseia-se na estimativa do número de possíveis ligações de hidrogênio que precisam ser rompidas antes de uma molécula de ISP ser aderida ao cristal de gelo (YEH e FEENEY, 1996).

A associação das ISP com a superfície do gelo reduz a estabilidade do gelo e diminui o contato entre a superfície do gelo e a interface da água. Dessa forma, o incremento de água na superfície do cristal fica desfavorecida inibindo, conseqüentemente, o crescimento do cristal de gelo (BRÖDEL et al., 2013). A modificação da morfologia do gelo pelas ISP está associada à presença de terminais polares de aminoácidos que se ordenam possibilitando interações estáveis com a superfície do cristal (HON et al., 1994). Para Clarke, et al. (2002), o termo "anticongelante" não representa com precisão a sua função natural. A aplicação dessas proteínas em sistemas congelados não evitam o congelamento e sim, orienta o formato, o tamanho e a agregação de cristais de gelo.

O tamanho e o formato do gelo em cada plano cresce em ritmo diferente após interação das ISP com a água. Essa diferença de crescimento está associada ao posicionamento dos líquidos presentes no meio e à ligação de hidrogênio que promove variadas características de superfície (HASSAS-ROUDASARI, 2011).

3.7.3. Aplicação das ISP na manutenção da qualidade dos alimentos

Uma das causas de deterioração dos alimentos durante o armazenamento congelado é a recristalização de gelo. Isto é reforçado por flutuações de temperatura, principalmente, durante ciclos de congelamento e descongelamento (CLARKE et al., 2002). Devido à capacidade das ISP associar-se ao cristal de gelo, promover a diminuição da temperatura de congelamento e retardar a recristalização durante o congelamento e descongelamento (FEENEY e YEH, 1998) esses crioprotetores biológicos possuem características potenciais para melhorar a qualidade de alimentos congelados durante o congelamento, descongelamento, armazenagem e transporte, além de evitar a perda de textura reduzindo os danos celulares e a preservação dos nutrientes inibindo a sua perda e a saída de água dos alimentos. Essas características oferecem grandes perspectivas para aplicação na indústria alimentícia uma vez que pequenas quantidades dessa proteína são suficientes para a sua atuação, o que a tornaria economicamente viável (CLARKE et al., 2002; KIANI e SUN, 2011; HASSAS-ROUDASARI e GOFF, 2012). Venketesh e Dayananda (2008) sugerem que estes anticongelantes biológicos podem ser adicionadas aos alimentos fisicamente por mistura, injeção, imersão, infiltração por vácuo e por transferência de genes.

Panadero et al. (2005) estudaram a transferência de genes de ISP expressa do peixe *Myoxocephalus aeneus* em estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de melhorar a taxa de gaseificação e a produção de CO₂ em massas congeladas. Os resultados demonstraram que a transferência do gene apresentou pouco efeito sobre a capacidade de gaseificação no fermento após a congelamento.

Em um estudo realizado com massas congeladas de pão francês, Vieira (2011) analisou o efeito de ISP na estabilidade deste produto frente aos impactos negativos causados pelo congelamento e descongelamento. Foi observado que houve uma tendência à redução da sinérese na presença de ISP, melhorando o aspecto físico da estrutura da massa devido a uma possível alteração na morfologia do gelo formados durante o armazenamento congelado e os repetidos ciclos de congelamento e descongelamento. Segundo esta mesma autora, as ISP tornam-se uma alternativa interessante na conservação de alimentos congelados, uma vez que possuem a capacidade de minimizar e até mesmo eliminar os problemas causados na matriz alimentícia durante o processo de congelamento e descongelamento.

Diversos estudos abordam a aplicação das ISP como uma opção na conservação de diversos gêneros alimentícios. Payne e Young (1995) avaliaram os efeitos da administração pré abate de várias concentrações de glicoproteínas anticongelantes na qualidade da carne de cordeiro após o descongelamento avaliando a qualidade sensorial (sabor estranho, aroma durante o armazenamento, textura, maciez, suculência e aceitação global) e a perda por gotejamento. Estes autores observaram que injeções de 24 h antes do abate na concentração de 0,01 mg kg⁻¹ peso corpóreo reduziu a perda por gotejamento e o tamanho dos cristais. Para esta concentração, não foi observado alterações sensoriais significativas para os parâmetros avaliados.

Os melhores resultados na aplicação de ISP em alimentos foi na redução da recristalização em produtos lácteos (FEENEY e YEH, 1998). Estudos demonstram que ISP podem ser adicionadas ao sorvete durante a fase semi congelada. Este incremento inibe a cristalização do gelo melhorando a textura final do produto final. A presença desta proteína no sorvete promove lenta solidificação em temperaturas de - 18 °C a - 30 °C sem a formação de cristais de gelo grandes (HUANG et al., 1992; WARREN et al., 1992). Resultados similares

foram encontrados por Regand e Goff (2006) quando adicionaram extratos obtidos de folhas de trigo de inverno contendo ISP em misturas de sorvete e compararam com a mistura de sorvete sem a adição dessa proteína. As amostras que continham estas proteínas apresentaram cristais de gelo menores durante a etapa de choque térmico, demonstrando que essas proteínas são efetivas na inibição da recristalização do gelo em produtos congelados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento estatístico

O experimento foi realizado em duas etapas. Primeiramente, o estudo foi conduzido segundo o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 3 repetições, sendo os dados obtidos na avaliação do efeito da adição dos extratos de ISP sobre a viabilidade das leveduras isoladas de fermento biológico comercial quanto ao congelamento em meio de cultura analisados em esquema fatorial tendo como fator concentração de proteína (0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG) e tempo de armazenamento sob congelamento (0, 10, 20, 30 e 40 dias). Os dados obtidos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. Posteriormente, os dados obtidos na determinação do efeito do extrato de ISP sobre as leveduras durante o congelamento em massas foram avaliados segundo DIC com 3 repetições por esquema fatorial tendo como fator concentração de proteína (0 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa) e tempo de armazenamento sob congelamento (0, 10, 20, 30 e 40 dias). Os dados obtidos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e avaliados pelo teste F a 0,05 de probabilidade. A análise estatística de ambas as etapas foram realizadas utilizando o sistema SAS (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North Carolina, USA) versão 9.3, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

4.2. Desenho experimental

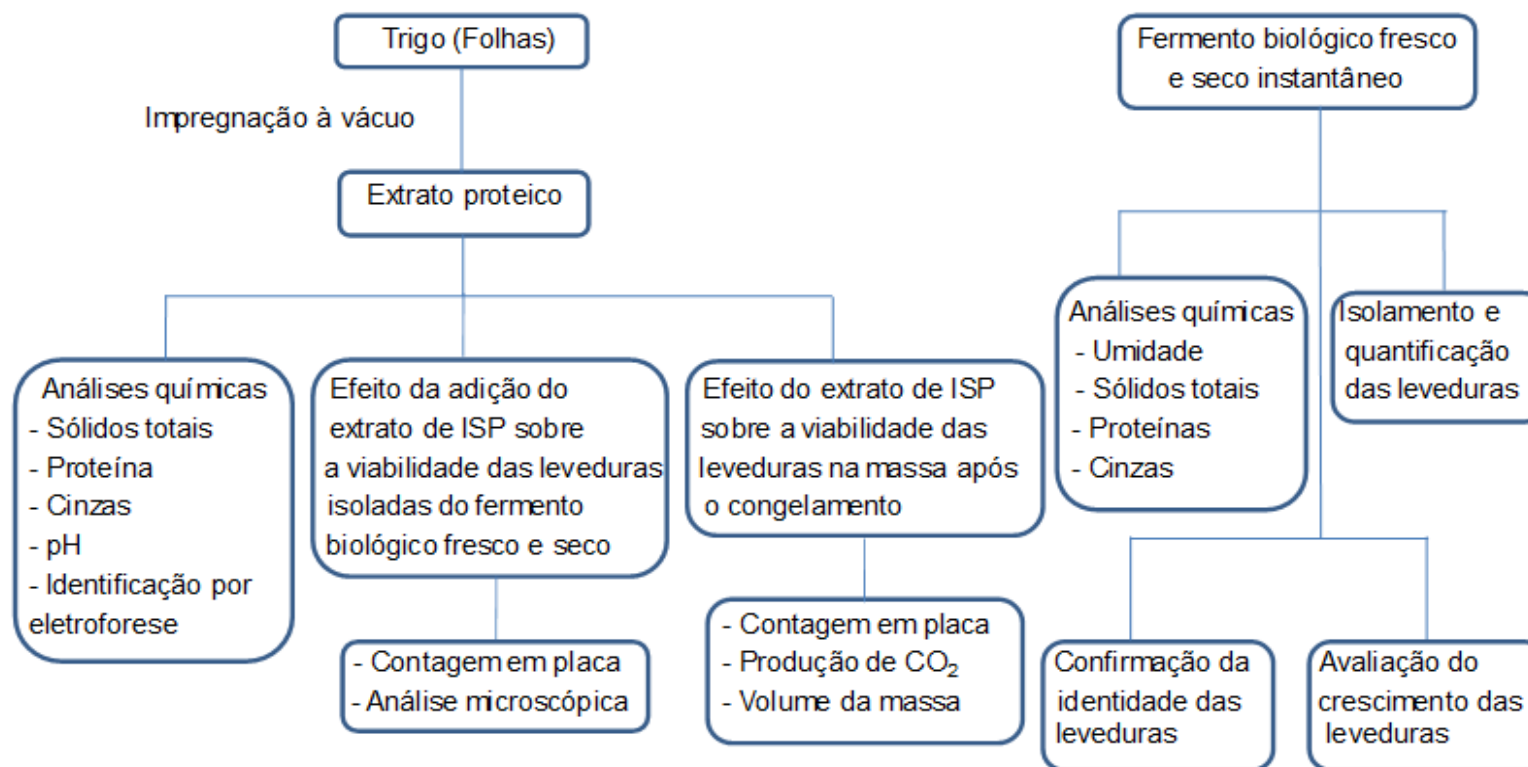


Figura 6- Esquema experimental

4.3. Obtenção do extrato

4.3.1. Obtenção das folhas de trigo

Foram utilizadas sementes de trigo da variedade BRS Guabiju, desenvolvida e fornecida pela Embrapa Trigo, as quais foram cultivadas de acordo com a metodologia descrita por Vieira (2011), com modificações. A escolha desta cultivar foi baseada na qualidade dos grãos e pela aptidão em panificação devido à superior força do glúten (SCHEEREN et al., 2005) e por ser uma variedade brasileira. O cultivo das plantas foi realizado no Laboratório de Panificação e Massas, no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As sementes de trigo foram previamente selecionadas e lavadas com água para remoção de sujidades sendo posteriormente semeadas em bandejas de poliestireno expandido (Isopor®) de 200 células, contendo substrato comercial à base de casca de pinus acrescido de uma mistura denominada Osmocote® Plus 15-9-12. Em cada célula foram colocadas 2 sementes. Ao final, todas as células foram cobertas com terra previamente peneirada com o auxílio de peneira (Granutest®) com 0,074 mm de abertura.

As sementes foram cultivadas em temperatura ambiente por 17 dias, com iluminação natural de aproximadamente $518 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo regadas com água diariamente. Após esse período, as plantas foram transferidas para a aclimação ao frio em estufa incubadora (Eletrolab® EL 202/4) mantidas em condições controladas de temperatura com sistema de refrigeração ($3 \text{ }^{\circ}\text{C} - 6 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (UR ~ 69 %) em regime de luz de 10-14 h (dia/noite) e iluminação de aproximadamente $40,5 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com auxílio de 5 lâmpadas Grolux (Sylvania® F15W T2) durante 25 dias. Durante esse período, as plantas foram regadas com solução nutritiva de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1 % (m/v) semanalmente e com água diariamente. Após 25 dias de cultivo aclimatado, as plantas foram colhidas para a obtenção dos extratos de ISP a partir de suas folhas.

4.3.2. Obtenção do extrato de ISP

O extrato de ISP foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Hassas-Roudsari (2011) adaptado por Campelo (2014). As folhas colhidas foram lavadas com água destilada, cortadas com tesoura em seções de 3 cm de tamanho e impregnadas a vácuo por 30 min com solução tampão de 20 mM de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) (Vetec®) (pH 3) e 20 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) (Impex®), na proporção de 1:5 (amostra g: tampão g. mL⁻¹). Posteriormente as folhas foram trituradas em processador de alimentos (Rival® IB 954), em velocidade baixa por aproximadamente 2 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada (Nova Técnica® NT 815) a 2000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi removido por filtração em papel filtro Whatman nº 40 (GE Healthcare®). O filtrado foi submetido ao tratamento térmico a 75 °C por 20 min em banho maria (Solab® SL 150/22), centrifugado (Nova Técnica® NT 815) a 4000 x g por 20 min e novamente filtrado em papel filtro Whatman nº 40 (GE Healthcare®). Os filtrados foram acondicionados em frascos esterilizados de polipropileno (Falcon®) de 50 mL, identificados e armazenados sob refrigeração (7 °C) até o momento da sua utilização.

4.3.3. Caracterização físico química do extrato de ISP

A quantificação proteica dos extrato de ISP foi avaliada pelo método de Kjeldahl modificado a partir de amostras contendo 0,800 g ± 0,05 g conforme metodologia descrita por AOAC (2012) utilizando fator de conversão 6,25. O teor de proteína bruta dos extratos foi calculado conforme a Equação 1:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{V \times N \times Fc \times f \times MM_N \times 100}{M}$$

(Eq. 1)

Em que:

V = Volume de HCl gasto na titulação (mL)

N = Normalidade do HCl (0,05 mol.L⁻¹)

Fc = Fator de correção do HCl (0,911)

f = Fator de conversão de N = 6,25

MM_N = Massa molar do N = 14 g. mol⁻¹

M = Massa da amostra (g)

Para avaliar o teor de sólidos totais no extrato de ISP foram pesadas 2 g ± 0,05 g de amostra do extrato de ISP em placas de vidro previamente taradas e pesadas. Essas foram aquecidas em estufa (Nova Ética® 400 ND) a 105 °C por 1 h, resfriadas por 1 h e novamente pesadas. As etapas de aquecimento, resfriamento e pesagem foram repetidas até obtenção de peso constante. Os conteúdos de umidade foram determinados pela Equação 2 (método 925.09 da AOAC, 2012).

$$\% U = \frac{p \times 100}{P}$$

(Eq. 2)

Em que:

% U = Umidade a 105 °C

p = massa da amostra úmida (g) - massa da amostra seca (g)

P = massa da amostra úmida (g)

O conteúdo de sólidos totais foram obtidos pela diferença entre a massa total e a umidade da amostra.

Para a análise do teor de cinzas totais no extrato de ISP, cadinhos de porcelana (30 mL) foram previamente aquecidos em mufla (Tecnal® TE-387) a 600 °C, resfriados em dessecador por 1 h e pesados. Nestes foram pesados 2 g ± 0,05 g de amostra sendo, em seguida, concentradas em estufa a 105 °C (Nova Ética® 400 ND) e posteriormente incinerados em mufla (Tecnal® TE-387) a 600 °C. As amostras incineradas foram resfriadas em dessecador por 1 h e pesadas. O teor de cinzas totais foi determinado pela Equação 3 (método 923.03 da AOAC, 2012).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{p \times 100}{P}$$

(Eq. 3)

Em que:

p = massa de cinzas (g) = massa do cadinho com a amostra (g) - massa do cadinho vazio (g);

P = massa da amostra (g).

Para determinação do pH do extrato de ISP utilizou-se o medidor de pH digital (Digimed DM 20) previamente calibrado introduzindo-se o eletrodo diretamente no extrato para a leitura do pH conforme metodologia de IAL (2008) adaptado.

A presença e a distribuição de ISP no extrato obtido foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE). Amostras de 2 mL de extrato de ISP foram concentradas em concentrador (Eppendorf® concentrator plus), a fim de reduzir o volume da amostra e aumentar a quantidade de proteína em $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Para realização da eletroforese, foi utilizado o método vertical com placas de 10x10 cm, descontínuo de alta resolução em SDS–PAGE, descrito por Vieira (2011) com adaptações, empregando-se gel de empilhamento (*stacking gel*) de poliacrilamida (Sigma Alderich®) a 4 % (m/v) e gel de fracionamento (*runnig gel*) de poliacrilamida (Sigma Alderich®) a 12,5 % (m/v) em uma voltagem constante de 80 V durante 3 h utilizando padrões de baixa massa molecular (GE Healthcare®). Para coloração do gel foi utilizada solução de *comassie blue* em 50 % (v/v) etanol e 10 % (v/v) ácido acético. O gel foi avaliado qualitativamente e as bandas de proteínas identificadas visualmente.

4.4. Caracterização dos fermentos biológicos comerciais

4.4.1. Análises físico-químicas

Foi avaliada pelo método de Kjeldahl modificado para proteína bruta a partir de amostras contendo $2\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$ (AOAC, 2012).

Para avaliação da umidade, sólidos totais e cinzas foi utilizada as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012) mencionadas nos itens 4.3.3.

4.4.2. Isolamento e quantificação de leveduras

Foram utilizadas amostras de fermento biológico fresco e fermento biológico seco instantâneo (Fleishmann®) conforme metodologia descrita por Silva et al. (2010) com modificações de Lindholz et al. (2010). Foi retirada, de forma asséptica, 25 g de fermento biológico e adicionados 225 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e posteriormente homogeneizadas por 3 min seguido de diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas por espalhamento em superfície (*spread plate*) em meio sólido YPG (*yeast extract-peptone-dextrose*) contendo 1 % (m/v) de extrato de levedura (Kasvi®), 2 % (m/v) de peptona (Kasvi®), 2 % (m/v) de glicose (Dinâmica®) e 2 % (m/v) de ágar (Vetec®) em placas de Petri descartáveis (Kasvi®) em duplicata e em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD (Eletrolab® EL 202/4) a 30 °C por 48 h. Após este período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de cada repetição e a média dos resultados foi expresso como log UFC. g⁻¹. As colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo YPG (extrato de levedura (Kasvi®) a 1 % (m/v), peptona (Kasvi®) a 2 % (m/v) e glicose (Dinâmica®) a 2 % (m/v) e, em seguida, incubadas a 30 °C por 48 h. Após este período, 1 mL foi transferido para microtubos esterilizados e centrifugados (Centrifuge® 5418) a 3500 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 1 mL de caldo YPG adicionado de 30 % (v/v) de glicerol estéril e estocados a - 25 °C para análises posteriores. As estirpes isoladas foram codificadas como MScF (estirpe isolada de fermento biológico fresco) e MScS (estirpe isolada de fermento biológico seco instantâneo) para efeito de discussão nesse trabalho.

4.4.3. Confirmação da identidade de leveduras

O DNA das estirpes de leveduras isoladas de fermento biológico fresco e seco foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Lachance (1990) adaptada por Silva (2016). As estirpes foram incubadas em meio líquido YPG a 28 °C por 12 h. Após este período, o material foi distribuído em microtubos e centrifugadas por 2.236 x g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi incubado em tampão de lise [50 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; 10 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 20 mL de NaCl 5 M; 50 mL de SDS a 10% (m/v)] a 65 °C por 30 minutos. Após este procedimento, foi

adicionado 100 µl de solução fenol:clorofórmio:álcool isopropílico na proporção 25:24:1. Posteriormente, as amostras foram agitadas durante 3 minutos e centrifugadas a 6.000 x g por 15 min. Após este período, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo sendo adicionado um volume de 100 µL de etanol 95 % (v/v) gelado e 20 µL de solução de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ (m/v). Após essa etapa, a amostra foi homogeneizada por inversão e novamente centrifugada a 6.000 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuscitado com 100 µL de solução tampão TE pH 8,0 (10 mL de Tris-HCL 1M, pH 8,0; 2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0). O DNA genômico total foi quantificado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

A identificação das leveduras foi realizada por sequenciamento da região D1-D2 do fragmento do gene da subunidade maior do ribossomo 26S (MEYER; ROSA e LACHANCE, 1998) e as amostras enviadas à empresa MacroGen® Inc. (Coréia do Sul) utilizando a sequência dos oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Sequência de oligonucleotídeos para reação de amplificação.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

Fonte: Meyer, Rosa e Lachance (1998).

Após a obtenção dos dados do sequenciamento, os mesmos foram analisados usando o programa CLC Genomics Workbench versão 6.5.1 (CLCbio) para triagem dos dados, removendo os nucleotídeos mal sequenciados, para triagem e obtenção das sequências consenso, as quais foram alinhadas às sequências contidas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4.4. Avaliação do crescimento microbiano

O crescimento das leveduras isoladas dos fermentos biológicos fresco e seco foi avaliada e determinada a velocidade específica (μ_x) de cada estirpe. Para isso, um pré-inóculo de cada estirpe de levedura foi preparado em frascos com 9 mL de meio líquido YPG acrescido de 1 mL de cada estirpe e incubados a 30 °C por 12 h em duplicata. Após este período, aproximadamente 2 mL da cada cultura ativa foi transferida para 30 mL de meio YPG para acompanhamento da multiplicação celular via leituras de absorvância em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech® Novaspec II) no comprimento de onda de 600 nm a cada 2 h até que fosse atingida a fase estacionária. Quando necessário, os inóculos foram diluídos em meio líquido YPG para obter a concentração apropriada para leitura da absorvância no equipamento. A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi avaliada com base no modelo matemático de Gompertz modificado (Equação 4).

$$Y(t) = A + C \{ \exp[- \exp(-B (t - M))] \} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

$Y(t)$ = Densidade populacional do micro-organismo no tempo t

A = Valor de assíntota inferior ($\log N(-\infty)$) – o que representa o log da população inicial de micro-organismo

C = valor da assíntota superior ($\log N(+\infty)$) – o que representa o log da densidade máxima da população microbiana durante a fase estacionária menos o log da população inicial

M = tempo em que a velocidade de crescimento absoluta é máxima

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M

t = tempo

As equações 5, 6, 7 e 8 apresentam os parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada.

$$\mu_x = \frac{BC}{e}$$

(Eq. 5)

$$GT = [Log(-2)] \left(\frac{e}{BC}\right)$$

(Eq. 6)

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right)$$

(Eq. 7)

$$MPD = A + C$$

(Eq. 8)

Em que:

e = constante neperiana

μ_x = taxa de crescimento [Log (UFC. mL⁻¹). h⁻¹]

GT = tempo de geração (h)

λ = duração da fase lag

MPD = log da densidade máxima da população [Log (UFC. mL⁻¹)]

Os dados foram ajustados às equações e analisados pelo *software* DMFit versão 2.1 cedido pelo Dr. Baranyi (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit) e executado a partir da planilha eletrônica Microsoft Excel.

4.5. Efeito dos extratos sobre a viabilidade das leveduras

4.5.1. Avaliação do efeito da adição dos extratos de ISP sobre a viabilidade das leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais quanto ao congelamento em meio de cultura.

Foi avaliada a resistência das células de leveduras isoladas de fermento seco e fresco quanto ao congelamento no tempo 0 e após 10, 20, 30 e 40 dias de congelamento sem os extratos de ISP (0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG - controle) e com concentrações de 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de

proteína .100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG em três repetições. Foi retirada uma alíquota de 1mL da estirpe de levedura isolada conforme item 4.3.2 e ativada em 9 mL de meio líquido YPG a 30 °C por 12 h. Após este período, 900 µL desta suspensão foram distribuídas em microtubos e centrifugados (Centrifuge® 5418) a 3500 x g por 15 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado com 900 µL de meio líquido YPG contendo as diferentes concentrações de extrato de ISP. Posteriormente, as amostras foram congelados a - 22 °C. O plaqueamento foi realizado pelo método *spread plate* em meio sólido YPG. Alíquotas de 100 µL das diluições foram plaqueadas em placas de Petri descartáveis (Kasvi®) em duplicata e em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C (Eletrolab® EL 202/4) por 48 h. Após este período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e o resultado foi expresso em log UFC mL⁻¹.

A contagem de leveduras viáveis foi realizada em câmara de Neubauer (New Optics®) conforme metodologia proposta por Neves (2003) com adaptações no tempo 0 e após 10, 20, 30 e 40 dias de congelamento sem os extratos de ISP (0 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG - controle) e com concentrações de 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG em três repetições. Para diluição da amostra e carregamento da câmara, foi coletada 100 µL da amostra de suspensão celular e transferida para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, o volume do microtubo foi completado com 800 µL de água destilada e 100 µL de solução de azul de metileno 1 % (m/v). A contagem de células da câmara de Neubauer foi realizada por visualização microscópica, onde foi efetuada nos 4 quadrantes maiores localizados nas laterais da câmara com o auxílio do microscópio óptico (Olympus® BX41) no aumento de 40 x. A viabilidade das células foi observada através da coloração com azul de metileno, e o cálculo do número de células viáveis foi realizado de acordo com a Equação 9 e expresso em log Cel. mL⁻¹.

$$N (\text{Cel. mL}^{-1}) = C \times Q \times D \times 10^4$$

(Eq.9)

Em que:

N = Concentração celular (células.mL⁻¹)

C = Média da contagem de células viáveis

Q = Número de quadrantes da câmara (16)

D = Fator de diluição (10 x)

10⁴ = Volume da câmara de Neubauer (mL)

A porcentagem de células não viáveis foi avaliada através do número de células coradas de azul presentes na amostra no tempo 0 e após 10, 20, 30 e 40 dias de congelamento sem os extratos de ISP (0 µg de proteína .100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG - controle) e com concentrações de 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG em três repetições. O número de células não viáveis foi avaliado pela razão entre o número de células não viáveis e o número de células totais conforme metodologia proposta por Neves (2003).

A porcentagem de células não viáveis foi obtida através da Equação 10:

$$\% I = \frac{N_1 \times 100}{N_2}$$

(Eq. 10)

Em que:

% I = Porcentagem de células não viáveis

N₁ = Número de células não viáveis

N₂ = Número de células totais

4.6. Análise microscópica das estirpes de leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais congeladas em meio contendo diferentes concentrações de ISP

A visualização das estirpes de leveduras isoladas dos fermento biológicos comercial fresco e seco instantâneo foi avaliada como descrito por Silva et al. (2010), com adaptações para observação microscópica a fresco no tempo 0 e após 10, 20, 30 e 40 dias de congelamento sem os extratos de ISP (0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG - controle) e com concentrações de 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína .100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG. Uma

alíquota de 10 µL foi retirada do microtubo contendo a suspensão de levedura e colocada sobre uma lâmina de vidro, sendo, posteriormente, coberta com uma lamínula. As características morfológicas das células foram observadas com auxílio de microscópio óptico Olympus BX50 no aumento de 100 x e as imagens foram fotodocumentadas usando o programa Q Capture Pro versão 6.0.

4.7. Efeito do extrato de ISP sobre as leveduras durante o congelamento em massas

As massas de pão francês foram elaboradas segundo método 10-10B da AACC (2000) com modificações de Vieira (2011) em condições laboratoriais. Para cada repetição, 280 g de farinha de trigo foram utilizadas seguindo a formulação como descrita na Tabela 2:

Tabela 2- Formulação da massa de pão francês.

Ingredientes	Formulação (Baker`s %)
Farinha de trigo tipo 1 (Vilma®)	100
Açúcar cristal comercial (Alvinho®)	6,0
Fermento biológico seco instantâneo (Fleischman®)	5,5
Reforçador (Bunge®)	0,5
Cloreto de sódio (Sosal®)	1,5
Gordura vegetal hidrogenada (Primor®)	1,0
Água destilada esterilizada	60,0

Os ingredientes foram pesados em balança semi analítica e misturados em masseira (Arno® modelo BPA) com haste tipo gancho por aproximadamente 8 minutos até o desenvolvimento da massa com aspecto liso e homogêneo. Primeiramente, foram adicionados e homogeneizados os ingredientes secos em seguida, o fermento previamente diluído em água para garantir melhor incorporação na massa. A gordura vegetal hidrogenada foi adicionada após alguns minutos de mistura sendo, por fim adicionada a água. Neste trabalho, a escolha pelo fermento seco instantâneo para elaboração das massas congeladas foi baseada na praticidade de uso, maior durabilidade, dispensa a necessidade do armazenamento refrigerado e ser economicamente mais viável.

As massas prontas foram divididas em peças de $25 \pm 0,2$ g, e estas foram boleadas, cilindradas e modeladas manualmente, acondicionadas em mini fôrmas de alumínio retangulares de 33 cm³ previamente esterilizadas, e em

seguida cobertas com película semi transparente (Parafilm®) para congelamento em freezer a - 25 °C por 3 h. As massas congeladas foram desenformadas e acondicionadas em sacos de polietileno esterilizados para evitar contaminação cruzada e perda de água durante a estocagem e, posteriormente, identificados. As amostras foram mantidas em freezer a - 25 °C para análises nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 dias de armazenamento (Figura 7).

Foram preparadas massas sem adição de extrato de ISP (0 µg de proteína .100 g⁻¹ de massa - controle) e massas com extrato de ISP em quantidade suficiente de para fornecer 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa. O extrato foi adicionado à massa diluído em água. Foram realizadas 3 repetições de cada tratamento, em que cada tratamento deu origem a 15 pães sendo utilizados e escolhidos de forma aleatória para as análises de determinação da sobrevivência da levedura na massa, medida da taxa fermentativa e volume da massa durante os tempos 0, 10, 20, 30 e 40 dias, totalizando 90 pães.

Também foram preparadas massas sem adição de fermento e sem adição de extrato de ISP e massas com fermento e sem adição de extrato de ISP (controle negativo e positivo, respectivamente) para cada repetição. O objetivo destes controles foi garantir que todo gás produzido na massa fosse exclusivamente proveniente do metabolismo da levedura. Dessa forma, os valores encontrados nestes controles foram descontados nos resultados obtidos das formulações de massas sem adição de extrato de ISP aclimatado (0 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa - controle) e massas com extrato de ISP aclimatado ao frio (8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa) nas análises de volume e de produção de CO₂.

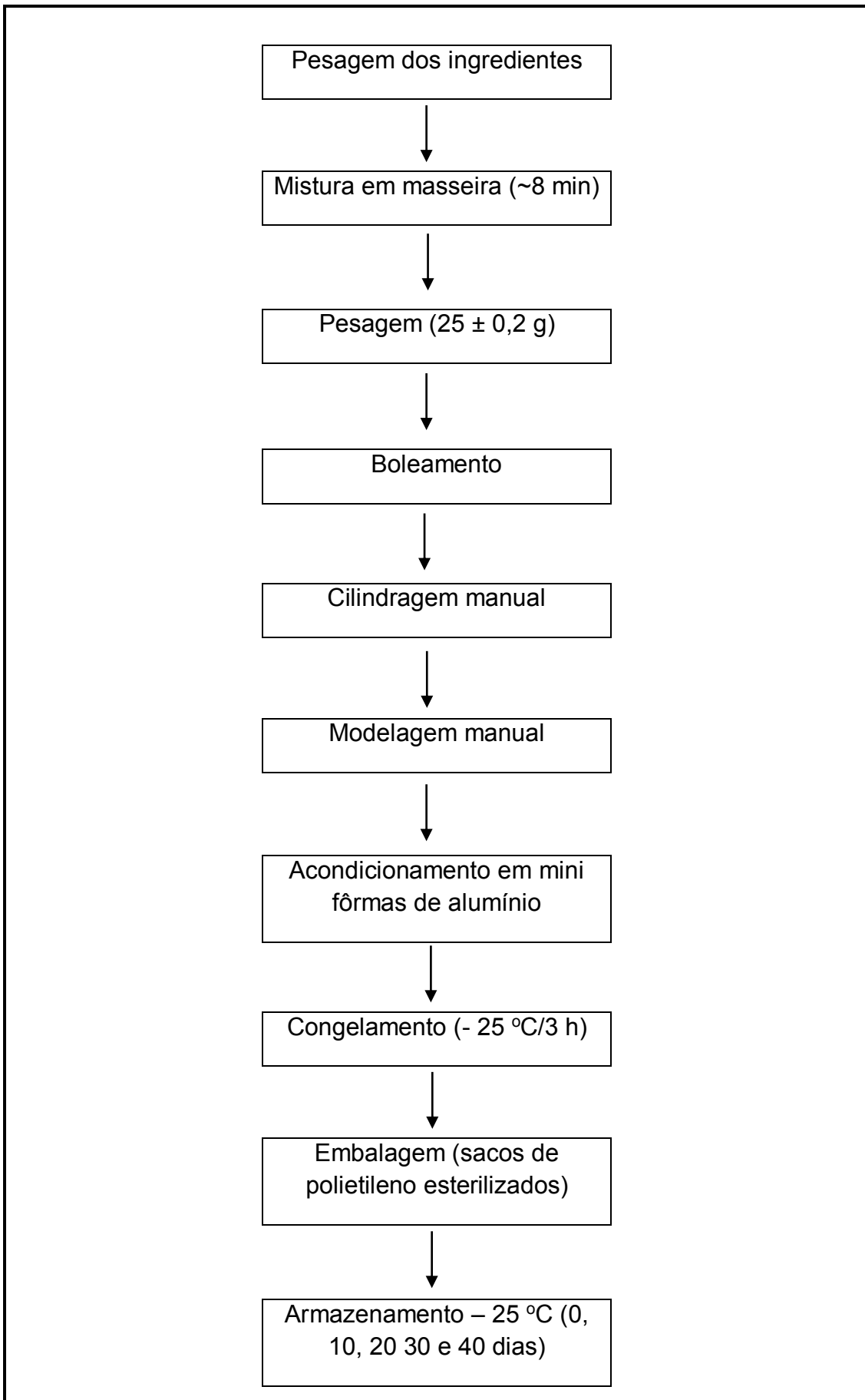


Figura 7- Etapas da preparação da massa de pão francês congelada.

4.7.1. Determinação da resistência das leveduras na massa após o congelamento

Para contagem de células de leveduras presentes na massa, foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2010) com modificações de Lindholz et al. (2010). Foram retirados de forma asséptica e aleatória 25 g de massa e adicionados a 225 mL de solução salina 0,85 % (m/v) sendo, posteriormente, homogeneizados por 10 min seguido de diluições seriadas. O plaqueamento foi realizado pelo método *spread plate* em meio de cultura ágar YPG acrescido de 1 % (v/v) de solução de ácido tartárico 10 % (m/v) estéril. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram colocadas em placas de Petri descartáveis (Prolab®) em duplicata e, em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C (Eletrolab® EL 202/4) por 72 h. Após este período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), sendo expressa em log UFC g⁻¹.

4.7.2. Avaliação da produção de CO₂ pelas leveduras

A capacidade fermentativa das leveduras na massa foi mensurada por respirometria com o auxílio de um respirômetro do tipo CO₂ (Figura 8) conforme metodologias descritas por Tomé et al. (2015) e Bernardes et al. (2016) com adaptações. A avaliação da produção de CO₂ pelas leveduras foi realizada em massas sem os extratos de ISP (0 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa) nas massas contendo de extrato de ISP (8 µg de proteína .100 g⁻¹ de massa) e nas massas controle negativo e positivo, nos tempos 0, 10, 20 30 e 40 dias de congelamento. Amostras de 0,5 g de massas de cada tratamento foram acondicionadas em câmaras de vidro com capacidade volumétrica de 25 mL, em duplicata e conectadas a um sistema completamente fechado. A produção de CO₂ pelas leveduras foi mensurada utilizando o respirômetro TR3C equipado com um analisador de CO₂ (Sable Systems International, Las Vegas, NV, EUA) durante 3 h.

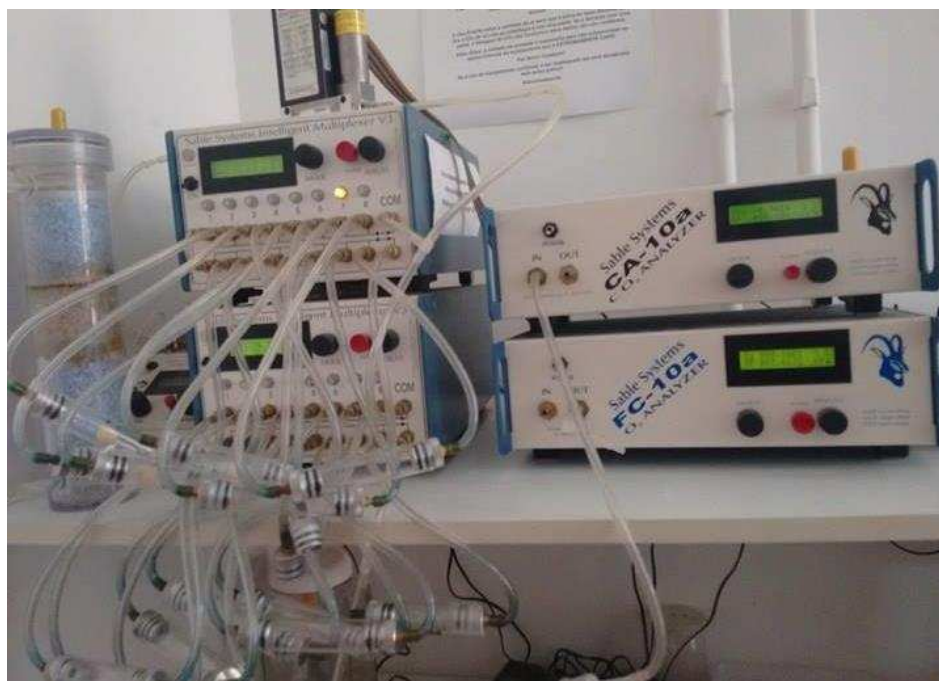


Figura 8- Respirômetro do tipo CO₂.

4.7.3. Avaliação do volume da massa

A avaliação do volume da massa foi realizada conforme as metodologias de Limongi (2010), Aquino (2012) e Meziani et al (2012) com adaptações. Porções de 10 g de massa congelada sem os extratos de ISP (0 μg de proteína.100 g^{-1} de massa), massas contendo de extrato de ISP (8 μg de proteína. 100 g^{-1} de massa) e massas do controle negativo e positivo foram inseridas em duplicatas em provetas graduadas de 100 mL esterilizadas. As massas foram pressionadas com o auxílio de um bastão previamente esterilizado até atingir a graduação de 10 mL, a abertura das provetas foram vedadas com película semi transparente (Parafilm®) para evitar a formação de crosta na superfície da massa por ressecamento. As amostras contidas na proveta foram incubadas a 30 °C (Eletrolab® EL 202/4) e umidade relativa (UR ~ 69 %) durante 3 h sendo o volume final da massa determinado pela medição do ponto mais alto da massa dentro da proveta. O aumento do volume da massa foi avaliado pela diferença do volume final em relação ao volume inicial (ΔV) expresso em mL (Figura 9).



Figura 9- Medição do volume da massa. **A:** massa pressionada até 10 mL antes da incubação; **B:** aumento do volume da massa após a incubação (30 °C/3 h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise físico-química dos extratos de ISP

Quanto à composição físico-química dos extratos de ISP da cultivar BRS Guabiju, foi verificado o conteúdo de sólidos totais de $1,32 \pm 0,15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, proteínas $52,27 \pm 2,19 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (expresso em matéria seca), % cinzas $0,48 \pm 0,007$ (expresso em matéria seca) e pH $3,86 \pm 0,03$.

Durante a impregnação à vácuo, o contato entre o solvente de extração e as ISP presentes no apoplasto é favorecido, de modo que o poder de extração do solvente é aumentado, ocasionando a extração de maior quantidade de proteínas do extrato em comparação a outros métodos que não utilizam essa abordagem. No entanto, embora a infiltração à vácuo tenha sido utilizada, o teor de proteína do extrato, neste trabalho, apresentou-se inferior em comparação ao estudo de Vieira (2011), que encontrou valores de $60,69 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (expresso em matéria seca) no extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju. Embora o mesmo cultivar de trigo e a impregnação a vácuo tenham sido empregados em ambos os estudos, a diferença associada à composição química dos extratos de ISP possivelmente se deve às condições distintas de plantio, temperatura de aclimação e umidade relativa, assim como o método utilizado para obtenção do extrato bruto de ISP. No estudo de Vieira (2011), o cultivo das folhas de trigo ocorreu em solo contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, superfosfato simples e calcário dolomítico em condições aclimatadas à temperatura de 0 °C a 3 °C com umidade relativa de 80 % e iluminação de $18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 7 semanas sendo,

posteriormente, utilizando o método de extração proposto por Zhang et al., (2008) que envolve o uso de solução tampão Tris HCl (pH 7,4).

A Figura 10 representa a imagem do gel obtido por eletroforese SDS-PAGE na identificação de ISP do extrato de trigo BRS Guabiju aclimatado ao frio após 25 dias de aclimação. Neste estudo foi possível observar a presença de duas bandas proteicas, uma de 20,1 kDa e outra na faixa de 20,1 kDa - 30,0 kDa.

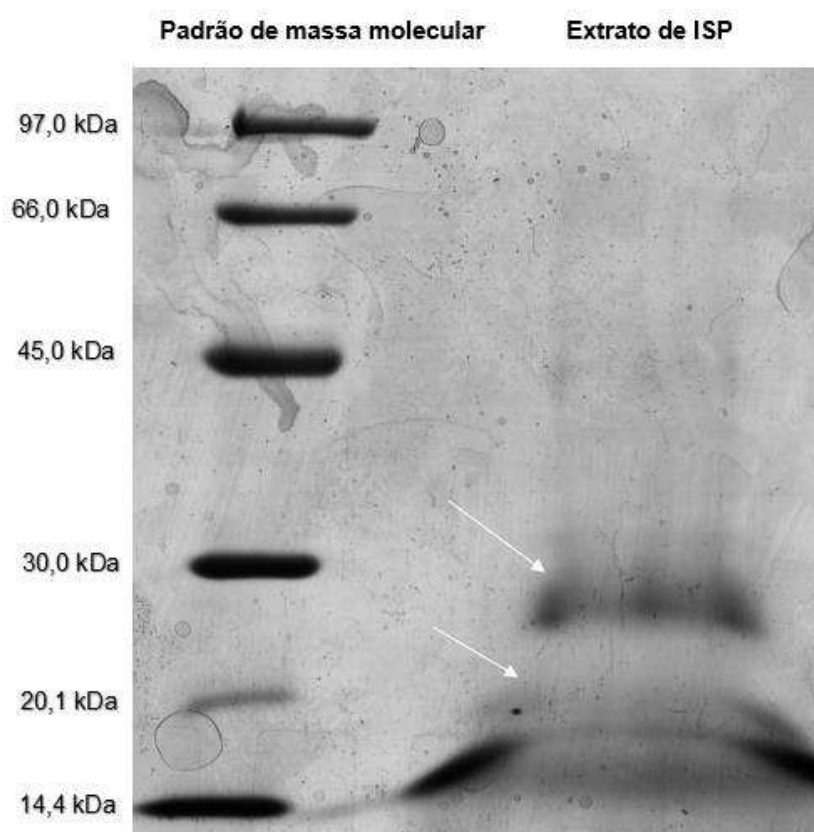


Figura 10- Perfil proteico em SDS-PAGE do extrato obtido pelo cultivar de trigo BRS Guabiju aclimatado ao frio. As setas indicam as bandas de proteínas presentes no extrato.

Vieira (2011), ao estudar o perfil eletroforético de proteínas obtidas a partir do extrato bruto de BRS Guabiju, constatou também a presença de duas proteínas de massa molecular semelhante às encontradas neste trabalho.

A presença de proteínas em extratos de trigo aclimatados de outros tipos de cultivares foram reportados por Vieira (2011). Cultivares de trigo de inverno apresentaram proteínas na faixa de 14,4 kDa a 66,0 kDa, assim como os

cultivares de trigo de primavera com intervalo de massa molecular entre 20,1 kDa a 66,0 kDa.

Estudos envolvendo a incorporação de ISP obtidas a partir de trigo de inverno em massas congeladas foram realizados por Xu et al. (2009) para avaliar a capacidade de retenção de água e propriedades panificadoras. Neste estudo, os autores identificaram a presença de 2 bandas de ISP no extrato protéico, sendo uma na faixa 14 kDa -30 kDa e a outra em torno de 14 kDa -15 kDa.

Em extratos de folhas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Vienna) cultivadas a 4 °C por 6 semanas, Hassas Roudsari (2011) relatou a presença de ISP separadas por SDS-PAGE na faixa de 21,5 kDa a 31,0 kDa. Neste estudo foi observado que essas proteínas apresentaram inibição na recristalização e a redução dos tamanhos dos cristais de gelo. Estes dados são consistentes com os resultados relatados por Atici e Nalbantoglu (2003) mostrando que ISP em extratos apoplásicos de folhas de trigo de inverno apresentou massas moleculares variando de 12 kDa a 39 kDa (HASSAS ROUDSARI, 2011).

O método de extração utilizado pode influenciar na quantidade de bandas presentes no gel. Estudo realizado por Campelo (2014) em que foi avaliada a eficiência de diferentes métodos de extração e purificação das ISP de trigo, constatou que o método mais eficiente de extração consiste no sistema de impregnação à vácuo em solução de 20 mM de ácido ascórbico (pH 3) e 20 mM de CaCl₂, na proporção de 1:5 (amostra g: tampão g. mL⁻¹), sendo empregado o mesmo procedimento no presente trabalho. Essa metodologia permitiu a seleção de bandas proteicas exclusivamente na faixa de ISP com massas moleculares semelhantes ao apresentado aqui.

5.2. Análise da composição físico química dos fermentos biológicos comerciais

Os dados na Tabela 3 refere-se ao teor de umidade, proteínas e cinzas dos fermentos biológicos comerciais fresco e seco instantâneo.

Tabela 3- Valores de médias e desvio padrão do teor de umidade ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), de sólidos totais ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), proteínas ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e cinzas (%) nos fermentos biológicos fresco e seco instantâneo.

Fermentos	Umidade	Sólidos totais	Proteínas*	Cinzas*
Fresco	$69,50 \pm 0,04$	$30,50 \pm 0,04$	$57,38 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,24$
Seco instantâneo	$0,099 \pm 0,57$	$99,90 \pm 0,57$	$45,36 \pm 0,07$	$4,62 \pm 0,24$

* Os resultados estão expressos em matéria seca.

Conforme a Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 38 (BRASIL, 1977), o conteúdo de umidade para o fermento fresco deve ser no máximo $75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e para o fermento seco o conteúdo máximo de umidade recomendado é de $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. A CNNPA nº 38 não informa sobre o conteúdo de umidade para o fermento seco instantâneo. Devido a maior remoção de água do fermento seco instantâneo, este possui maior vida de prateleira, é economicamente mais viável, dispensa o armazenamento refrigerado, além de ser mais seguro microbiologicamente ao contrário do fermento fresco que necessita de transporte e armazenamento refrigerado para manter a viabilidade das células, além de apresentar menor durabilidade. No entanto, como as células do fermento fresco estão metabolicamente ativas, uma vez introduzidas na massa, a fermentação ocorre rapidamente (HUTKINS, 2006). Walker e Hill (2016) relata o conteúdo de sólidos totais de 15 % a 20 % para fermento biológico cremoso, 94 % a 96 % para fermento biológico seco e 30 % a 33 % para fermento biológico fresco (BEKATOROU, PSARIANOS e KOUTINAS 2006).

Teores máximos de cinzas para o fermento biológico fresco devem ser de $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Teores máximos de cinzas para o fermento seco não são mencionados na resolução (BRASIL, 1977). O teor de cinzas presentes nos fermentos biológicos está diretamente relacionada com os constituintes inorgânicos presentes nas células. Para Bekatorou, Psarianos e koutinas (2006), o teor de minerais em fermento biológico fresco varia entre $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $7,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Embora tenha sido analisado o conteúdo proteico, a resolução CNNPA nº 38 não estabelece teores de proteína para fermentos biológicos. O conteúdo de proteínas em fermento biológico apresenta ampla faixa de variação, dependendo do tipo de levedura e das condições em que é cultivada. Para o fermento biológico fresco, Bekatorou, Psarianos e Koutinas. (2006) descreve teores entre 40.6 g. 100 g⁻¹ a 58.0 g. 100 g⁻¹ de proteínas. Em leveduras de panificação, as proteínas estão presentes no citoplasma de várias formas. As que tem sido isoladas incluem albuminas, globulinas, fosfoproteínas, lecitoproteínas, nucleoproteínas e glicoproteínas (PYLER, 1988a).

5.3. Isolamento e quantificação das estirpes de leveduras dos fermentos biológicos comerciais

A presença de colônias de leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais fresco e seco instantâneo foi observada após 48 h de incubação a 30° C em meio sólido YPG. A quantificação de leveduras foi realizada em duplicata por meio de contagem padrão de colônias em placa e expressas em log UFC.g⁻¹ em que a quantidade de leveduras foi praticamente idênticas, para ambos os fermentos biológicos conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4- Contagem em placas de leveduras dos fermentos biológicos comerciais.

Fermento biológico	Log UFC.g⁻¹
Fresco	8,74 ± 0,16
Seco instantâneo	8,78 ± 0,16

As colônias obtidas tanto do fermento biológico fresco quanto do fermento biológico seco instantâneo crescidas em meio YPG a 30 °C por 48 h exibiram forma arredondada, bordas lisas, brilhante, coloração clara e textura cremosa

5.4. Confirmação da identidade das leveduras dos fermentos biológicos comerciais

O alinhamento das sequências de DNA confirmou a identidade das leveduras isoladas dos fermentos biológicos como sendo *S. cerevisiae*, sendo as sequências dos dois isoladas idênticas entre si (Tabela 5).

Tabela 5- Identificação molecular dos isolados dos fermentos biológicos comerciais fresco e seco instantâneo por sequenciamento da região D1/D2 do rRNA do gene 26S via *software* BLAST.

Isolados*	Descrição	E-value	Identificação	Acesso
MScF	<i>S. cerevisiae</i> estirpe K6-38	0,0	100 %	LC215947.1
MScS	<i>S. cerevisiae</i> estirpe K6-38	0,0	100 %	LC215947.1

*MScF: Estirpe isolada de fermento biológico fresco (25 MIC); MScS: Estirpe isolada de fermento biológico seco instantâneo (26 MIC).

Conforme Hughes et al. (2009), para a caracterização genômica, a sequência analisada deve ter compatibilidade com a sequência correspondente no GenBank, apresentando homologia de 98 % ou superior. Considerando os resultados obtidos, observa-se que para ambas as leveduras isoladas, a identificação foi de 100 % de compatibilidade com a sequência depositada no GenBank, confirmando de forma segura a identidade dos fermentos biológicos.

Para identificação molecular de leveduras não-*Saccharomyces* partir de polpa fermentada de uva, Ponzzes (2010) empregou a técnica de sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Neste estudo, as espécies de não-*Saccharomyces* identificadas pelo sequenciamento foram *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. galeiformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. zemplinina* e *Wickerhamomyces anomalus*.

Segundo Kurtzman e Robenett (1998) e Ponzzes (2010), o sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rRNA, é uma técnica molecular que possui variação suficiente para a caracterização taxonômica de forma precisa da maioria das leveduras ao nível de espécie.

5.5. Avaliação do crescimento das leveduras isoladas dos fermentos biológicos comerciais

As curvas de crescimento referentes à multiplicação das leveduras isoladas do fermento biológico fresco e seco instantâneo estão apresentadas na Figura 11.

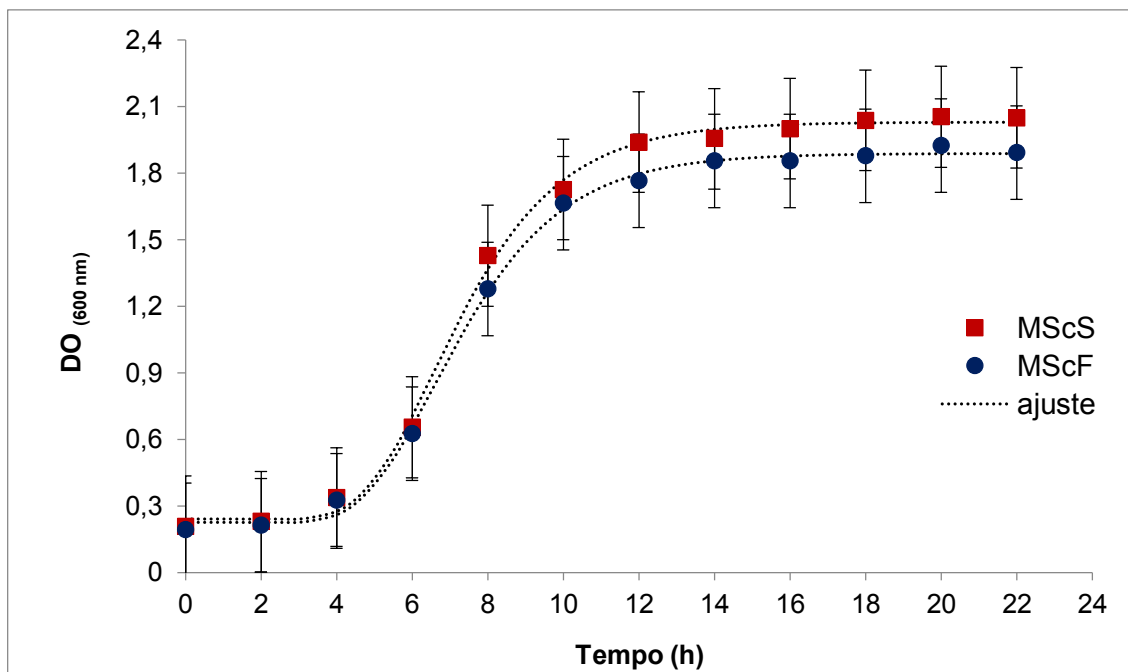


Figura 11- Curvas de crescimento das estirpes de leveduras isoladas de fermento biológico fresco (MScF) e fermento biológico seco instantâneo (MScS) em meio de cultura YPG.

Neste estudo, a velocidade específica de crescimento (μ_x) para a estirpe isolada do fermento biológico fresco foi de $0,3226 \text{ h}^{-1}$ com coeficiente de determinação (R^2) de $0,997$. Para a estirpe isolada do fermento biológico seco instantâneo o μ_x foi de $0,3530 \text{ h}^{-1}$ com $R^2 = 0,996$ conforme a curva de crescimento obtida pelo *software* DMFit (Figura 11) O modelo utilizado neste estudo ajustou-se bem aos dados com alto índice de correlação ($R^2 > 0,95$), indicando a validade estatística do parâmetro calculado (μ_x).

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) de cinco linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de produtos de abelhas foram estudadas por Silva (2016) em meio YPG 2 % a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo a leitura de densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) monitorada a cada 30 min durante 24 h. Neste trabalho, as velocidades específicas obtidas por regressão linear apresentaram-se na faixa de $0,120 \text{ h}^{-1}$ a $0,520 \text{ h}^{-1}$, sendo que, uma das linhagens apresentou $\mu_x = 0,370 \text{ h}^{-1}$. Este valor se assemelha aos que foram encontrados para as leveduras isoladas do fermento biológico fresco e seco instantâneo.

Observa-se que, as velocidades específicas de crescimento (μ_x) das estirpes isoladas do fermento biológico fresco e seco instantâneo foram

semelhantes, dessa forma, a escolha do tipo de fermento biológico para a elaboração das massas congeladas foi aleatória.

5.6. Avaliação do efeito da adição do extrato de ISP sobre a viabilidade das leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais quanto ao congelamento em meio de cultura

O extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju não apresentou efeitos tóxicos às células, visto que, a contagem antes do congelamento ($\pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) tanto no controle quanto das demais concentrações testadas foram iguais (Tabela 6 e 7).

Tabela 6- Viabilidade de *S. cerevisiae* (log UFC.mL⁻¹) isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	6 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	12 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$
0	7,54 \pm 0,03 ^{Aa}	7,50 \pm 0,09 ^{Aa}	7,63 \pm 0,12 ^{Aa}	7,86 \pm 0,07 ^{Aa}	7,72 \pm 0,06 ^{Aa}
10	3,61 \pm 0,10 ^{Cb}	3,88 \pm 0,10 ^{Cb}	4,92 \pm 0,13 ^{Bb}	6,84 \pm 0,07 ^{Ab}	5,36 \pm 0,17 ^{Bb}
20	3,55 \pm 0,16 ^{Cb}	3,73 \pm 0,23 ^{Cb}	4,56 \pm 0,38 ^{Bbc}	6,78 \pm 0,13 ^{Ab}	4,94 \pm 0,03 ^{Bbc}
30	2,47 \pm 0,24 ^{Cc}	2,77 \pm 0,18 ^{Cc}	4,03 \pm 0,01 ^{Bc}	6,43 \pm 0,40 ^{Ab}	4,61 \pm 0,23 ^{Bbc}
40	2,46 \pm 0,08 ^{Cc}	2,76 \pm 0,28 ^{Cc}	3,37 \pm 0,12 ^{Cd}	6,38 \pm 0,40 ^{Ab}	4,42 \pm 0,34 ^{Bc}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7- Viabilidade de *S. cerevisiae* (log UFC.mL⁻¹) isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	4 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	6 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$	12 $\mu\text{g}.100\text{ mL}^{-1}$
0	7,40 \pm 0,09 ^{Aa}	7,59 \pm 0,07 ^{Aa}	7,58 \pm 0,02 ^{Aa}	7,97 \pm 0,03 ^{Aa}	7,37 \pm 0,30 ^{Aa}
10	5,25 \pm 0,29 ^{Bb}	6,51 \pm 0,38 ^{Ab}	6,52 \pm 0,19 ^{Ab}	7,37 \pm 0,07 ^{Ab}	6,84 \pm 0,04 ^{Ab}
20	3,86 \pm 0,03 ^{Cc}	5,00 \pm 0,08 ^{Bc}	6,01 \pm 0,11 ^{Abc}	6,16 \pm 0,06 ^{Ab}	6,87 \pm 0,29 ^{Ab}
30	2,61 \pm 0,05 ^{Cd}	4,65 \pm 0,17 ^{Cc}	5,77 \pm 0,04 ^{Cc}	6,32 \pm 0,45 ^{Ab}	5,83 \pm 0,17 ^{Bb}
40	2,72 \pm 0,17 ^{Dd}	3,88 \pm 0,10 ^{Cd}	5,46 \pm 0,07 ^{Bc}	6,54 \pm 0,31 ^{Ab}	5,23 \pm 0,09 ^{Bc}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi constatado que o congelamento ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) teve influência na viabilidade das leveduras de ambos os fermentos biológicos, visto que, para todos os tratamentos, houve redução de células ao longo do tempo comparado à contagem inicial (tempo 0) na contagem em placa. Este evento pode estar

associado à formação de cristais de gelo intracelular e extracelular durante o período de estocagem, causando danos à integridade das células, injúria ou morte celular. Entretanto, foi observado que a concentração de 8 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG foi suficiente para exercer maior crioproteção para ambos os fermentos biológicos durante o tempo de armazenamento.

Em laboratórios e centros de pesquisa, o congelamento de estirpes microbianas é um procedimento normalmente realizado para manter a viabilidade das cepas por períodos prolongados. Portanto, agentes crioprotetores são adicionados à suspensão celular de forma a proteger as estirpes contra os danos causados pelo congelamento e descongelamento (SAEKI et al., 2015), sendo que muitos dos quais se ligam à moléculas de água alterando o tamanho e reduzindo a formação dos cristais de gelo, além de reduzir as concentrações de solutos no meio intra e extra celular (HUBÁLEK, 2003). Segundo Nash (1962) um agente crioprotetor deve ter baixa massa molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular. Considerando as características supracitadas sobre as ISP e com os resultados obtidos neste trabalho, percebe-se que o extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju possui potencial de utilização na manutenção da viabilidade de estirpes microbianas congeladas em laboratórios, demonstrando ser uma alternativa promissora uma vez que atende os requisitos exigidos para um agente crioprotetor.

Foi possível perceber, pela contagem na câmara de Neubauer, que o extrato de ISP protegeu as leveduras quanto aos efeitos adversos do congelamento, demonstrando que a concentração de 8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG apresentou maior eficiência na manutenção da viabilidade das células de *S. cerevisiae* do fermento biológico fresco ($P < 0,05$) (Tabela 10). Para o fermento biológico seco instantâneo, verificou-se que as concentrações 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG foram capazes de exercer crioproteção, não diferindo entre si ($P < 0,05$). Porém, observou-se que a concentração de 8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG apresentou maior estabilidade do número de células viáveis durante o tempo de armazenamento (Tabela 8 e 9).

Tabela 8- Contagem de células viáveis de *S. cerevisiae* em câmara de Neubauer (log Cel.mL⁻¹) isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 µg.100 mL ⁻¹	4 µg.100 mL ⁻¹	6 µg.100 mL ⁻¹	8 µg.100 mL ⁻¹	12 µg.100 mL ⁻¹
0	7,50 ± 0,07 ^{Aa}	7,51 ± 0,02 ^{Aa}	7,59 ± 0,11 ^{Aa}	7,36 ± 0,05 ^{Aa}	7,60 ± 0,04 ^{Aa}
10	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	6,04 ± 0,27 ^{Bb}	6,08 ± 0,10 ^{Bb}	7,18 ± 0,09 ^{Aa}	6,31 ± 0,36 ^{ABb}
20	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	5,98 ± 0,24 ^{Bb}	7,26 ± 0,17 ^{Aa}	6,30 ± 0,27 ^{Bb}
30	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	5,92 ± 0,17 ^{Bb}	7,17 ± 0,09 ^{Aa}	6,14 ± 0,39 ^{Bb}
40	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	5,72 ± 0,03 ^{Bb}	6,84 ± 0,03 ^{Aa}	6,00 ± 0,48 ^{Bb}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 9- Contagem de células viáveis de *S. cerevisiae* em câmara de Neubauer (log Cel.mL⁻¹) isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 µg.100 mL ⁻¹	4 µg.100 mL ⁻¹	6 µg.100 mL ⁻¹	8 µg.100 mL ⁻¹	12 µg.100 mL ⁻¹
0	7,71 ± 0,13 ^{Aa}	7,71 ± 0,08 ^{Aa}	7,53 ± 0,17 ^{Aa}	7,56 ± 0,11 ^{Aa}	7,64 ± 0,30 ^{Aa}
10	6,20 ± 0,02 ^{Bb}	6,20 ± 0,02 ^{Bb}	6,75 ± 0,10 ^{ABb}	7,21 ± 0,22 ^{Aa}	6,36 ± 0,06 ^{Bb}
20	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	6,40 ± 0,17 ^{Bb}	6,30 ± 0,17 ^{Bbc}	7,30 ± 0,05 ^{Aa}	6,66 ± 0,10 ^{ABb}
30	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	0,00 ± 0,00 ^{Cc}	6,15 ± 0,23 ^{Bc}	7,24 ± 0,19 ^{Aa}	6,20 ± 0,01 ^{Bb}
40	0,00 ± 0,00 ^{Bc}	0,00 ± 0,00 ^{Bc}	6,26 ± 0,47 ^{Ac}	6,20 ± 0,01 ^{Ab}	6,73 ± 0,22 ^{Ac}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Comparando os resultados relacionados à viabilidade dos fermentos biológicos fresco e seco instantâneo, tanto na contagem em placa quanto na câmara de Neubauer, nota-se que a redução do número de células do fermento biológico seco instantâneo foi menor do que do fermento fresco ao longo do tempo. Segundo Attfield (1997) e Thomaz (2008) durante o processo de produção do fermento biológico seco instantâneo, a água intra e extracelular é removida por secagem, desidratando as células e causando o estresse osmótico. O aumento da temperatura neste etapa pode levar a célula ao estresse térmico gerado pelo calor além disso, para prolongar a sua durabilidade, esse tipo de fermento é acondicionado em embalagens à vácuo, o que pode causar o estresse oxidativo. Possivelmente, todos os estresses causados durante a produção industrial da levedura seca instantânea aumentou a sua

tolerância a outros estresses não relacionados, como o estresse ao congelamento.

O crescimento de micro-organismos a temperaturas abaixo da temperatura ótima pode causar uma série de alterações fisiológicas e morfológicas. Baixas temperaturas pode levar ao desequilíbrio metabólico e a interrupção do crescimento devido à sensibilidade de alguns processos regulatórios metabólicos, gerando uma condição estressante às células (BEALES, 2004). Dessa forma, acredita-se que os resultados observados estejam relacionados à resposta adaptativa da levedura seca instantânea à nova condição, desenvolvida pela tolerância ou resistência ao estresse do choque frio.

Em *S.cerevisiae* foi demonstrado um conjunto de genes em resposta à temperatura reduzida, esses genes codificam proteínas da parede celular ricas em serina e alanina e que podem estar envolvidas na manutenção da integridade da parede e na fluidez da membrana celular (KONDO e INOUYE, 1991; NAKAGAWA et al., 2002). Além disso, a célula também sintetiza a trealose, o qual desempenha importante papel protetor durante o congelamento. Esse dissacarídeo interage com proteínas e fosfolípidos de membrana durante o estresse, mantendo a fluidez da membrana e o enovelamento protéico (SINGER e LINDQUIST, 1998). Embora as proteínas do choque frio possam ser responsáveis pela adaptação e retomada das condições normais da células em condições desfavoráveis, algumas evidências sugerem que o principal objetivo da resposta do choque térmico é proteger as células contra as lesões causadas pelo congelamento (AGUILERA, RANDEZ-GIL e PIETRO, 2007).

Embora os métodos de contagem empregados apresentem metodologias e princípios distintos, resultados diferentes foram observados neste trabalho quando quanto a viabilidade das leveduras nas concentrações de 0 µg e 4 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG a partir de 20 dias de congelamento. Na contagem em placa, observou-se a presença de colônias permitindo mensurar o número de células viáveis por unidade formadora de colônias, enquanto que, na câmara de Neubauer foi constatada a ausência de células vivas. Também foi possível constatar que, tanto a contagem em placa quanto a contagem em câmara de Neubauer a concentração 8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG apresentou maior efetividade na manutenção da viabilidade das leveduras dos fermentos biológicos durante a estocagem sob

congelamento. Entretanto, diferenças foram observadas no número de células viáveis ao longo do tempo entre as metodologias utilizadas.

A contagem em placa é uma técnica baseada na relação do número de células por massa ou volume de amostra (DIAS e SCHWAN, 2010). Este método é o mais utilizado na determinação de células viáveis por unidades formadoras de colônias (UFC) (SILVA et al., 2010). A contagem em câmara de Neubauer, assim como a contagem em placa, também envolve a contagem direta porém, a avaliação da viabilidade das células é realizada por microscopia sendo mensurada com o uso do corante azul de metileno que cora as células metabolicamente não viáveis, enquanto as células viáveis não se coram. A vantagem dessa técnica consiste na visualização prévia da morfologia celular, com a possibilidade de avaliar proporção de células vivas e mortas na amostra, na rapidez de execução pois não depende do tempo de incubação para analisar a quantidade de células presentes na amostra como acontece na técnica de plaqueamento, além disso, para verificação da viabilidade de células em função do tempo, a contagem em câmara de Neubauer é mais conveniente, uma vez que a viabilidade é mensurada com relação ao número de células vivas vistas microscopicamente. No entanto, na câmara de Neubauer, ao contrário da contagem em placa, não é possível a visualização morfológica das colônias (DIAS e SCHWAN, 2010).

As leveduras incubadas com o extrato de ISP na concentração de 8 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG foram aquelas que mais resistiram ao congelamento, o que é refletido na menor perda de viabilidade ao longo do período de armazenamento (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10- Porcentagem de perda de viabilidade de células de *S. cerevisiae* em isolada do fermento biológico fresco após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 µg.100 mL ⁻¹	4 µg.100 mL ⁻¹	6 µg.100 mL ⁻¹	8 µg.100 mL ⁻¹	12 µg.100 mL ⁻¹
0	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
10	74,67 ± 12,5 ^{Ab}	67,33 ± 10,9 ^{Ab}	64,33 ± 4,5 ^{Ab}	37,67 ± 10,7 ^{Bb}	57,33 ± 7,02 ^{ABb}
20	100 ± 0,00 ^{Ab}	100 ± 0,00 ^{Ac}	90,0 ± 7,0 ^{Ab}	24,67 ± 11,4 ^{Bab}	73,67 ± 9,23 ^{Ab}
30	100 ± 0,00 ^{Ab}	100 ± 0,00 ^{Ac}	90,67 ± 7,7 ^{Ab}	40,67 ± 18,2 ^{Bb}	80,67 ± 3,21 ^{Ab}
40	100 ± 0,00 ^{Ab}	100 ± 0,00 ^{Ac}	96,33 ± 0,6 ^{Ab}	41,67 ± 4,5 ^{Bb}	80,67 ± 25,7 ^{Ab}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 11- Porcentagem de perda de viabilidade de células de *S. cerevisiae* isolada do fermento biológico seco instantâneo após congelamento em meio de cultura YPG adicionado de extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju.

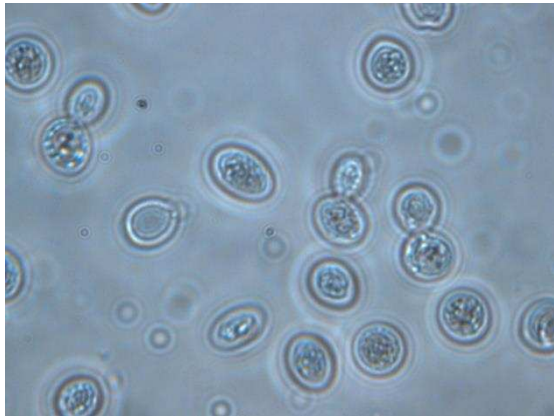
Tempo (dias)	Concentração de extrato de ISP				
	0 µg.100 mL ⁻¹	4 µg.100 mL ⁻¹	6 µg.100 mL ⁻¹	8 µg.100 mL ⁻¹	12 µg.100 mL ⁻¹
0	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
10	64,0 ± 6,24 ^{ABb}	38,3 ± 15,3 ^{Cb}	73,6 ± 7,57 ^{Ab}	45,6 ± 4,51 ^{BCb}	57,3 ± 3,05 ^{ABCb}
20	100 ± 0,00 ^{Ac}	83,6 ± 6,43 ^{ABc}	82,3 ± 11,2 ^{ABb}	24,67 ± 11,4 ^{Cab}	73,67 ± 9,23 ^{Bb}
30	100 ± 0,00 ^{Ac}	100 ± 0,00 ^{Ac}	86,33 ± 8,96 ^{Ab}	43,67 ± 15,7 ^{Bb}	87,67 ± 0,57 ^{Ab}
40	100 ± 0,00 ^{Ac}	98,67 ± 2,31 ^{Ac}	86,33 ± 10,6 ^{ABb}	36,33 ± 5,85 ^{Cb}	61,33 ± 21,9 ^{BCc}

Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

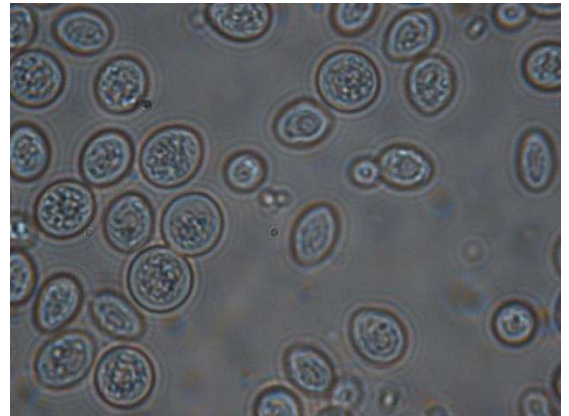
Apesar de alguns trabalhos terem demonstrando que concentrações mais elevadas de extrato de ISP tenham apresentado maior criopreservação nas propriedades de massas congeladas (VIEIRA, 2011; XU et al., 2009), o mesmo não foi observado para criopreservação das leveduras em meio de cultura. Considerando as concentrações avaliadas neste estudo, foi observado que o extrato de ISP apresentou efeito crioprotetor para os fermentos biológicos comerciais estudados, ficando evidenciado que a concentração de 8 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG exerceu melhor crioproteção durante o tempo de estocagem para todas as análises realizadas comparado a concentrações de 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG indicando que, a concentração de 8 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG apresentou efeito limitante para criopreservação das leveduras. Com base nesses resultados, é necessário estudos mais abrangentes considerando concentrações mais elevadas para investigar melhor este comportamento no fermento biológico.

5.7. Análise microscópica das estirpes de leveduras isoladas de fermentos biológicos comerciais congeladas em meio contendo diferentes concentrações de ISP

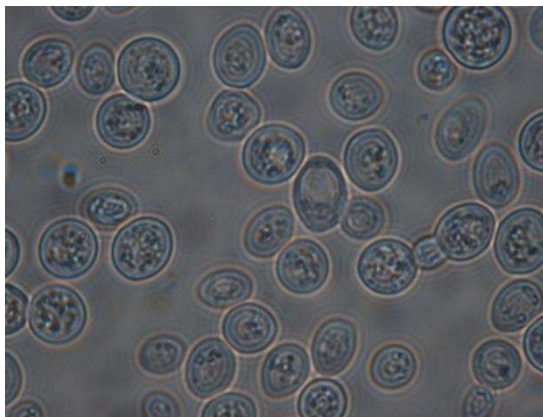
As leveduras isoladas dos fermentos biológicos comerciais fresco e seco instantâneo congeladas em meio líquido YPG foram avaliadas visualmente por meio de microscopia óptica (100 x) antes do congelamento e após 40 dias de congelamento (tempo 40). Nesta observação, foi possível perceber que, para todas as estirpes de ambos os fermentos biológicos em todas as concentrações testadas, que as células apresentavam-se íntegras, com morfologia bem definida antes do congelamento, indicando que o extrato de ISP inicialmente não causou nenhum efeito tóxico ou dano estrutural quando em contato com as células (Figuras 12 e 13).



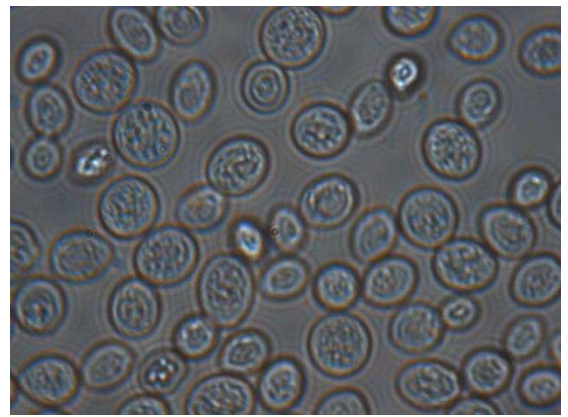
0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



4 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



6 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

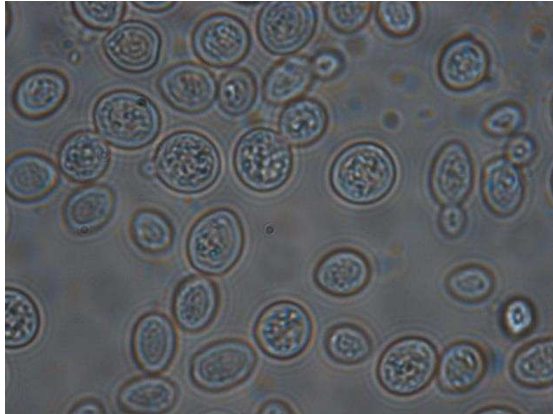


8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

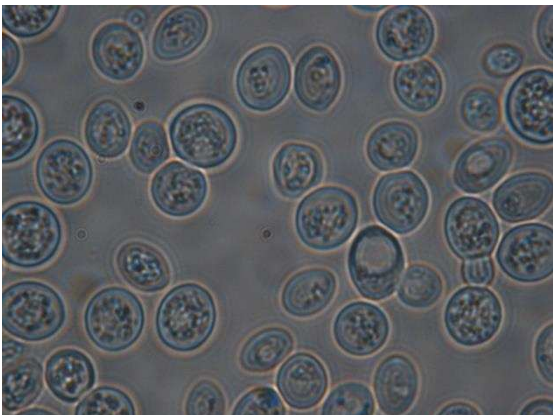
Figura 12- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico fresco antes do congelamento (tempo 0) (aumento de 100 x).



0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



4 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



6 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



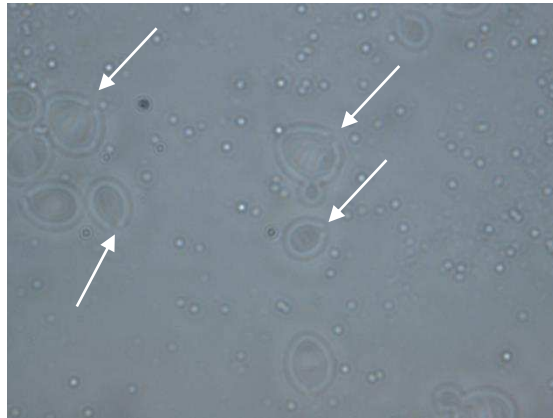
8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

Figura 13- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo antes do congelamento (tempo 0) (aumento de 100 x).

Após 40 dias de congelamento (tempo 40), todas as células apresentaram injúrias verificadas por microscopia óptica. Entretanto, as estirpes congeladas sem o extrato de ISP e as que foram congeladas nas concentrações 4 μg e 6 μg de proteína. 100 mL^{-1} de meio de cultura YPG foram as que sofreram maior letalidade, demonstrando maior quantidade de células com parede e membrana celular rompidas e com extravasamento citoplasmático. Nas concentrações de 8 μg e 12 μg de proteína. 100 mL^{-1} de meio de cultura YPG, as células se apresentaram mais íntegras comparado às demais concentrações testadas porém, em menor quantidade, ainda é possível verificar o rompimento celular (Figuras 14 e 15).



0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



4 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



6 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

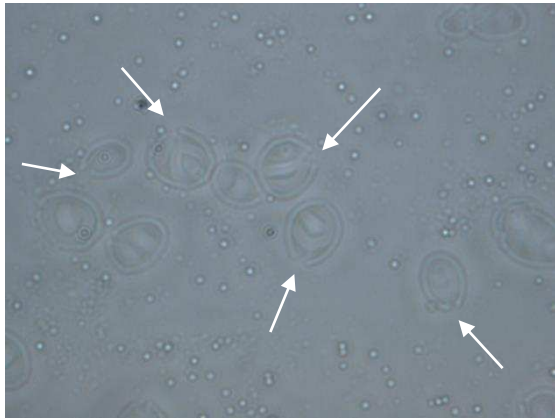


8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

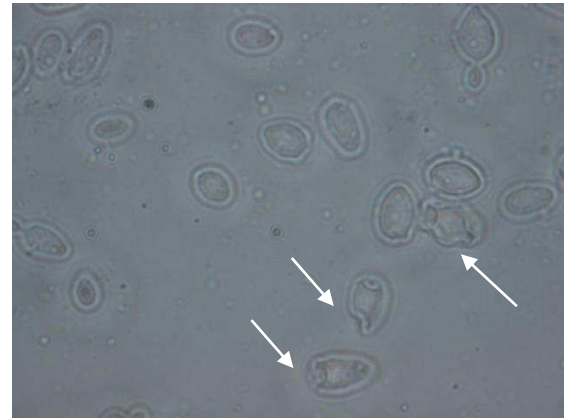


12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

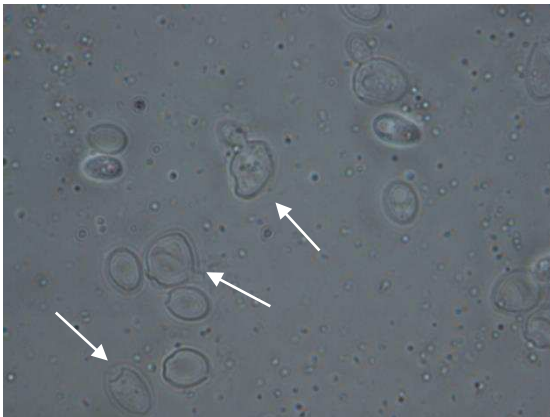
Figura 14- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico fresco após o congelamento (tempo 40) (aumento de 100 x). As setas indicam injúria celular.



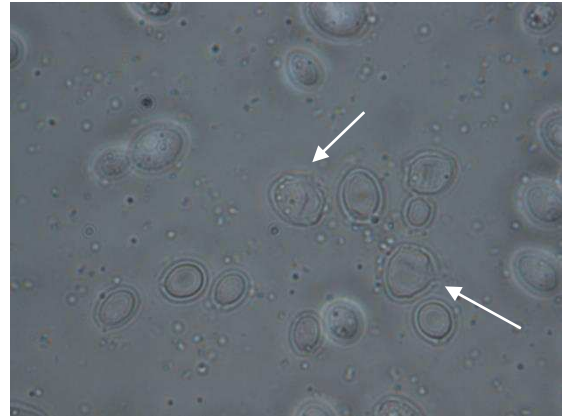
0 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



4 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



6 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura



12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura

Figura 15- Observação microscópica da morfologia de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo após o congelamento (tempo 40) (aumento de 100 x). As setas indicam injúria celular.

Durante o congelamento de leveduras, mudanças físicas nas células podem ocorrer devido à formação de cristais de gelo, podendo ocasionar impactos na membrana celular, provocando alterações na permeabilidade, plasmólise, estresse osmótico e a morte da célula (CALDAS, CASTRO e SILVA, 2015; MEZIANI et al., 2012). Como o citoplasma é mais concentrado do que o meio externo, a água extracelular congela antes da água intracelular, causando o aumento da pressão osmótica do meio e desidratando a célula por osmose devido à passagem do conteúdo citoplasmático para o meio externo (DUMONT, MARECHAL e GERVAIS, 2003).

Meziani et al. (2012) avaliaram os efeitos do congelamento em câmara de congelamento com circulação de ar a - 20 °C, - 30 °C e - 40 °C e imersão em nitrogênio líquido na atividade fermentativa e viabilidade da levedura em massa doce fresca e congelada empregando a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Quando a pressão osmótica externa aumentou, as células do fermento encolheram e refletiram a alta permeabilidade da membrana celular à água, além da formação de cristais de gelo intracelulares visíveis em micrografias no MET.

A partir das observações relatadas neste trabalho, mostrou-se que o extrato da cultivar BRS Guabiju apresenta potencial de utilização na manutenção da viabilidade de leveduras. Dessa forma, estudos posteriores foram realizados a fim de investigar essa suposição na manutenção da viabilidade de leveduras em massas congeladas.

5.8. Determinação do efeito do extrato de ISP sobre a viabilidade das leveduras na massa após o congelamento

O extrato de ISP da cultivar BRS Guabiju na concentração de 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa apresentou efeito crioprotetor sobre as leveduras. Para essa concentração, embora tenha sido observado uma redução em torno de 50 % na viabilidade celular ao longo do tempo de estocagem, a contagem média de leveduras foi de 6,02 log UFC.mL⁻¹ (P<0,05) em relação às massas controle (5,68 log UFC.mL⁻¹) que exibiu redução de aproximadamente 90 % de células viáveis durante os 40 dias de armazenamento. Foi observado que o tempo não influenciou (P>0,05) na redução da viabilidade de células de levedura durante o período de estocagem das massas congeladas (Figura 16).

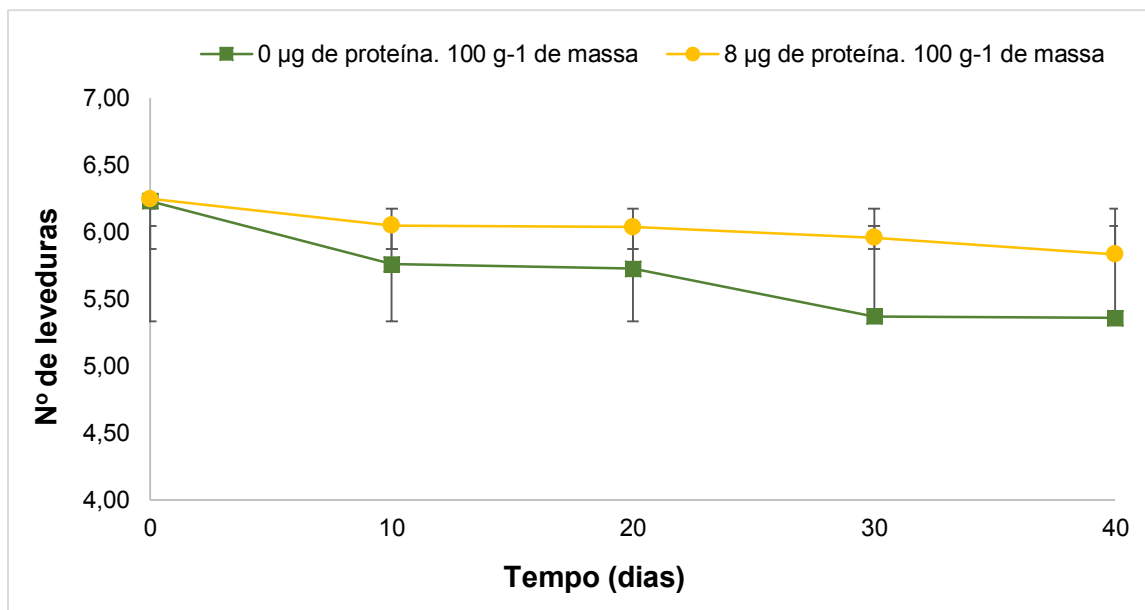


Figura 16- Viabilidade de leveduras (log UFC.g⁻¹) em massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.

O congelamento e o armazenamento congelado pode reduzir significativamente o número de células viáveis em massas e diminuir a sua capacidade de produção de gás (SELOMULYO e ZHOU, 2007; SHI, YU e LEE, 2013). Oscilações de temperatura durante o armazenamento pode ocasionar a recristalização, formando cristais de gelo maiores e consequentemente agravando os danos ao fermento (SHI, YU e LEE, 2013)

Segundo Lorenz e Kulp (1995), as leveduras contidas em massas são mais susceptíveis ao dano celular. Nessas condições, as leveduras estão em um estado de fermentação ativa, com a estrutura da membrana alterada e sob pressão osmótica. Além disso, os compostos orgânicos das células são concentrados pelo congelamento da fase aquosa causando a autólise das leveduras, o que pode ser uma hipótese para a redução significativa na viabilidade das leveduras nas massas com ausência de extrato de ISP.

As ISP atuam como agentes de preservação contra os efeitos adversos do congelamento e armazenamento congelado, demonstrando ser uma tecnologia emergente para manutenção da viabilidade do fermento biológico conforme visto neste estudo. Essas proteínas possuem a habilidade de reduzir o congelamento intracelular das leveduras, evitando a morte celular (QUEIROZ, 2015; XU et al., 2009).

Estudos realizados por Jia et al. (2012) avaliaram a atividade crioprotetora de proteínas estruturadoras de gelo (ISP) de extratos da folha da planta Ligustro Chinês (*Ligustrum vulgare*) na viabilidade celular em suspensões de leveduras e na capacidade fermentativa em massas durante ciclos de congelamento e descongelamento nos tempos 0, 1, 3 e 5 semanas. A adição de 0,5 % de ISP reduziu a formação de gelo intracelular, resultando no aumento na sobrevivência das células de levedura congeladas além de melhorar a produção de CO₂ nas massas.

Em panificação, o uso de aditivos é estratégia para evitar alterações na integridade do glúten e nas características tecnológicas do fermento biológico durante o congelamento e armazenamento congelado de massas. Esses aditivos atuam na qualidade e na vida de prateleira de pão produzidos com massas congeladas (QUEIROZ, 2015). Diante dos resultados obtidos, as ISP do extrato de trigo da cultivar BRS Guabiju surge como uma possibilidade de ser classificado como um aditivo alimentar, uma vez que foi possível a sua incorporação em massas congeladas apresentando resultados satisfatórios na viabilidade do fermento biológico. A aplicação de ISP nas características reológicas em massas durante o congelamento e armazenamento congelado também foram avaliados por (VIEIRA, 2011; XU et al., 2009) e resultados positivos também foram verificados. De acordo com Brasil (2015) a utilização de um aditivo pela indústria de alimentos só é permitida quando explicitamente previsto em legislação específica, com suas respectivas funções, limites máximos e categorias de alimentos permitidas. Portanto, para utilização tecnológica das ISP é necessária a inclusão de uma nova categoria para essas proteínas serem classificadas como um novo aditivo alimentar.

5.9. Avaliação da produção de CO₂ pelas leveduras

Foi possível observar que a adição do extrato a 8 µg de proteína.100 g⁻¹ de massa não levou a melhoria da taxa fermentativa (P>0,05), demonstrando produção média de 0,0500 µL.h⁻¹ de CO₂ comparado às massas com ausência do extrato de ISP (0,0453 µL.h⁻¹). Um declínio progressivo da produção de CO₂ ocorreu em ambos dos tratamentos em função do tempo (P<0,05) (Figura 17)

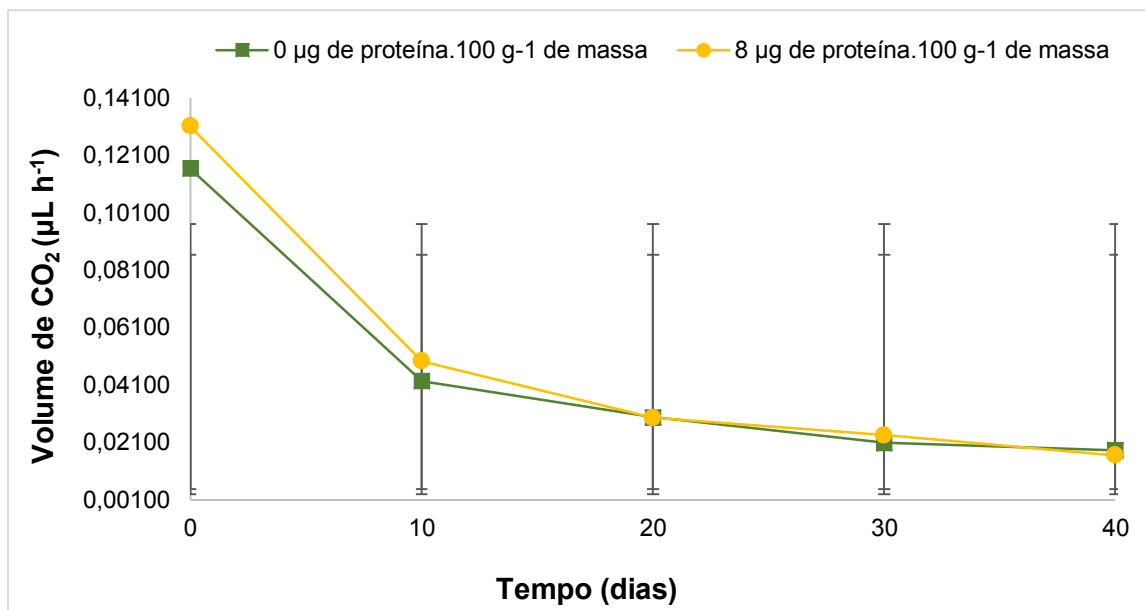


Figura 17- Variação da produção de CO₂ pelas leveduras (µL.h⁻¹) em massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.

A habilidade de produção de CO₂ pelas leveduras depende do número de células de levedura, da atividade celular e da temperatura (AUTIO e SINDA, 1992; BONA, 2002). O congelamento pode destruir a estrutura celular das células de levedura e afetar a sua atividade fermentativa, ocasionando drástica redução da produção de CO₂ após o descongelamento da massa. A redução da produção de gás pelas leveduras pode estar relacionado ao tempo antes do congelamento da massa e o tempo de armazenamento congelado (STRUYF et al., 2017).

Neste trabalho, apesar da concentração de 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa ter exercido efeito crioprotetor sobre a viabilidade das leveduras, o mesmo não foi verificado na produção de CO₂. Segundo Kechinski et al. (2010) uma redução de 50 % população de células viáveis, já é suficiente para comprometer a fermentação da massa.

Zhang et al. (2015) avaliaram o poder de gasemanto pelas leveduras após o descongelamento de massas estocadas durante 4 semanas contendo 0,1 g de ISP obtida de aveia e massas controle. Foi observado que, para ambos os tratamentos, houve redução na produção de gás durante o tempo de estocagem. Entretanto, as massas que continham ISP apresentaram maior produção de CO₂ pelas leveduras em comparação às massas com ausência de ISP.

Em estudos com massas congeladas, ainda não foi evidenciado quanto a perda no poder de gaseificação pode ser atribuída à morte de células de fermento e quanto é devido à lesão não letal (MILLER, 2006; STRUYF et al., 2017), no entanto, sabe-se que a temperatura na fermentação de massas exerce um efeito significativo na produção de gás pelas leveduras. De forma geral, a taxa de fermentação aumenta com a elevação da temperatura com o máximo entre 37,8 °C a 40,5 °C (PYLER, 1988b), apresentando temperatura ótima entre 27 °C a 29 °C. Neste estudo, não foi possível controlar a temperatura do ambiente, além disso, o equipamento não possui regulação própria de temperatura para cada tipo de ensaio. Dessa forma, sabendo que o extrato de ISP exerceu efeito crioprotetor às células, constatado através da contagem em placa, acredita-se que a redução na produção de CO₂ pelas leveduras na presença do extrato de ISP esteja associada a esta condição ambiental, assim como o tempo antes do congelamento e de estocagem sob congelamento.

Para avaliação de CO₂ em massas, diversos estudos relatam o uso vários tipos de equipamentos para essa finalidade, como o uso do fermentômetro (AUTIO e SINDA, 1992; HAVET, MANKAI e LE BAIL, 2000), frascos de fermentação (RIBOTTA et al., 2003), risógrafo (GÉLINAS et al., 1993; MILLER, 2006; PHIMOLSIRIPOL et al., 2008), reofermentômetro (HEITMANN, 2017; JIA et al., 2012) ou através de dispositivos criados para medição simples (BONA, 2002; GUTKOSKI et al., 2005; MEZIANI et al., 2012; PEIGHAMBARDoust et al., 2010; THOMAZ, 2008). Para mensurar a capacidade fermentativa do fermento biológico em sistemas fechados nas CNTP, é recomendada a utilização do aparelho de Hayduck-Nagel (BRASIL, 1977; IAL, 2008). Apesar de ter sido possível avaliar a produção de gás nas massas por respirometria, a metodologia utilizada neste estudo não foi anteriormente relatada na literatura com o objetivo de mensurar a produção de CO₂ do metabolismo de leveduras em massas de pão, sendo desta forma uma utilização inédita deste equipamento para este tipo de análise, porém, é necessária a adaptação para as condições deste estudo.

5.10. Avaliação do volume da massa

Foi constatado que 8 μg de proteína.100 g^{-1} de massa demonstrou efeito crioprotetor na manutenção do volume das massas ($P < 0,05$), apresentando volume médio de 14,13 mL em contraste com as massas sem extrato de ISP (12,97 mL). Ao longo do período de 40 dias de estocagem das massas congelamento, também ficou evidenciado que o extrato de ISP exerceu atividade protetora na manutenção do volume ($P < 0,05$) (Figura 18).

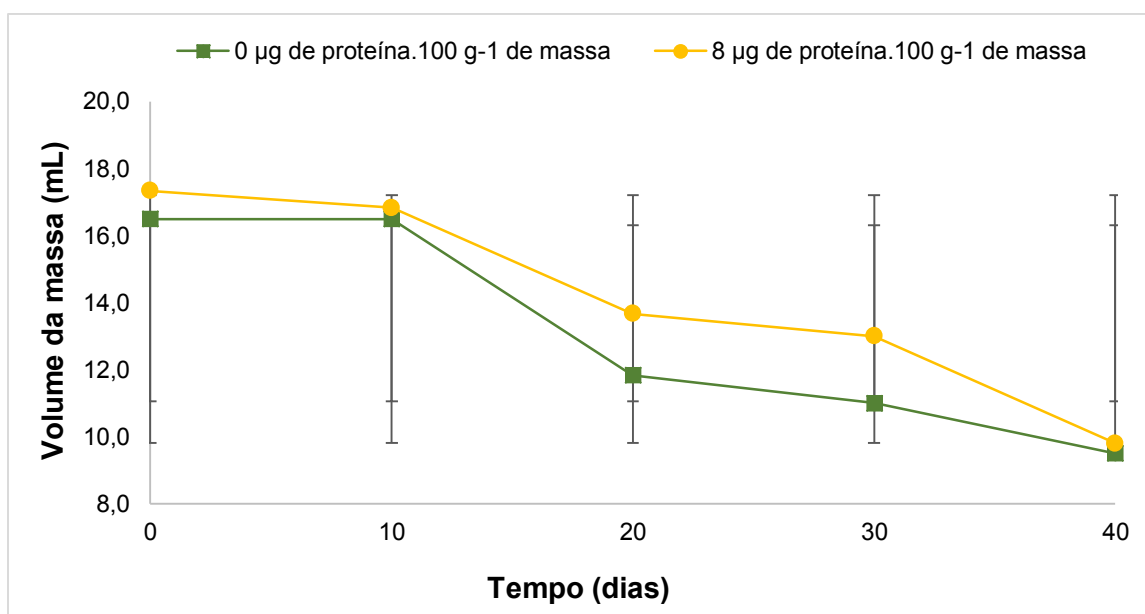


Figura 18- Variação do volume (mL) das massas congeladas durante 40 dias de congelamento com extrato proteico da cultivar BRS Guabiju.

Para Autio e Sinda (1992) a redução do volume de pães obtidos a partir de massas congeladas não estão somente relacionados a redução da taxa de produção de CO_2 , mas também aos danos causados à matriz proteica devido à formação dos cristais de gelo. Segundo Miller (2006) o armazenamento congelado levam a alterações significativas nas propriedades reológicas da massa, causando um "afrouxamento" da estrutura, o que afeta negativamente a capacidade da massa para reter o gás produzido pelo fermento. Embora a concentração 8 μg de proteína.100 g^{-1} de massa tenha apresentado efeito positivo na manutenção da viabilidade da levedura na massa congelada, uma vez que foi possível constatar durante todo o experimento que houve a formação de CO_2 , percebida pelo aumento de volume da massa durante o período

incubação das amostras, também é possível considerar que a concentração de extrato de ISP utilizada possivelmente exerceu proteção à rede de glúten.

Resultados semelhantes foram observados por Zhang et al. (2015) em que avaliaram o efeito crioprotetor de ISP obtida de aveia no volume (altura máxima) de massas congeladas estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi observado durante o período de congelamento que, a altura máxima das massas reduziu em ambos os tratamentos porém, nas massas que continham o ISP, a altura máxima foi significativamente maior do que nas massas sem o extrato. Esses autores acreditam que os resultados verificados nas massas com extrato estão associados ao efeito crioprotetor das ISP à rede de gluten na habilidade de retenção de gás, além de ter controlado a mortalidade das leveduras na massa.

Vieira (2011) avaliou diferentes concentração de extratos de cinco cultivares de trigo na proteção da integridade da rede de glúten em massas congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ após 90 dias de congelamento por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Quanto maior foi a concentração de extrato de ISP da cultivar de trigo BRS Guabiju na massa, mais intacta e uniforme a matriz proteica se apresentou, envolvendo mais firmemente os grânulos de amido.

Observa-se que o extrato ISP apresentou possível ação simultânea na criopreservação do fermento biológico e na estrutura da massa, indicando ser um importante aliado na conservação de massas congeladas.

6. CONCLUSÃO

A caracterização do extrato obtido a partir da cultivar de trigo BRS Guabiju aclimatada permitiu constatar a presença de duas proteínas de baixa massa molecular, uma de 20,1 kDa e outra na faixa de 20,1 kDa - 30,0 kDa.

Na avaliação da viabilidade de leveduras isoladas de fermento biológico fresco e seco instantâneo congeladas com 0 μg , 4 μg , 8 μg , e 12 μg de proteína. 100 mL de meio de cultura YPG, 8 μg exerceu melhor crioproteção ao longo do tempo de estocagem, verificado através da contagem em placa e contagem em câmara de Neubauer. Diante dos resultados, o extrato de ISP apresenta potencial como agente de preservação de leveduras congeladas em laboratórios. Entretanto, sugere-se o estudo de concentrações mais elevadas para investigar melhor o efeito crioprotetor.

Para ambos os tratamentos, o efeito do congelamento causou a redução de células ao longo do tempo de estocagem das massas porém, a concentração de 8 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de massa promoveu maior crioproteção das leveduras, expresso pela maior quantidade de células viáveis.

A produção de CO₂ nas massas se manteve inalterada na presença do extrato, reduzindo progressivamente ao longo do tempo de estocagem. Acredita-se que, a redução na produção de CO₂ pelas leveduras na presença do extrato de ISP esteja associado ao tempo antes do congelamento, tempo de estocagem e a temperatura ambiental durante a análise.

A concentração de 8 µg de proteína.100 g⁻¹ de massa apresentou menor impacto no aumento do volume da massa durante o tempo de estocagem comparado ao controle. Esses resultados indicam que as ISP também exerceram efeito crioprotetor à rede de gluten, favorecendo o aprisionamento do gás na massa.

Nas condições experimentais avaliadas, as ISP apresentaram características potenciais para aplicação em massas congeladas, uma vez que essas proteínas demonstraram ter ação simultânea tanto na preservação do fermento, conforme visto neste trabalho e ao mesmo tempo, na estrutura da massa, conforme já relatado em estudos anteriores. Dessa forma, as ISP surgem como uma possibilidade de um novo aditivo para a indústria de panificação visto que, concentrações relativamente reduzidas demonstraram ser suficientes para exercer efeito crioprotetor, substituindo de forma efetiva o uso de diversos melhoradores naturais e artificiais para proteção das características intrínsecas da massa, reduzindo a quantidade de componentes na rotulagem (*clean label*) e oferecendo produtos de qualidade para o consumidor. Além disso, as ISP podem ser uma alternativa inovadora para crioproteção de leveduras congeladas em laboratório.

7. PERSPECTIVAS

Considerando a possibilidade de esclarecer o mecanismo de proteção das ISP contra os efeitos adversos no fermento biológico, sugere-se novas pesquisas para:

- ✓ A investigação da viabilidade das leveduras utilizando quantidades diferentes do extrato de ISP (relação proteína:massa) de forma a obter resultados mais abrangentes;
- ✓ Utilização do reofermentômetro para avaliação da produção de CO₂ pelo fermento biológico em massas congeladas contendo o extrato de ISP;
- ✓ Análise da morfologia das células de levedura em massas congeladas contendo extrato de ISP por microscopia eletrônica de transmissão;
- ✓ Verificação da criopreservação do fermento biológico em massas doces congeladas contendo o extrato proteico;
- ✓ Comparação do efeito de aditivos utilizados em panificação com o extrato de ISP na viabilidade do fermento biológico;
- ✓ Exame do efeito crioprotetor do extrato de ISP de outras fontes de cereais no fermento biológico;
- ✓ Avaliação da viabilidade e a capacidade fermentativa do fermento biológico em massas congeladas obtidas pelo método esponja, contendo extrato de ISP;
- ✓ Avaliação o efeito crioprotetor do extrato proteico nas viabilidade de outros micro-organismos de interesse em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods**. 10th ed. St. Paul, Minnesota, 2000.

AGUILERA, J.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. **FEMS Microbiol Rev**, v.31 p.327–341, 2007.

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N. **Biochemical Engineering**. 2nd edition. Academic Press, Inc., 1973, 434 p.

ANTIKAINEN, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 423-432.1997.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012, 3000 p.

AQUINO, V.C. **Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos**. 2012, 88 p. Dissertação (Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. 2012.

ATICI, O.; NALBANTOĞLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, v.64, p.1187–1196, 2003.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

AUTIO, K.; SINDA, E. Frozen doughs: rheological changes on yeast viability. **Cereal Chemistry**, v.69, n.4, p.409–413, 1992.

AZEREDO, H.M.C.; BRITO, E.S.; BRUNO, L.M.; PINTO, G.A.S. Princípios dos métodos de conservação de alimentos. In: AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos da estabilidade de alimentos**. Embrapa, 2^a ed., 2012, 326p.

BADIN, F. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol**. 2010, 51 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal/SP, 2010.

BARRETT, J. Thermal hysteresis proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v 33, p. 105–117, 2001.

BATISTA, M.A. **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. 2005, 44 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2005.

BEALES, N. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A. Production of Food Grade Yeasts. **Food Technol. Biotechnol** ,v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.

BERGLUND, P.T.; SHELTON, D.R.; FREEMAN, T.P. Frozen bread dough ultrastructure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles. **Cereal Chemistry**, v. 68, p.105-107, 1991.

BERNARDES, R.C.; TOMÉ, H.V.V.; BARBOSA, W. F.; GUEDES, R.N.C.; LIMA, M.A.P. Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. **Apidologie**, v. 48, p. 275-285, 2016.

BIRCH, A.N.; PETERSEN, M.A.; ARNEBORG, N.; HANSEN, A.S. Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. **Food Research International**, v, 52, p. 160–166, 2013.

BONA, S. **Estudos da viabilidade da produção de pão francês a partir de massa congelada**. 117 p. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC, 2002.

BRANDÃO, S.S.; LIRA, H.L. **Tecnologia de panificação e confeitaria**. Recife: EDUFRPE, 2011, 148 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 38, de 27 de dezembro de 1977. Aprova o regulamento técnico utilização de coadjuvantes na fabricação de produtos panificados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, dezembro de 1977 Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/38_77.htm>. Acesso em: 01/09/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira**. 2ª edição, Brasília, 2015, 23 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/guia_pedidos.pdf>. Acesso em: 01/01/17.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, I.M.; PARKER, J. **Microbiology**. 7th ed Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ. 1994, 909 p.

BRÖDEL, A.K.; RAYMOND, J.A.; DUMAN, J.G.; BIER, F.F.; KUBICK, S. Functional evaluation of candidate ice structuring proteins using cell-free expression systems. **Journal of Biotechnology**, v.163, p. 301– 310, 2013.

BRUINSMA, B.L.; GIESENSCHLAG, J. Frozen dough performance: compressed yeast-instant dry yeast. **Bakers' Digest**, v.58, n.6, p.6-11, 1984.

CALDWELL, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. 2ª ed. Belmont, Star. 1999, 403p.

CAMPELO, F.A. **Extração e purificação de proteínas estruturadoras de gelo obtidas de folhas de trigo**. 2014, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CASEY, G.P.; FOY, J.J. Yeast performance in frozen doughs and strategies for improvement. In: **Frozen and refrigerated doughs and batters**. KULP, K.; LORENZ, K.; BRUMMER, J. New York: American Association of Cereal Chemists. p.19-51, 1995.

CASTRO, M.H.M.M.S.; MARCELINO, M.S. **Fermentos químicos, biológicos e naturais**. Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, 2012. 24 p.

CAUVAIN, S.P. Breadmaking. In: OWENS, G. **Cereals Processing Technology**. Boca Raton, 2001, 231 p

CAUVAIN, S.P.; YOUNG, L.S. **Tecnologia da Panificação**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Manole, 2009. 418p.

CLARKE, C.J.; BUCKLEY, S.L.; LINDNER, N. Ice structuring proteins - a new name for antifreeze proteins. **CryoLetters**, v. 23, p. 89-92, 2002.

CREVEL, R.W.R.; FEDYK, J.K.; SPURGEON, M.J. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 899–903, 2002.

CZUCHAJOWSKA, Z.; PASZCZYŃSKA, B. Is wet gluten good for baking? **Cereal Chemistry**, v.73, n.4, p.483-489, 1996.

DEMAIN, A.L.; PHAFF, H.J.; KURTZMAN, C.P. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Ed.) **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV, cap 3 pag. 13 – 19. 1998.

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais** – Amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras MG: Ed. UFLA, 2010, 368 p.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology**, v.46, p. 33–42, 2003.

EL-HADY, E.A.; EL-SAMAHY, S.K.; SEIBEL, W.; BRÜMMER, J. M. Changes in gas production and retention in non-fermented frozen wheat doughs. **Cereal Chemistry**, v.73, p. 472-477, 1996.

ENGLISH, M.P. Some Observations on the Physiology of *Saccharomyces rouxii* Boutroux. **Journal of General Microbiology**, v.10, p. 328-336, 1954.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2.ed. Rio de Janeiro; São Paulo: Atheneu, 1989. p. 371-383.

EWART, K.V.; LIN, Q.; HEW, C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 55, p. 271–283, 1999.

FEENEY, R.E.; YEH, Y. Antifreeze Proteins: Properties, Mechanism of Action, and Possible Applications. **Food Technology**, v 47, p. 82-90, 1993.

FELDMANN, H. **Yeast: Molecular and Cell Biology**. Ed. WileyBlackwell: Estados Unidos da América. 2 nd, 2012, 329 p

FELLOWS, P.J. **Food processing technology**. Boca Raton: CRC Press, 2 ed. 2000.560p.

FRANCISCHI, M.L.P.; ORMENESE, R.C.S.C.; PIZZINATTO, A. Tecnologia de produção de pães a partir de massas congeladas. **Boletim da SBCTA**, v.32, p. 209-214, 1998.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, 182 p.

FUNK, L.G.; FRANCISCO, A. Efeitos do congelamento e dos ciclos de gelo-degelo em massas de pão. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 163-190, 2006.

GAVA, A.J; SILVA, C.A.B; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo, SP: Nobel, 2008. 511 p.

GÉLINAS, P., LAGIMONIÉRE, M., DUBORD, C. Baker's yeast sampling and frozen dough stability. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 70, n. 2, p. 219-225, 1993.

GIANNOU, V.; KESSOGLOU, V.; TZIA, C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p. 99-108 2003.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GOMES, J.C.; OLIVEIRA, G.F. **Análises físico químicas de alimentos**. 1ª. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011. 303 p.

GONZAGA, M.C.; GIORDANO, R.C.; NUCCI, E.R.; IEMMA, M.R.C. Cinética de crescimento de *Bacillus megaterium* recombinante para a produção de penicilina g acilase (pga). In: **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia/MG, 2009.

GRIFFITH, M., YAISH, M.W.F. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 8, p. 399–405, 2004.

GRIFFITH, M.; EWARD, K.V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 375–402, 1995.

GRISWOLD, R. M. **Estudo Experimental dos Alimentos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1972. 469 p.

GUERREIRO, L. **Panificação** – Dossiê Técnico. REDETEC Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2006.

GUPTA, R.; DESWAL, R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. **Journal of Biosciences**. v. 39, n. 5, p. 931–944, 2014.

GUSTA, L.V.; WISNIEWSKI, M.; NESBITT, N.T.; GUSTA, M.L. The effect of water, sugars and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and non acclimated canola leaves. **Plant Physiology**, v.135, p.1642-2653, 2004.

GUTKOSKI, L.C.; BREHM, C.M.; SANTOS, E.; MEZZOMO, N. Efeito de ingredientes na qualidade da massa de pão de forma congelada não fermentada durante o armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.3, p 460-467, 2005.

HASSAS-ROUDSARI, M. **Extraction, purification and study of mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves**. 2011, 168 p. Tesis (Doctor of Philosophy). University of Guelph. Guelph, Canadá. 2011.

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, H.D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. **Food Research International**, v.46, p. 425–436, 2012.

HAVET, M.; MANKAI, M.; LE BAIL, A. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. **Journal of Food Engineering**, v. 45 p. 139-145, 2000.

HEITMANN, M. **The investigation of technological, nutritional and sensorial characteristics of wheat bread, influenced by different strains of *Saccharomyces cerevisiae***. 2017, 166 p. Thesis (Doctor Food Science and Technology). University College Cork, Irlanda. 2017.

HEW, C.L; XIONG, F.; MOFFATT, B.A.; GRIFFITH, M. **Antifreeze proteins, DNA and expression systems**. US Patent WO 99/06565, 1999.

HEW, C.L; YANG, D.S.C. Protein interaction with ice. **Eur. J. Biochem.**, v. 203, p.33 -42, 1992.

HINO, A.; TAKANO, H.; TANAKA, Y. New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations. **Cereal Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 269-275, 1987.

HON, W.C.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A., KWOK, Y.C. YANG, D.S.C. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. **Plant Physiology**, v.104, p.971–980, 1994.

HSU, K.H., HOSENEY, R.C., SEIB, P.A. Frozen dough. I. Factor affecting stability of yeasted doughs. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 56, n. 5, p. 419-424, 1979a.

HSU, K.H., HOSENEY, R.C., SEIB, P.A. Frozen dough. II. Effects of freezing and storing conditions on the stability of yeasted doughs. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 56, n. 5, p. 424-426, 1979b.

HUANG, V.T.; BARRIER, W.A.; LEAKE, L.H.; WITTINGER, S.G. **Frozen dessert compositions and products**. United States patent US 5,175.013, dezembro 1992.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205–229, 2003.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205–229, 2003.

HUGHES, K.W.; PETERSEN, R.H.; LICKEY, E.B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist**, v. 182, p. 795–798, 2009.

HUI, Y.H. **Handbook of food science, technology and engineering**, v. 1, Londres: Taylor & Francis, 2006, 1490 p.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. 1ª ed: IFPress. Oxford, 2006, 473 p.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008, 1020 p. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf?attach=true>. Acesso em: 12/02/2017.

INOUE, Y.; BUSHUK, W. Studies on frozen dough. I. Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking and rheological properties. **Cereal Chemistry**, v.68, p. 627-631, 1991.

JACKEL, S.S. Frozen dough opportunities keep heating up. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 36, n. 6, p. 529, 1991.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. Atmed, 2005, 711 p.

JIA, Z.; DAVIES, P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.27, n.2, p. 101-106, 2002.

JØRGENSEN, S.K.K.; KESKIN, S.; KITSIOS, D.; COMMEROU, P.W.; NILSSON, B.; VINCENTS, B. **Antifreeze Proteins - The applications of antifreeze proteins in the food Industries**. Roskilde University, 2008, 54 p.

KECHINSKI, C.P.; CASTRO, M.G.; FLECK, R.J.; NOREÑA, C.Z. Viabilidade de células de levedura em massas congeladas de pão francês. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1193-1198, 2010.

KIANI, H.; SUN, D. W. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**. v.22, p. 407-426, 2011.

KLIS, F.M; GROOT, P.; BRUL, S.; HELLINGWERF, K. Molecular organization and biogenesis of the cell wall In: DICKINSON, J.R.; SCHWEIZER, M. **The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. London: CRC Press, cap 5, p. 117-118, 2004.

KNIGHT, C.A.; CHENG, C.C.; DEVRIES, A.L. Adsorption of α -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. **Biophysical Journal**, v. 59, p. 409-418, 1991.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeast metabolism. In: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast and yeast-like organisms**. Weinheim: VCH, cap. 5, p. 304-390, 1990.

KONDO, K.; INOUE, M. TIP1, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, v.266, p. 17537–17544, 1991.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.D.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour–water mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.1135–1147, 2007.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.331-371, 1998.

LACHANCE, M. A. Ribosomal DNA spacer variation in the cactophilic yeast *Clavisporu opuiitiae*. **Mol Biol Evol**. v. 7, 178-193, 1990.

LEWIS, M.J.; YOUNG, T.W. **Brewing**. London: Chapman & Hall, p. 150, 1995.
LIMONGI, S. **Influência do tempo, temperatura e umidade relativa na obtenção de massas de pizza com fermentação reduzida**. 2010, 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa/PR.2010.

LINDHOLZ, C.G.; GONÇALVES, T.S.; MENEZES, L.M.; SILVA, MEDINA-SILVA, R. **Avaliação da toxicidade celular de resinas odontológicas**

fotopolimerizáveis em células de *Saccharomyces cerevisiae*. XI Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 09 a 12 de agosto de 2010.

LINDHOLZ, C.G.; GONÇALVES, T.S.; MENEZES, L.M.; SILVA, MEDINA-SILVA, R. Avaliação da toxicidade celular de resinas odontológicas fotopolimerizáveis em células de *Saccharomyces cerevisiae*. **XI Salão de Iniciação Científica – PUCRS**, p. 245-247, ago 2010.

LORENZ, K.; KULP, K. Freezing of doughs for the production of bread and rolls in the US. **Cereal Chemistry**, p. 134-153, 1995.

LU, W.; GRANT, L. Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. **Cereal Chemistry**, v.76, p. 656-662, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAEDA, T.; KIKUMA, S.; ARAKI, T.; IKEDA, G.; TAKEYA, K.; SAGARA, Y. The effects of mixing stage and fermentation time on the quality of flavor compounds and sensory intensity of flavor in white bread. **Food Sci. Technol. Res**, v. 5, n. 2, p. 117-119, 2009.

MAGNUSON, K. M. Uses and functionality of vital wheat gluten. **Cereal Foods World**, v. 30, n.2, p. 179-181, 1985

MARTINBIANCO, F. **Desenvolvimento da tecnologia para a produção de pão *sourdough*: aspectos da produção de inóculo e qualidade sensorial de pães**. 2011, 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 2011.

MATUDA, T.G. **Estudo do congelamento da massa de pão: determinação experimental das propriedades termofísicas e desempenho da panificação**. 2008, 153 p. Tese (Doutorado em Engenharia). Universidade de São Paulo/SP. 2008.

MATUDA, T.G.; ROMEU, C.C.; TAVARES, D.T.; TADINI, C.C. Estudo da Influência de Emulsificantes Sobre os Parâmetros de Textura da Massa Congelada de Pão Francês Através de um Projeto de Mistura. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife. **Anais do XIX CBCTA**, 2004.

MERIC, L.; LAMBERT-GUILOIS, S.; NEYRENEUF, O.; RICHARDMOLARD, D. Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: contribution of cellular trehalose. **Cereal Chemistry**, v.72, p. 609-615, 1995.

MEYER, T.; ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerek gen . nov .* and *Starmarella bombicola sp . nov .*, the teleomorph of *Candida bornbicola* (Spencer, Gorin & Tullock). **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 48, p. 1413–1417, 1998.

MEZIANI, S.; IOANNOU, I.; JASNIEWSKI, J.; BELHAJ, N.; MULLER, J.; GHOUL, M.; DESOBRY, S. Effects of freezing treatments on the fermentative activity and gluten network integrity of sweet dough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 118-126, 2012.

MILLER, S.D. **Yeast metabolism in fresh and frozen dough**. 246 p. 2006. Tesis (Doctor of Philosophy in Food Technology). Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2006.

MISHRA, V.; PATTNAIK, P. **Anti-freeze proteins: prospects and perspectives in food sector**. Indian Food Industry, v.18, p. 238–244, 1999.

NAKAGAWA, Y.; SAKUMOTO, N.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S. *Mga2p* Is a Putative Sensor for Low Temperature and Oxygen to Induce *OLE1* Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 707–713, 2002.

NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 5, p. 2239–2243, 2005.

NASH, T. Compounds Which Protect Erythrocytes against Freezing Damage. **J Gen Physiol**. v. 46:p. 167-75, 1962.

NELSON, D.L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2007, 807 p.

NEMETH, L.J.; PAULLEY, F.G.; PRESTON, K.R. Effects of ingredients and processing conditions on the frozen dough bread quality of a Canada Western Red Spring wheat flour during prolonged storage. **Food Research International**, v. 29, n. 1, p. 609-616, 1996.

NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. 2003, 258 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. 2003.

NEYRENEUF, O.; DELPUECH, B. Freezing experiments on yeasted dough slabs. Effects of cryogenic temperatures on the baking performance. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 109-111, 1993.

NICKERSON, W.J.; SCHULTZ, A.S. Physiology. In: ROMAN, W. **Yeast**. Academic Press Inc. New York, 1957, 246 p.

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI-FILHO, W.G. **Aguardente de Cana**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 66p. 2005.

PANADERO, J.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J.A. Heterologous Expression of Type I Antifreeze Peptide GS-5 in Baker's Yeast Increases Freeze Tolerance and

Provides Enhanced Gas Production in Frozen Dough. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, n.26, p. 9966-9970, 2005.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Tecnologia da carne e de subprodutos. Processamento tecnológico. 2. ed. Goiânia: Editora da UFG, v. 2, 2001, 517 p.

PASTORE, G.M.; BICAS, J.L.; JÚNIOR, M.R.M. **Biotecnologia de alimentos**, v. 12, Ed: Atheneu, 2013, 511 p.

PAVANELLI, A.P. **Aditivos para panificação**: conceitos e funcionalidade. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Aditivos e Melhoradores para Alimentos e Bebidas, 2000.

PAYNE, S.R.; YOUNG, O.A. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. **Meat Science**, v. 41, p.147–155, 1995.

PEIGHAMBARDOUST, S.H.; FALLAH, E.; HAMER, R.J.; VAN DER GOOT, A.J. Aeration of bread dough influenced by different way of processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 89–95, 2010.

PHIMOLSIRIPOL, Y.; SIRIPATRAWAN, U.; TULYATHAN, V.; CLELAND, D.J.; Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 48–56, 2008.

PIROZI, M.R.; MACRITCHIE, F. **Antifreeze proteins from winter wheat and its potential application in frozen bread doughs** (Oral Presentation). KSU Graduate Research Forum. Kansas State University, Manhattan, KS, April 2002.

PONZZES, C.M.P.B.S. **Diversidade e seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas utilizadas na produção de vinhos no vale do São Francisco, Brasil**. 102 p. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana/BA, 2010.

PROVESI, J.G.; AMANTE, E.G. Revisão: Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 2-13, jan./mar. 2015.

PYLER, E.J. **Baking Science & Technology**. Sosland Publishing Company, 3^a ed, v.1, 1988a, 588 p.

PYLER, E.J. **Baking Science & Technology**. Sosland Publishing Company, 3^a ed, v.2, 1988b, 588 p.

QUAGLIA, G. **Ciência y tecnología de la panificación**. Zaragoza: Acribia, 1991, 502 p.

QUEIROZ, I.C. **Extrato de proteínas estruturadoras de gelo de folhas de trigo: avaliação da inocuidade feitos na qualidade tecnológica e nutricional**

de pão francês. 2015, 83 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. 2015.

RÄSÄNEN, J.; HÄRKÖNEN, H.; AUTIO, K. Freeze-thaw stability of prefermented frozen lean wheat doughs: effect of flour quality and fermentation time. **Cereal Chemistry**, v.72, n.6, p.637–642, 1995.

RAY, B. **Fundamental Food Microbiology.** 3rd.ed, London: Boca Raton, 2004. 625 p.

REGAND, A.; GOFF, H. D. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.49–57, 2006.

REIS, J.P.Z. **Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação.** 2006, 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara/SP. 2006.

RESENDE, F.S. **Efeito do congelamento sobre a microestrutura da massa de pão.** 2011, 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. 2011.

RIBOTTA, P.D.; LEON, A.E.; ANON, M.C. Effects of yeast freezing in frozen dough. **Cereal Chemistry**, v. 80, p. 454–458, 2003.

RIBOTTA, P.D; TADINI, C.C. **Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados.** Córdoba: Cytel, 2009. 329 p.

RODRIGUES, F. LUDOVICO, P. LEÃO, C. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In ROSA, C.; PÉTER, G, ed. lit. – **Biodiversity and ecophysiology of yeasts.** Berlin: Springer, p. 101-121, 2005.

ROMEU, C.C.; TADINI, C.C.; MATUDA, T.G. Influência do congelamento na estrutura da massa do pão francês. **Produção em Iniciação Científica da Escola Politécnica da USP**, n.3, p. 1816-1845, 2006.

ROUILLÉ, J.; LE BAIL, A.; COURCOUX, P. Influence of formulation and mixing conditions on bread making qualities of french frozen dough. **Journal of Food Engineering**, v.43, p. 197-203, 2000.

SAEKI, E.K.; FARHAT, L.P.; PONTES, E.A. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.2, p. 195-198, 2015.

SAEKI, E.K.; FARHAT, L.P.; PONTES, E.A. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.2, p. 195-198, 2015.

SALAS-MELLADO, M.M.; CHANG, Y.K. Effect of formulation on the quality of frozen bread dough. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, p.461-468, 2003.

SANTOS, C.A. **Estudo da transferência de calor durante o congelamento de cortes de aves em caixas de papelão ondulado**. 2005. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SASANO, Y.; HAITANI, Y.; OHTSU, I.; SHIMA, J.; TAKAGI, H. Simultaneous accumulation of proline and trehalose in industrial baker's yeast enhances fermentation ability in frozen dough. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 133, n. 5, p. 592-595, 2012.

SCHEEREN, P.L.; DEL DUCA, L.J.A.; SILVA, M.S.; SOUSA, C.N.A.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.N.; LINHARES, A.G.; EICHELBERGER, L.; CAIERÃO, E.; PIRES, J.L.; CHAVES, M.S.; COSTAMILAN, L.M.; PRESTES, L.M.; LIMA, M.I.P.M.; MIRANDA, M.Z.; GUARIENTI, E.M.; VOSS, M.; LUZ, W.C.; LHAMBY, J.C.B. Cultivar de trigo BRS Guabiju testada e indicada para as regiões de adaptação 7 e 8 do Paraná e 9 e 10 do Mato Grosso do Sul. **Comunicado Técnico online 156**, Embrapa Trigo, Passo Fundo RS, 2005.

SELOMULYO, V. O., ZHOU, W. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. **Journal of Cereal Science**, v. 45, p. 1-17, 2007.

SHI, K.; YU, H.; CHING-LEE, T. A novel approach for improving yeast viability and baking quality of frozen dough by adding biogenic ice nucleators from *Erwinia herbicola*. **Journal of Cereal Science**, v. 57, p. 237-243, 2013.

SILVA, F.H.A.; PAÇO, F.R.; REIS, E.; AMARAL, V. Infecção por *Saccharomyces cerevisiae* – uma infecção atípica em UTI. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.23, n.1, p.108-111, 2011.

SILVA, M.S. **Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel**. 108 p. 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 4 ed, 632 p, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 4 ed, 632 p, 2010.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends Biotechnol**, v.: 16, p.:460-468, 1998.

SOUZA, N.A.B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 149 p. 2010. Tese (Doutorado em

Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa/PB. 2010.

STAUFFER, C. Frozen dough production. In: KAMEL B, STAUFFER C. **Advances in baking technology**. London: Chapman and Hall. p. 88–106, 1993.

STEFANELLO, R.F. **Produção, liofilização e aplicação de fermento natural em pão tipo *sourdough***. 2014, 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS. 2014.

STROPPIA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIGUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

STRUYF, N.; VAN DER MAELEN, E.; HEMDANE, S.; VERSPREET, J.; VERSTREPEN, K.J.; COURTIN, C.M. Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 850-867, 2017.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 17, p.43-46, 1981.

THOMAZ, D. **Melhoramento das condições de hidratação da levedura seca instantânea de panificação por tratamentos com soluções de aditivos**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP. 2008.

TOKAREW, J. **Investigating the Relationship Between Structure, Ice e crystallization Inhibition Activity and Cryopreservation Ability of Various Galactopyranose Derivatives**. 2011. p.198. Dissertação de Mestrado. University of Ottawa. Canadá. 2011.

TOMÉ, H.V.V.; BARBOSA, W, F.; MARTINS, G.F.; GUEDES, R.N. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103-109, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª edição, Porto Alegre: Artmed, p. 332, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2000, 827 p.

USTUN, N.S.; TURHAN, S. Antifreeze proteins: characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v, 39, p. 3189–3197, 2015.

VÁGÚJFALVI, A.; KEREPESI, I.; GALIBA, G.; TISCHNER, T.; SUTKA, J. Frost hardness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. **Plant Science**, v.144, p.85-92, 1999.

VARRIANO-MARSTON, E.; HSU, K.H.; MAHDI, J. Rheological and structural changes in frozen doughs. **Baker's Digest**, v.54, p. 32-41, 1980.

VENKETESH, S.; DAYANANDA, C. Properties, potential and prospects of antifreeze proteins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 57-82, 2008.

VIEIRA, C.R. **Proteína estruturadora de gelo em cultivares brasileiras de trigo e centeio: ocorrência, caracterização e aplicação em massas congeladas**. 2011, 90 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. 2011.

WALKER, G.M.; HILL, A.E. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Whisk(e)y. **Beverages**, v.2, n. 38, 2016, 15 p.

WARREN, C.J., MUELLER, G.M. AND MCKOWN, R.L. **Ice Crystal Growth Suppression Polypeptides and Methods of Preparation**. United States patent US 5,118,792, junho 1992.

WATANABE, E.; BENASSI, V.T. O uso de massa congelada na produção de pão. **Boletim do CEPPA**, v.18, p. 71-84, 2000.

WHATEN, B.; JIA, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In: SUN, D. **Emerging technologies for food processing**. London: Elsevier Academic Press, cap. 25, p. 653-673, 2005.

WILLIAMS, T.; PULLEN, G. Ingredientes Funcionais. In: CAUVAIN, S.P; YOUNG, L.S. **Tecnologia da Panificação**. 2ª Ed. São Paulo: Manole, 2009. 418 p.

WOLT, M.J.; D'APPOLONIA. B.L. Factors involved in the stability of frozen dough. I. The influence of yeast reducing compounds on frozen-dough stability. **Cereal Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 209-212, 1894.

XAVIER, L.M. **Análise do perfil de expressão gênica diferencial de cepas de *saccharomyces cerevisiae* laboratoriais e selvagens em diferentes estresses por ferramentas de bioinformática**. 2015, 79 p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES. 2015.

XU, H. N.; HUANG, W.; WANG, Z.; DUARTE, P. R. Effect of ice structuring protein from winter wheat on thermophysical properties of dough during freezing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 410-413, 2009.

YEH, Y.; FENNEY, R.E. Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. **Chemical Reviews**, v.96, n.2, 1996.

YI, J. **Improving Frozen Bread Dough Quality Through Processing and Ingredients**. 215 p. 2008. Dissertation (PhD in Food Science and Technology). University of Georgia. Athens. 2008.

YI, J.; KERR, W.L. Combined effects of dough freezing and storage conditions on bread quality factors. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 495–501, 2009.
ZACHARIASSEN, K. E.; KRISTIANSEN, E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. **Cryobiology**, v.41, p. 257–279, 2000.

ZARITZKY, N.E. Factors affecting the stability of frozen foods. In: KENEDY, C.J. **Managing Frozen Foods**, ed 1, 2000, 304 p.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. **Food Research International**, v 40, p. 763–769, 2007.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.1029–1036, 2008.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Extraction of Oat (*Avena sativa* L.) Antifreeze Proteins and Evaluation of Their Effects on Frozen Dough and Steamed Bread. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 2066-2075. 2015.

ANEXO 1 - Etapas de obtenção do extrato de ISP de folhas de trigo e etapas da elaboração de massas congeladas.

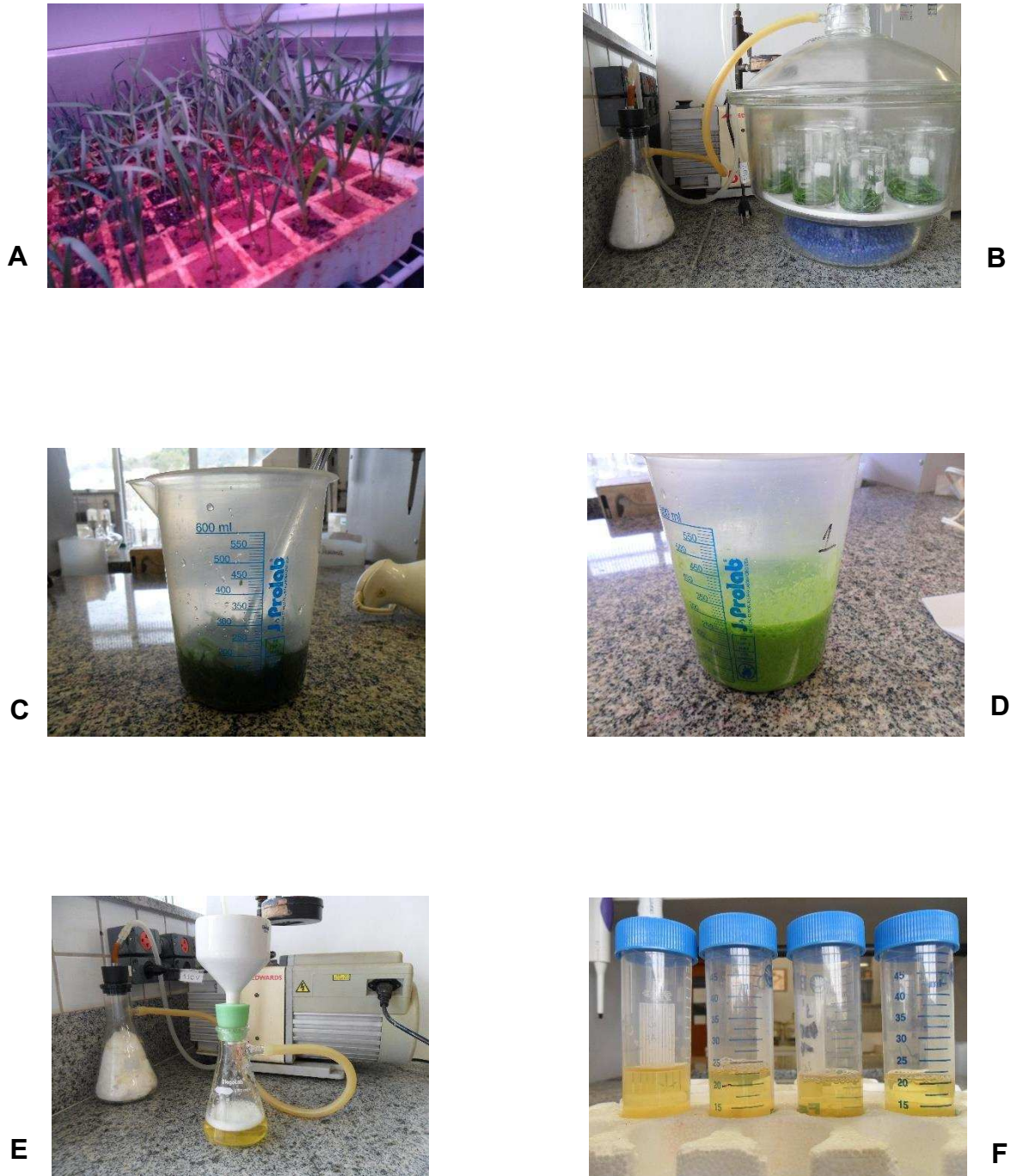


Figura 1A- Resumo das etapas da obtenção do extrato de ISP de folhas de trigo da cultivar BRS Guabiju. **A:** Plantio do trigo em condições aclimatadas ao frio; **B:** Impregnação à vácuo das folhas; **C:** Obtenção das folhas impregnadas; **D:** Folhas trituradas; **E:** Filtração à vácuo após centrifugação; **F:** Extrato de ISP obtido após pasteurização.

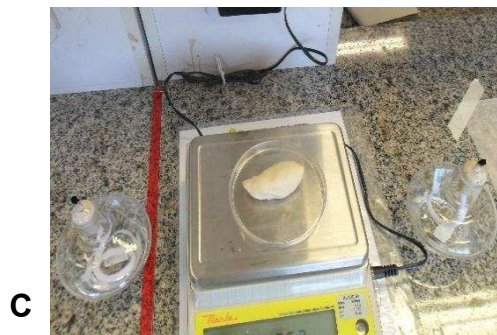


Figura 1B- Resumo das etapas de elaboração das massas congeladas. **A:** Mistura em masseira; **B:** Boleamento; **C:** Pesagem da massa em porções de 25 g; **D:** Boleamento após pesagem e modelagem manual; **E:** Acondicionamento em mini fôrmas; **F:** Acondicionamento em embalagens individuais após congelamento.

ANEXO 2 – Confirmação da identidade das leveduras

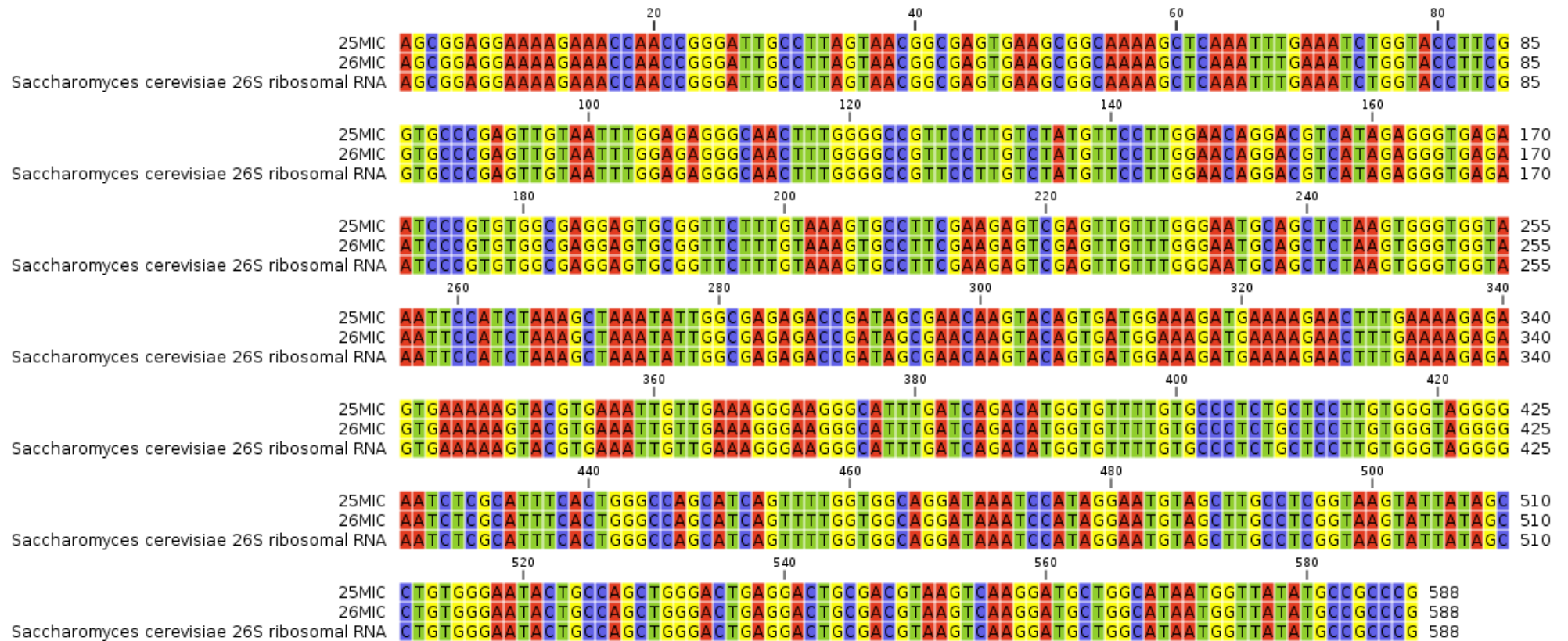


Figura 2A- Alinhamento das sequências consenso de leveduras isoladas de fermento biológico comercial. 25MIC: Levedura isolada de fermento biológico fresco; 26MIC: Levedura isolada de fermento biológico seco instantâneo.

ANEXO 3 – Resumo das análises de variância

Tabela 3A - Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	20.7515380	<0001*
Tempo	4	34.6237680	<0001*
Trat*Tempo	16	1.1146872	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3B - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (viabilidade) isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	96.6699787	<0001*
Tempo	4	38.8345487	<0001*
Trat*Tempo	16	10.0477162	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína. 100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3C - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (inviabilidade) isoladas de fermento biológico fresco quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	5388.28000	<0001*
Tempo	4	18652.14667	<0001*
Trat*Tempo	16	465.56333	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3D- Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	13.91638467	<0001*
Tempo	4	19.16225800	<0001*
Trat*Tempo	16	1.18589383	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3E- Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (viabilidade) isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	55.1705247	<0001*
Tempo	4	40.8856280	<0001*
Trat*Tempo	16	12.1318130	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3F - Resumo da análise de variância da contagem em câmara de Neubauer de leveduras (inviabilidade) isoladas de fermento biológico seco instantâneo quanto ao congelamento (- 25 °C) em diferentes concentrações do extrato de ISP durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	4	4126.54667	<0001*
Tempo	4	17193.64667	<0001*
Trat*Tempo	16	693.96333	<0001*

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Concentrações: 0 µg , 4 µg, 6 µg, 8 µg e 12 µg de proteína.100 mL⁻¹ de meio de cultura YPG.

Tabela 3G - Resumo da análise de variância da contagem em placas de leveduras isoladas de massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) contendo 0 µg de proteína.100 g⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	1	0.84672000	0.0432*
Tempo	4	0.38171667	0.1187 ^{ns}
Trat*Tempo	4	0.07027000	0.8156 ^{ns}

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{ns} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3H - Resumo da análise de variância da avaliação da produção de CO₂ pelas leveduras em massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) 0 µg de proteína.100 g⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	1	0.00016732	0.2860 ^{ns}
Tempo	4	0.01155855	<0001*
Trat*Tempo	4	0.00006172	0.7760 ^{ns}

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{ns} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3I - Resumo da análise de variância da avaliação do volume das massas submetidas ao congelamento (- 25 °C) contendo 0 µg de proteína.100 g⁻¹ de massa e 8 µg de proteína. 100 g⁻¹ de massa durante 0, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem.

F.V	g.l	Q.M	P > F
Tratamento	1	10.2083333	0.0487*
Tempo	4	56.5125000	<0001*
Trat*Tempo	4	0.7708333	0.8527 ^{ns}

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{ns} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.