

**Desenvolvimento e caracterização de uma massa-mãe
elaborada a partir de trigo Preto-amarelo
Impacto da panificação com massa-mãe nas propriedades e
aptidão tecnológica dos pães**

Sara Isabel Mateus Correia Hourmat

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Gastronómicas

Orientadores: Professora Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista
Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Júri:

Presidente: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, Professor Auxiliar com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar da Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Agradecimentos

E assim termina mais uma etapa da minha vida académica e gostava de expressar aqui o meu mais profundo agradecimento a todos os que tornaram isso possível.

Antes de mais, gostava de agradecer ao meu marido Bernardo pelo apoio e encorajamento incansável em todo e qualquer momento.

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Catarina Prista e à Doutora Cristiana Nunes por todo o apoio, conhecimento e gosto que me proporcionaram no decorrer deste trabalho.

À Professora Paulina Mata, simplesmente por tudo.

Ao meu colega e amigo Francisco Almeida. Tudo foi mais fácil na tua companhia.

À Rafaela Santos, à Sara Simões, ao Héctor Hernández e à Doutora Farzana Sabir por toda a disponibilidade e paciência para me ajudarem sempre durante todos estes meses.

Por fim, agradeço à minha família por terem sido quem me inculuiu este amor inabalável por comer.

Resumo

Com o aumento das necessidades de mercado em pão de trigo mais saudável e palatável, a incorporação de massa-mãe na sua produção voltou a generalizar-se.

Neste trabalho preparou-se uma massa-mãe a partir da variedade de trigo português Preto-amarelo, medindo-se o seu pH e fazendo culturas microbiológicas ao longo do tempo. Ao contrário do expectável, identificaram-se maioritariamente as leveduras *Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii* e *Clavispora lusitaniae*, as bactérias *Pantoea sp./Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas poae* (dia 0) e *Ralstonia sp.* (dias 2 e 11).

Com o objetivo de comparar as massas e pães levedados a partir da massa-mãe preparada com trigo Preto-amarelo ou com levedura comercial, analisaram-se massas de pão preparadas com a mesma farinha, usando dois valores de hidratação (56,25% e 66,67%), quanto ao pH, acidez, textura e comportamento viscoelástico. A avaliação da qualidade tecnológica dos pães obtidos baseou-se na acidez, textura, volume, cor, humidade e atividade da água.

Como seria de esperar, o pH das massas fermentadas com massa-mãe foi inferior ao das massas com levedura comercial, com valores que rondam 3,8, muito próximos do pH final da massa-mãe.

Verificou-se que uma menor hidratação da farinha (56,25%) resultou num menor tempo de desenvolvimento da massa, mas também numa menor estabilidade. Estas massas, após fermentação, apresentaram maior estruturação (valores de G' superiores) e valores de firmeza superiores. As diferenças entre o comportamento reológico e a textura das massas fermentadas com massa-mãe ou fermento industrial não são notórias.

Os pães fermentados naturalmente com esta massa-mãe, preparada com trigo Preto-amarelo, apresentaram uma maior firmeza, menor volume do que os pães levedados a partir do fermento de padeiro e uma maior velocidade de envelhecimento.

Os resultados obtidos permitem concluir que a panificação por métodos tradicionais com massa-mãe tem um forte impacto nas propriedades reológicas das massas e na aptidão tecnológica dos pães.

Palavras-chave: Pão, massa-mãe, microbiologia, reologia, textura.

Abstract

The increase in the market's demand for healthier and more palatable wheat bread has made the incorporation of sourdough in breadmaking widespread again.

In this study a sourdough starter was prepared using the traditional Portuguese variety of wheat Preto-amarelo, its pH was measured over time and its microbial diversity in different stages identified. Unexpectedly, the main microorganism species identified were the yeasts *Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii* and *Clavispora lusitaniae*, the bacteria *Pantoea sp./Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas poae* (day 0) and *Ralstonia sp.* (days 2 and 11).

In order to compare doughs and breads fermented with the Preto-amarelo wheat sourdough starter and with baker's yeast, fermented doughs with the same flour, two different hydration levels (56.25% and 66.67%) and sourdough starter or baker's yeast were prepared, and their pH, acidity, texture and viscoelastic behaviour were analysed. The technological quality analysis of the breads was based on their acidity, texture, volume, colour, humidity and water activity.

As expected, the doughs fermented with sourdough starter had lower pH, with values around 3.8, very close to the final pH value of the matured sourdough starter.

It was observed that the lower flour hydration value (56.25%), led to a lower development time, but also to lower stability. These doughs, after fermentation, were also more structured (superior G' values) and achieved higher firmness values. There were no noteworthy differences between the rheological behaviour and the texture of the doughs prepared with the sourdough starter and the baker's yeast.

The breads prepared with the Preto-amarelo wheat sourdough starter presented higher values of firmness and lower volume than the breads fermented using the baker's yeast and presented higher aging velocity values.

The results presented in this study allow us to infer that traditional breadmaking techniques using sourdough have a strong impact on rheologic properties of doughs and in the technological aptitude of breads.

Keywords: Bread, sourdough starter, microbiology, rheology, texture.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice.....	iv
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Abreviaturas e Siglas.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Trigo Preto-amarelo	3
2.2 Pão de Fermentação Natural.....	4
2.2.1 Massa-Mãe	5
2.2.2 Benefícios da utilização de massas-mãe	8
2.2.3 Processo artesanal de panificação com utilização de massas-mãe	10
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1 Obtenção do trigo Preto-Amarelo	14
3.2 Produção da farinha para a massa-mãe.....	14
3.3 Preparação da massa-mãe	14
3.4 Medições de pH	15
3.5 Caracterização microbiológica do trigo e massa-mãe.....	16
3.5.1 Preparação da solução de farinha e da massa-mãe.....	16
3.5.2 Meios de Cultura	16
3.5.3 Isolamento de Microrganismos.....	17
3.5.4 Técnicas de caracterização de microrganismos	17
3.6 Técnicas Moleculares de Identificação de Microrganismos	19
3.6.1 Extração de ADN.....	19
3.6.2 Amplificação do ADN por PCR.....	20
3.6.3 Quantificação do Produto de PCR	24
3.6.4 Sequenciação de ADN e identificação dos microrganismos	25

3.7 Preparação dos Pães	25
3.7.1 Pão de fermentação natural preparado com a massa-mãe.....	26
3.7.2 Pão preparado com fermento de padeiro.....	27
3.8 Avaliação reológica do comportamento da farinha numa mistura	27
3.9 Caracterização das massas de pão elaboradas a partir da massa-mãe ou do fermento de padeiro.....	28
3.9.1 Comportamento viscoelástico linear das massas de pão	28
3.9.2 Avaliação da textura das massas.....	29
3.10 Caracterização dos pães elaborados a partir da massa-mãe ou fermento de padeiro	29
3.10.1 Avaliação da textura do pão.....	29
3.10.2 Medição da atividade da água	30
3.10.3 Determinação do teor de Humidade do miolo de pão	31
3.10.4 Determinação do Volume do pão	31
3.10.5 Avaliação da cor da cêdea e do miolo do pão.....	31
3.10.5 Determinação das perdas durante a cozedura	32
3.11 Determinação da acidez das massas e dos pães	32
3.12 Análise estatística	33
4. Resultados e discussão	34
4.1 Aspetos macroscópicos da evolução da massa-mãe ao longo do tempo	34
4.2 Avaliação da evolução do pH da massa-mãe.....	37
4.3 Identificação dos microrganismos da massa-mãe	38
4.3.1 Caracterização macroscópica e isolamento de microrganismos	38
4.3.2 Identificação de Microrganismos por métodos químicos e por observação microscópica .	40
4.3.3 Identificação por métodos moleculares de microrganismos presentes	42
4.4 Análise farinográfica da farinha	45
4.5 Comportamento viscoelástico linear das massas fermentadas.....	47
4.6 Avaliação da textura das massas fermentadas.....	50
4.7 Determinação do pH e acidez das massas e dos pães	53
4.8 Avaliação da textura do pão	54
4.8.1 Evolução da textura durante o envelhecimento do pão.....	57
4.9 Medição da cor do pão	60

4.9.1 Cor da côdea.....	60
4.9.2 Cor do miolo.....	62
4.10 Determinação da atividade da água, do teor de humidade, das perdas durante a cozedura e do volume dos pães	64
5. Considerações finais e perspectivas futuras.....	66
Referências Bibliográficas	69
Anexos	81
Anexo 1. Microrganismos presentes nas culturas iniciais.	81
Anexo 2. Bandas de ADN obtidas por electroforese em gel de agarose.....	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo dos processos que ocorrem durante a cozedura de pão. Adaptado de (Guerreiro & Mata, 2010).....	13
Tabela 2 - Preparação da massa-mãe até à sua maturação.....	15
Tabela 3 - Sequências dos primers pA e pH utilizados no presente trabalho (Edwards et al., 1989).	20
Tabela 4 - Mistura reacional para a reação de amplificação utilizada para bactérias láticas.....	20
Tabela 5 - Programa de PCR utilizado para as bactérias láticas, adaptado de Camilo (2014).....	21
Tabela 6 - Programa com gradiente de temperaturas de PCR utilizado para as bactérias láticas.....	21
Tabela 7 - Sequências dos primers Ac1 e Ac3 (Poblet et al., 2000).....	22
Tabela 8 - Mistura reacional para a reação de amplificação utilizada para bactérias acéticas.....	22
Tabela 9 - Programa de PCR utilizado para as bactérias acéticas.....	22
Tabela 10 - Sequências dos primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990).....	23
Tabela 11 - Mistura reacional utilizada na reação de PCR com os primers ITS1 e ITS4.	23
Tabela 12 - Programa de PCR utilizado para amplificação do ADN (região ITS) de leveduras.....	23
Tabela 13 - Mistura reacional para o PCR de reamplificação do produto da reação de amplificação anterior.	24
Tabela 14 - Programa de PCR utilizado para as leveduras.....	24
Tabela 15 - Formulações das diferentes massas e pães produzidos (valores expressos em percentagem relativamente ao peso da farinha).....	26
Tabela 16 – Características apresentadas pela massa-mãe até à sua maturação....	34
Tabela 17 - Evolução do pH na preparação da massa-mãe de trigo Preto-amarelo. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	37
Tabela 18 - Descrição macromorfológica dos microrganismos predominantes, identificados com o código que lhes foi atribuído antes da sua identificação.....	39
Tabela 19 - Resultados do teste KOH e do teste de produção da enzima catalase, onde cada microrganismo está identificado pelo código que lhe foi atribuído antes da sua identificação (+ equivale a um resultado positivo e – equivale a um resultado negativo). A interpretação possível é também baseada na observação microscópica.	41

Tabela 20 - Resultados do ADN extraído, amplificado e sequenciado, dias de recolha de cada amostra e código de identificação anterior à sua identificação.....	42
Tabela 21 - Parâmetros obtidos no micro-doughLAB para as diferentes percentagens de água (56,25% e 66,67%).....	46
Tabela 22 - Valores ajustados para as equações da Lei da Potência (R^2 entre 0,9458 e 0,9968). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	50
Tabela 23 - Valores de pH das massas fermentadas de cada uma das formulações estudadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	53
Tabela 24 - Valores de acidez do pão e das massas fermentadas das diferentes formulações em estudo (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	54
Tabela 25 - Parâmetros da cinética de envelhecimento dos pães das formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) extraídos das regressões lineares efetuadas (A – Velocidade de Envelhecimento; B – Firmeza Inicial).....	59
Tabela 26 - Valores dos parâmetros L^* , das coordenadas a^* e b^* , saturação de cor (C^*_{ab}) e tonalidade de cor (h_{ab}) das côdeas dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	60
Tabela 27 - Valores da diferença total de cor das côdeas dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).....	61
Tabela 28 - Valores dos parâmetros L^* , das coordenadas a^* e b^* , saturação de cor e tonalidade de cor do miolo dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).....	62

Tabela 29 - Valores da diferença total de cor do miolo dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).62

Tabela 30 - Valores de atividade da água (a_w), humidade, volume, volume específico e perdas durante a cozedura dos diferentes pães preparados (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).....65

Índice de Figuras

Figura 1 - Imagem de uma espiga de Trigo Preto-amarelo (Vasconcelos, 1933).	3
Figura 2 - Amostra durante o processo de testes no reómetro (Mars III, Haake, Alemanha), acoplado com sistema de pratos paralelos serrados PP20 (20 mm de diâmetro) com uma distância entre pratos de 1,5 mm.	28
Figura 3 – Texturómetro TA.XT.Plus (Stable Micro Systems, UK) no decorrer de um teste texture profile analysis a uma fatia de pão.	30
Figura 4 - Típicas colónias encontradas nas primeiras culturas realizadas em meio de cultura de YPD e com uma diluição de 10 – 3.	38
Figura 5 - Imagem microscópica das leveduras <i>Clavispora lusitaniae</i> e <i>Debaryomyces hansenii</i> , respetivamente (ampliação 10 x 100x).	40
Figura 6 - Curvas obtidas no micro-doughLAB para a farinha de trigo com duas percentagens de água utilizadas (56,25% e 66,67%).	46
Figura 7 - Espectros mecânicos das massas fermentadas a 5°C para todas as formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).	47
Figura 8 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 6.283rad/s (1Hz) para as massas fermentadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).	48
Figura 9 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 62.83rad/s (10Hz) para as massas fermentadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).	49
Figura 10 - Valores de Firmeza das massas com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).	51
Figura 11 - Valores de Coesividade das massas das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).	

Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).....	52
Figura 12 - Valores de Elasticidade das massas com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).....	52
Figura 13 - Valores de Firmeza inicial (T0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	55
Figura 14 - Valores de Coesividade inicial (T0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	56
Figura 15 - Valores de Elasticidade inicial (T0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	56
Figura 16 - Evolução da Firmeza dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	57
Figura 17 - Evolução da Coesividade dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	58
Figura 18 - Evolução da Elasticidade dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).	58
Figura 19 - Cinética de envelhecimento dos pães com as formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação).	59

Figura 20 - Fotografias da coeda dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação, por esta ordem).....	62
Figura 21 - Fotografias de fatias dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação, por esta ordem).....	63
Figura 22 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10 ⁻¹).....	81
Figura 23 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10 ⁻¹).....	81
Figura 24 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10 ⁻¹).....	82
Figura 25 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10 ⁻¹).....	82
Figura 26 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10 ⁻¹).....	83
Figura 27 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado das leveduras isoladas <i>Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii</i> e <i>Clavispora lusitaniae</i> , respetivamente.....	84
Figura 28 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado dos microrganismos isolados <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudomonas poae</i> e <i>Pantoea sp.</i> , respetivamente.....	84
Figura 29 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado dos microrganismos isolados do gnero <i>Ralstonia sp.</i>	85

Índice de Abreviaturas e Siglas

PCR – Polymerase Chain Reaction/Reação em cadeia de polimerase.

ADN – Ácido Desoxirribonucleico.

YPD – Yeast extract Peptone Dextrose/Extrato de levedura Peptona Dextrose.

GYC – Glucose Yeast extract Calcium carbonate/Glucose Extrato de levedura Carbonato de cálcio.

CHL – Cloranfenicol.

CH – Cicloheximida.

Nat – Natamicina.

MRS – De Man, Rogosa e Sharpe (“De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar,” 2003)

TPA – Texture Profile Analysis/Análise de Perfil de Textura.

a.C. – Antes de Cristo.

d.C. – Depois de Cristo.

DY – Dough Yield/Rendimento da massa.

FODMAP - Fermentable Oligo-Di-Monosaccharides And Polyols/Oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis fermentáveis.

WA – Water absorption/Valor de absorção de água.

a_w – Water activity/Atividade da água.

1. Introdução

“Mesa sem pão, é mesa de refilão!”, já dizia o meu avô. O pão é um alimento que não pode faltar na mesa dos portugueses e que está profundamente inserido nas nossas raízes culturais e históricas. Até há bem pouco tempo, o pão representava a base da alimentação e o ato de o fazer era, não só uma arte que passava de geração em geração, como um ato religioso e de amor (Arora et al., 2021; Gobbetti et al., 2019b).

Nas últimas décadas, o trigo e o pão tornaram-se ambos alimentos menos desejados pelo público (Blatchford, 2016; Specter, 2014), principalmente por aqueles com mais preocupações pelo seu bem-estar e saúde. O processo comunitário de se fazer, fermentar naturalmente e cozer pão perdeu-se (Catzeddu, 2011), e este passou a ser comprado (Decock & Cappelle, 2005). O processo de industrialização conseguiu denegrir este alimento altamente nutritivo em algo não desejável, ou mesmo algo a evitar na alimentação (Specter, 2014). Contudo, nos últimos anos, pôde verificar-se um renascer de padarias mais artesanais (Calvert et al., 2021; Catzeddu, 2011), nas quais os processos de panificação têm novamente origem no processo de fermentação natural das farinhas dos cereais. O processo de fermentação natural da massa de pão é complexo, muito variável, e é a chave para a grande maioria das características organolépticas e nutricionais deste alimento (Calvert et al., 2021). Mais recente e paralelamente, tem-se também observado um desejo de retorno às origens dos trigos portugueses, começando a recuperar-se e produzir-se variedades caídas em desuso. Apesar do pão de fermentação natural ter vindo a ser estudado recentemente por todo o mundo (Arora et al., 2021; Calvert et al., 2021; Ercolini et al., 2013), o universo microbiológico é vastíssimo e, pouco se sabe sobre as variedades de trigos portugueses, do seu microbioma, das massas-mãe criadas a partir deles e dos seus efeitos em massa de pão. Torna-se então, não só imperativo, como de extremo interesse aprofundar o conhecimento sobre estes cereais, que são parte da identidade de Portugal (Barboff, 2005, 2017a, 2017b).

No presente trabalho selecionou-se um trigo de uma variedade antiga portuguesa, trigo Preto-amarelo, e, com ele, preparou-se uma massa-mãe até ao ponto de se poder elaborar pão com ela. Fizeram-se colheitas de amostras em vários momentos que se consideraram marcantes durante o processo e proporcionaram-se as condições necessárias para o crescimento dos microrganismos presentes, seu isolamento e identificação. Com a massa-mãe de trigo Preto-amarelo elaborada, foram preparados, seguindo-se o mais possível o método artesanal, massa e pão fermentados naturalmente.

Assim, os objetivos gerais do presente trabalho foram: (i) caracterizar a principal microbiota presente numa massa-mãe produzida a partir de uma variedade de trigo tradicional português (o trigo preto-amarelo) e (ii) avaliar o efeito da massa-mãe nas características de

um pão produzido a partir desta por comparação com um pão produzido com levedura comercial (fermento de padeiro). Mais especificamente, pretendeu-se:

- I. Preparar uma massa-mãe a partir de um trigo português;
- II. Isolar a microbiota presente na farinha e em alguns estágios do processo de produção da massa-mãe elaborada a partir do trigo;
- III. Observar a evolução dos microrganismos ao longo de todo o processo;
- IV. Proceder à identificação dos microrganismos mais significativos presentes nos vários estágios de evolução da massa-mãe;
- V. Elaborar massa e pão de fermentação natural a partir da massa-mãe produzida em comparação com o fermento de padeiro industrial;
- VI. Avaliar a textura e o comportamento reológico das massas de pão, através de testes empíricos (farinogramas no micro-doughLAB) e fundamentais (testes dinâmicos no reómetro);
- VII. Avaliar a textura, volume, cor, humidade e atividade da água como parâmetros de qualidade dos pães;
- VIII. Comparação global de todos os parâmetros avaliados entre massas e pães elaborados com os diferentes agentes levedantes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Trigo Preto-amarelo

O trigo é uma fonte de alimento para mais de 35% da população Mundial. Em Portugal é também uma das principais culturas de cereais (Scotti-Campos et al., 2014).

Descrito em detalhe por Vasconcelos (1933), no seu levantamento das variedades tradicionais portuguesas de trigo, o trigo Preto-amarelo (Figura 1) é uma variedade de trigo duro com alguma relevância na panificação tradicional da região da Península de Setúbal (Ribeiro et al., 2006).

Escolheu-se este trigo pois pretendeu-se utilizar um trigo português que não o trigo Barbela, do qual já existem alguns trabalhos publicados (Ribeiro-Carvalho et al., 2004). O trigo Preto-amarelo foi então o único trigo tradicional tirando o trigo Barbela, anterior a 1933, bem descrito na literatura, do qual se conseguiu recolher a quantidade suficiente de cereal para a realização deste trabalho.

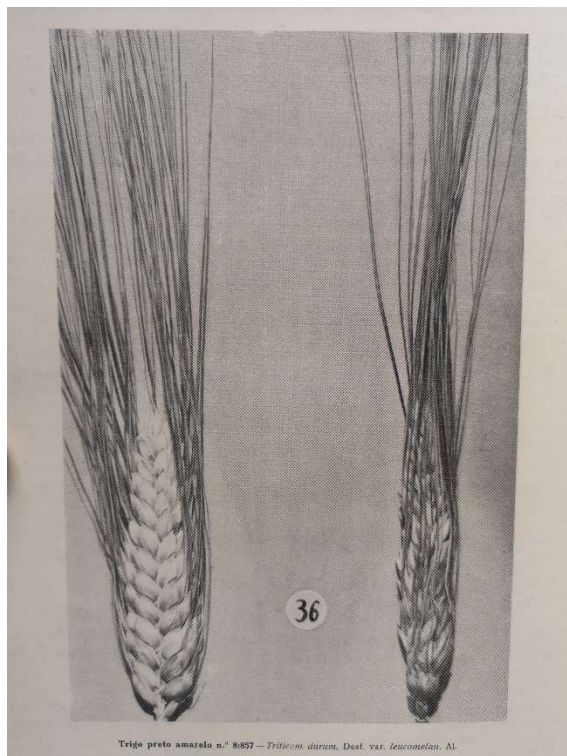


Figura 1 - Imagem de uma espiga de Trigo Preto-amarelo (Vasconcelos, 1933).

2.2 Pão de Fermentação Natural

O pão tem sido sempre um elemento central da história da alimentação, refletindo a espiritualidade e civilização Humanas (Gobbetti et al., 2019b). Sendo um dos produtos de maior importância nutricional e econômica a nível Mundial produzido a partir de cereais, é considerado um alimento base da alimentação em muitas partes do globo (Papadimitriou et al., 2019).

Pão de diferentes tipos e formas é consumido em grandes quantidades por todo o Mundo. O pão achatado (do inglês “flatbread”) é o mais antigo, mais diverso e mais popular tipo de pão, com uma estimativa de mais de 1,8 bilhões de pessoas a consumi-lo globalmente. A variedade de técnicas de produção de pão é tão grande como os tipos diferentes de pão existentes, tendo como objetivo converter as farinhas de cereais num produto alimentar atrativo, digerível e palatável (Chavan & Chavan, 2011a).

Pensa-se que se tenha começado a produzir pão de fermentação natural no Egito (Gobbetti et al., 2019b) há cerca de 8000 anos (Rubel, 2011), onde escavações arqueológicas descobriram resíduos de pão em túmulos e trigo em locais de habitação humana. Os egípcios terão selecionado variedades de trigo e adotado moinhos e peneiros específicos para panificação e terão sido os primeiros a fermentar farinha e água até aumentar de volume, misturá-la com massa preparada de fresco e cozê-la em fornos a altas temperaturas (Papadimitriou et al., 2019).

Cerca de 800 a.C. o uso de massa fermentada egípcia é adotado na Grécia antiga, que começou por ser uma atividade doméstica feminina e que foi, a pouco e pouco, tornando-se uma atividade para profissionais. Está bem documentado como o pão adquiriu um papel fulcral religioso no culto dos Deuses gregos antigos, bem como os cereais utilizados, os tipos de pão e técnicas de cozedura utilizadas (Papadimitriou et al., 2019).

Mais tarde, também os Romanos, cuja alimentação era à base de cereais cozidos ou assados, aprenderam e renderam-se ao processo de panificação, introduzindo regulamentações para a sua manufatura e melhorando o processo de construção de fornos de pão (Papadimitriou et al., 2019).

Na Europa Central (atuais Áustria, Alemanha e Suíça), têm sido consistentemente produzidos pães a partir de massas fermentadas acidificadas e lêvedas há mais de 5000 anos. Acredita-se que os gregos a viver em Marselha terão introduzido o pão de fermentação natural na Gália (atual França) no séc. IV a.C., embora tenha sido apenas na Idade Média (400-1400 d.C.), e apenas nas cidades, que a profissão de padeiro terá aparecido (Papadimitriou et al., 2019).

Na América do Norte, o uso de massa-mãe (em inglês “*sourdough*”) como agente levedante está intimamente ligado à chegada dos colonizadores Europeus que se espalharam

por todo o Continente, principalmente durante a corrida ao ouro do meio do séc. XIX, na região da Costa Oeste (Papadimitriou et al., 2019).

Desde o final do séc. XIX que o fermento de padeiro (levedura *Saccharomyces cerevisiae* selecionada) quase que substituiu completamente o uso de massa-mãe no processo de panificação. Esta modificação deveu-se à necessidade de adaptação à mecanização e a um processo de levedação mais rápido e simples, uma vez que o processo de fermentação natural é muito especializado e lento (Catzeddu, 2011).

Atualmente, o interesse crescente dos consumidores por produtos autênticos, tradicionais, saudáveis e “clean-label” tem contribuído para uma imagem positiva renovada de produtos à base de massa-mãe (Decock & Cappelle, 2005) e aumentado a sua procura (Catzeddu, 2011).

2.2.1 Massa-Mãe

O uso de massa-mãe ou *sourdough* (massa azeda) como forma de levedar pão é um dos processos microbiológicos mais antigos na produção alimentar à base de cereais (Chavan & Chavan, 2011a). A massa-mãe ou massa azeda forma-se naturalmente a partir de microrganismos já presentes na farinha, no ambiente e na pele de quem a prepara (Reese et al., 2020), quando uma mistura de farinha e água é colocada num local de temperatura amena por algumas horas. Se esta mistura é utilizada para inocular uma nova mistura de farinha e água (massa) que é deixada a fermentar e que, por sua vez, é utilizada para inocular uma terceira massa, e assim sucessivamente, vai haver uma evolução gradual das leveduras e bactérias presentes (Wood, 2003). Este processo de inoculação de uma nova mistura de farinha e água com uma porção da mistura anterior é vulgarmente denominado na literatura por *backslopping* (Wood, 2003). Em panificação artesanal e entre padeiros amadores, o processo de *backslopping* é chamado de alimentação da massa-mãe. Após fermentação, as massas-mãe são tipicamente compostas por leveduras e bactérias produtoras de ácidos. Canonicamente, pensava-se que uma ou mais espécies de bactérias *Lactobacillus* produziam os ácidos e as leveduras produziam CO₂ (Reese et al., 2020). Contudo, trabalhos de investigação mais recente identificaram uma variabilidade microbiológica muito superior ao expectável, com massas-mãe dependentes de bactérias e leveduras que não *Lactobacillus* e *Saccharomyces* (Ercolini et al., 2013; Minervini et al., 2012; Pulvirenti et al., 2004; Vrancken et al., 2010).

Os hidratos de carbono fermentáveis provenientes da farinha de trigo são a maltose, seguida pela sacarose, glucose e frutose e alguns trissacarídeos, como a maltotriose e a rafinose. A quantidade de glucose aumenta durante a fermentação, enquanto que a

quantidade de sacarose diminui, na presença de leveduras, devido à ação da enzima invertase. Enquanto existir glucose, as leveduras presentes em massas-mãe não fermentam maltose. Contudo, as células de leveduras podem continuar a desenvolver-se devido à glucose libertada por algumas bactérias lácticas, nomeadamente *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (*Lactobacillus sanfranciscensis*). A partir da glucose, as bactérias lácticas produzem maioritariamente ácido láctico, através da fermentação homoláctica, enquanto que bactérias lácticas heterofermentativas produzem também, além de ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e/ou etanol (Chavan & Chavan, 2011a).

As massas-mãe (*sourdoughs*) são classificadas em quatro tipos diferentes (Calvert et al., 2021):

- Tipo I – A massa-mãe é recomeçada a partir de uma fermentação anterior (massas-mãe tradicionais);

- Tipo II – Tipo de massa-mãe industrial que usa estirpes muito específicas para iniciar a fermentação. Pode ser líquida para ser facilmente utilizada em panificação industrial;

- Tipo III – Uma massa-mãe que pode ser seca. Utilizada em produção de grande escala para manter a consistência no resultado do produto final;

- Tipo IV – Massas-mãe que são inoculadas como as de tipo II, mas que são mantidas pelo processo de massas-mãe tipo I. Podem também ser versões de massas-mãe dos tipos I e II com adições extra, tais como fruta ou mel.

Quando se começa a preparar uma massa-mãe, os primeiros microrganismos que têm a oportunidade de a colonizar são os da farinha. A farinha tem o potencial de conter os microrganismos existentes no interior dos grãos de cereais, os que colonizam o exterior dos mesmos ou ainda os que se acumulam durante o processamento e armazenamento (Celano et al., 2016). O tipo de agricultura a que os cereais foram sujeitos também parece afetar o microbioma destes (Pontonio et al., 2016, 2021), as fezes dos insetos com que entraram em contacto (Boiocchi et al., 2017), bem como o processo de moagem e a temperatura atingida durante esta (Lau et al., 2021). Teoricamente, os organismos presentes na água também poderiam ser colonizadores, mas nenhum dos microrganismos presentes nos sistemas de água potável parece ter um papel significativo em massas-mãe (Pinto et al., 2014). A grande maioria dos géneros de bactérias presentes em massas-mãe são rotineiramente encontrados no ar e em partículas de pó, embora a presença de leveduras em amostras de pó seja um evento raro (Barberán et al., 2015). Finalmente, existe ainda uma relação próxima entre o microbioma da pessoa que inicia o processo de produzir a massa-mãe e o microbioma da massa-mãe em si, sendo que as bactérias presentes são muitas vezes espécies associadas a Humanos ou muito próximas das mesmas (Calvert et al., 2021; Reese et al., 2020). Contrariamente ao que se pensava (como por exemplo, no pão de São Francisco), não existe uma regionalidade no microbioma das massas-mãe (Landis et al., 2021). A diversidade e

estabilidade dos consórcios microbianos presentes em massas-mãe são ainda influenciadas pelas interações entre microrganismos e por vários parâmetros de fermentação, tais como temperatura, dimensão do inóculo, rendimento da massa (*Dough yield*, DY) e tempo de fermentação (Boreczek et al., 2020).

Um dos parâmetros importantes de fermentação é o rendimento da massa (DY). A fermentação pode dar-se numa massa-mãe de consistência firme ou com uma consistência de suspensão de farinha em água. O DY representa a proporção entre farinha e água numa massa-mãe e define-se da seguinte forma:

$$DY = \frac{(\text{quantidade de farinha} + \text{quantidade de H}_2\text{O}) \times 100}{\text{Quantidade de Farinha}}$$

O DY de uma massa-mãe vai influenciar significativamente o seu flavour. Quanto mais firme (valor de DY mais baixo), mais ácido acético será produzido e menos ácido láctico. A taxa de acidificação é também influenciada pelo DY. Assim, quanto maior o DY, mais rápida será a acidificação, muito provavelmente devido a uma melhor difusão dos ácidos orgânicos (Chavan & Chavan, 2011a).

A temperatura é talvez o fator que mais influencia a fermentação de uma massa-mãe. Se não for controlada e consistente, é possível a perda de microflora quando se processam as múltiplas inoculações em misturas de farinha e água, que mantêm o sistema. Embora seja dependente da estirpe, a temperatura ótima de crescimento para *Lactobacilli* é entre os 30° e 40°C, enquanto que para leveduras é entre os 25 e 27°C. No geral, a uma temperatura mais elevada, uma percentagem de água superior e farinha integral, consegue incrementar-se a produção de ácidos nas massas-mães à base de trigo (Chavan & Chavan, 2011a).

Vários outros artigos revelam que as comunidades microbianas de massas-mãe iniciadas espontaneamente atingem a estabilidade ao ser efetuados ciclos de *backslopping*. A estabilização parece ocorrer numa evolução em três fases consecutivas, que se caracterizam por (Calvert et al., 2021; L. De Vuyst et al., 2014; Van Der Meulen et al., 2007; Weckx et al., 2010):

- Fase 1 - Predominância dos microrganismos naturalmente presentes na farinha;
- Fase 2 - Aumento da presença e atividade de espécies normalmente associadas com massas-mãe;
- Fase 3 - Dominância por espécies associadas e bem adaptadas à massa-mãe, principalmente espécies heterofermentativas.

Tem sido isolada uma grande variedade de espécies de *Lactobacillus* homofermentativas e heterofermentativas de massas-mãe. Espécies de *Weissella* (*Weissella cibaria*, *Weissella confusa*), *Pediococci* (*Pediococcus acidilactis*) e *Leuconostocs*

(*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*) parecem ser menos predominantes, enquanto *Lactococci*, *Enterococci* e *Streptococci* são menos dominantes (De Vuyst et al., 2014).

Uma meta-análise de 2017 (De Vuyst et al., 2017), que analisou 583 massas-mãe cuja evolução foi efetuada por *backslopping*, revelou que os grupos prevalentes de bactérias ácido lácticas pertenciam ao grupo *Fructilactobacillus* (representado unicamente por *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (*Lactobacillus sanfranciscensis*)), presente em 47% das massas-mãe, e ao grupo de *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), presente em 44% das amostras. Em 22% das amostras estava presente o grupo *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), em 19% o grupo *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri*) e em 18% o grupo *Companilactobacillus alimentarius* (*Lactobacillus alimentarius*). Os géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella* foram identificadas em 18%, 15% e 15%, respetivamente, das massas-mãe examinadas. Segundo este estudo, outras espécies de bactérias ácido lácticas, como *Lacticaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*), *Lactobacillus delbueckii*, *Furfurilactobacillus rossiae* (*Lactobacillus rossiae*), *Lactilactobacillus sakei* (*Lactobacillus sakei*) e outros *Lactobacilli* e *Enterococci/Lactococci/Streptococci*, estavam presentes em 10% ou menos das amostras.

No estudo efetuado por Landis et al. (2021), onde foram identificados consórcios microbianos em 500 massas-mãe de todo o Mundo, há uma chamada de atenção para as bactérias acéticas, que parecem ter sido pouco estudadas em massas-mãe. Neste grupo de massas-mãe, existia cerca de 1% de bactérias acéticas em 147 das amostras, incluindo os géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter*.

2.2.2 Benefícios da utilização de massas-mãe na panificação

A utilização de massa-mãe na panificação traz inúmeros benefícios, quer para as características do pão em si, quer para a saúde de quem o consome:

- A fermentação de germen e de farelo do trigo com massa-mãe antes da sua utilização em panificação, parece funcionar como pré-tratamento, estabilizar e aumentar o seu valor nutricional e funcional. Assim, quando estes são depois utilizados em pão, melhoram o seu sabor, textura, retenção de dióxido de carbono (CO₂), volume e firmeza no decorrer do processo de envelhecimento (Lopez et al., 2001). Isto traduz-se num grande potencial para um aumento de minerais (por degradação de fatores antinutritivos, como o ácido fítico), vitaminas (Kariluoto et al., 2004; Katina et al., 2007) e compostos fitoquímicos (Liukkonen et al., 2003; Rizzello et al., 2012) e de fibras na dieta dos países ocidentais (Arora et al., 2021; Katina et al., 2006);

- Durante a fermentação natural de cereais por bactérias lácticas, dá-se a síntese de exopolissacarídeos microbianos (frutanos e glucanos) que têm o potencial de atuar como prebióticos ao nível do intestino Humano (Korakli et al., 2002) e, assim, melhorar os movimentos intestinais, prevenir o excesso de crescimento de microrganismos patogénicos por estimulação de microrganismos de ação probiótica residentes no intestino e aumentar a síntese de ácidos gordos de cadeia curta (Gobbetti et al., 2014);

- Durante a fermentação natural de cereais, dá-se proteólise primária, onde há a libertação de oligopéptidos pela ação de endoproteases dos cereais, e proteólise secundária, realizada maioritariamente por bactérias lácticas, e na qual se libertam péptidos de menores dimensões e aminoácidos livres (Graça et al., 2021). A fermentação natural de pão com a utilização de bactérias lácticas torna-se interessante, na medida em que se geram múltiplos aminoácidos livres e péptidos bioativos com propriedades antioxidantes, modulatórias de respostas inflamatórias (Gobbetti et al., 2014) e antimicrobianas (Graça et al., 2021). A síntese de aminoácidos livres de flavour e aminoácidos derivativos mascaram também a falta de sabor em pães para doentes hipertensos, devido a reduções de sal (Gobbetti et al., 2019a);

- A fermentação por ação de massa-mãe, especialmente na presença de valores de pH baixos (3,5-4,0) e de fibra, é considerada uma forma eficiente de redução do índice glicémico de cereais. Isso será devido a vários fatores em simultâneo, como o aumento de retrogradação do amido e produção de amidos resistentes (reduzem a velocidade de digestão), produção de ácido láctico (reduz a velocidade de digestão dos amidos), produção de ácidos acético e propiónico (prolongam o tempo de esvaziamento do estômago) e uma maior densidade do pão resultante (por si só é um fator de redução de índice glicémico) (Gobbetti et al., 2014);

- A hidrólise proteica que ocorre durante a fermentação natural de pão parece reduzir as suas propriedades alergénicas, causando o desaparecimento de algumas proteínas de ligação IgE (Gobbetti et al., 2014). Apesar de não ser consensual se são as proteínas (como as frações do glúten, gliadina e glutenina, ou os inibidores de amilase-tripsina) ou oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis fermentáveis (do inglês *FODMAP, Fermentable oligo-, di-, and monosaccharides and polyols*) que contêm que causam intolerância e sensibilidade à ingestão de trigo, a sua fermentação longa tem o potencial para reduzir ambos. Como demonstrado por Gobbetti et al. (2014), a fermentação natural de cereais (como trigo, centeio, cevada), em determinadas condições, reduz quase por completo o seu teor em glúten. Como a fermentação, além de enzimas proteolíticas, também ativa frutósidades, há uma redução de proteínas e frutanos no resultado final. Em condições muito específicas, o conteúdo de FODMAP num pão de fermentação natural pode ser reduzido até perto de 90% (Laatikainen et al., 2017).

2.2.3 Processo artesanal de panificação com utilização de massas-mãe

O processo de panificação com massa-mãe e, conseqüentemente, por fermentação natural é um processo longo e que requer bastante conhecimento (Decock & Cappelle, 2005). Enquanto que no processo de panificação com fermento de padeiro, os ingredientes podem ser misturados todos juntos no início, amassados, colocados na forma ou moldados na forma livre desejada, fermentados rapidamente por cerca de 1h (Decock & Cappelle, 2005) e imediatamente cozidos no forno, o mesmo não se passa com o processo de fermentação natural (Venturi et al., 2016). Neste último, há que misturar os ingredientes nos momentos-chave, elaborar uma mistura ou amassadura lenta e suave (que pode durar até 1h ou mais com intervalos de pausa), ter em atenção a necessidade de relaxamento da massa (Decock & Cappelle, 2005) e, claro, a temperatura.

A farinha é, juntamente com a água, o ingrediente mais importante em panificação porque é responsável pela modulação das características do produto final. Esta contém proteína, amido e outros hidratos de carbono, cinzas, fibras, lípidos, água e pequenas quantidades de vitaminas, minerais e enzimas. A farinha de trigo é a mais utilizada (Chavan & Chavan, 2011b). A fração de proteína na farinha de trigo é basicamente constituída por gliadina e glutenina. Quando são hidratadas com água, a sua mistura forma o glúten (Chavan & Chavan, 2011b). Quando hidratado e adequadamente amassado, o glúten na farinha de trigo forma uma rede tridimensional proteica coesa e elástica, que lhe confere as suas características de matriz viscoelástica (El Khoury et al., 2018). As gliadinas contribuem para uma maior viscosidade e extensibilidade da massa, enquanto que as gluteninas hidratadas são coesas e contribuem para a força e elasticidade (McGee, 2004).

A água é um ingrediente-chave para a formação de uma massa e é responsável pela sua fluidez. Intervém na dissolução do sal e na dispersão dos agentes fermentadores. A água é necessária para a hidrólise do amido e sacarose, para a gelatinização do amido, para a expansão da massa no forno, por vaporização (Chavan & Chavan, 2011a) e, mais tarde, no processo de retrogradação do amido. Na comunidade de panificação artesanal, o teor de água adicionado, quer à massa-mãe, quer à massa de pão é denominado de hidratação (Calvert et al., 2021; Kimbell, 2017). Uma massa com cerca de 50% de água (em percentagem de padaria, ou seja, em relação a 100g de farinha) resulta num pão leve com uma textura de miolo fina (Mondal & Datta, 2008). A maioria das formulações de pão artesanal contém entre 60% a 75% de água (Mondal & Datta, 2008). Em pães levedados com fermento de padeiro, percentagens mais elevadas de água resultam em mais CO₂ e uma textura de miolo menos homogénea.

O sal (cloreto de sódio) fortalece a rede de glúten, aquando da sua dissolução em água. As suas proteínas constituintes possuem carga positiva e repelem-se entre si,

alongando-se. Quando o cloreto de sódio se dissolve, os seus íons cloreto, de carga negativa, ligam-se às cargas positivas das proteínas e funcionam como um escudo entre elas e encurtando-as (McCann & Day, 2013). O sal controla também a ação dos agentes microbiológicos de fermentação e, conseqüentemente, controla o volume do pão (Chavan & Chavan, 2011a).

Existem milhares de estilos de pão artesanais por todo o mundo elaborados com fermentação natural, desde pães achatados a pães ao vapor, passando pela tradicional *boule* francesa. Todos os diferentes estilos de pão têm técnicas que evoluíram tradicional e geograficamente e com variações entre si. Contudo, há um processo e etapas marcantes e que merecem um olhar atento:

- **Autólise** - A autólise é uma técnica que foi introduzida pelo Professor Raymond Calvel no seu livro “Le gout du pain” (Calvel, 2001). Calvel era investigador na área de química e revolucionou a panificação francesa, após a 2ª guerra mundial. Os seus ensaios revelaram que misturando a farinha e a água de uma receita e deixando esta mistura descansar, intocada, não só reduzia o tempo de mistura e de amassadura, como também originava um pão com melhor textura e sabor. Hoje sabe-se que, durante a autólise, a farinha absorve água e as suas proteínas hidratam, favorecendo a formação de glúten. Ao mesmo tempo, a água favorece a ação de enzimas amilases, que começam a trabalhar na quebra de açúcares complexos em simples, que depois serão utilizados por bactérias e leveduras. A sua duração pode variar entre 20 min e 24h;

- **Amassadura** - Embora seja sempre desejável uma mistura com alguma energia e atenção, amassar não é necessário no processo de elaboração de pão de fermentação natural, uma vez que, sendo bastante lento, o desenvolvimento de glúten é feito por si só, ao longo do tempo. Porém, dependendo do tipo de farinhas utilizadas, uma pequena amassadura (à mão ou à máquina), após a adição do sal, pode ajudar a organizar as redes proteicas de forma mais rápida e eficiente (Cauvain, 2020). Nos pães com percentagens elevadas de farinha integral há que ter em atenção o efeito do farelo nas redes proteicas e não amassar demasiado (Kimbell, 2017). Num ambiente de padaria, é basicamente impossível sequer misturar os ingredientes, em grandes quantidades, sem a ajuda de máquinas. O processo de amassadura à máquina ajuda também a elevar a temperatura da massa e as quantidades maiores a mantê-la constante durante a fermentação (Kimbell, 2017);

- **Primeira Fermentação** - Durante este período, a massa é deixada a fermentar, de preferência a uma temperatura constante, que permita a esta manter-se entre os 23-28°C, dependendo do tipo de massa com que se está a trabalhar (Kimbell, 2017);

- **Dobras na massa** - É durante a 1ª fermentação que se fazem dobras na massa. Geralmente consistem em puxar uma parte da massa e dobrá-la sobre si, rodar o

recipiente 45° e repetir 3x. As dobras conferem estrutura, redes proteicas organizadas, dispersão de gás e tensão (Kimbell, 2017);

- **Pré-modelagem** - Confere uma pré-forma à massa, com tensão e estrutura. É geralmente uma técnica rápida, elaborada com as mãos ou uma espátula e que, após o corte da massa nas porções do peso desejado, modela esta na forma de uma bola tensa. A massa é depois deixada a descansar (*bench rest*) (Kimbell, 2017), para que a rede de glúten relaxe e a modelagem final seja possível e com sucesso (Cauvain, 2020). As proteínas do glúten estão, neste ponto, alinhadas e organizadas, com muitas ligações entre si. Como estas ligações são fracas (McGee, 2004), a modelagem quebra algumas delas e, ao longo do tempo, a estrutura relaxa e espalha, permitindo depois o seu manuseamento para a forma final;

- **Modelagem** - Após o período de descanso (duração de *bench rest* varia e pode ir de 10min a 1h), a massa estará pronta para ser modelada na sua forma final e colocada num cesto de fermentação (Cauvain, 2020). O objetivo é conferir estrutura e tensão extra à massa, para que aguente a segunda fermentação e a formação de mais gás, e nos permita cozê-la mantendo a forma;

- **Segunda Fermentação** - A segunda fermentação pode ser feita a frio ou à temperatura ambiente. Depois da massa estar com a forma desejada, bem estruturada, desenvolvida e com uma rede de proteínas forte, o processo de fermentação continua. O gás acumulado nesta fase, como quando se enche um balão, aumenta a tensão na massa e ajuda a que a forma se mantenha (Cauvain, 2020; Kimbell, 2017);

- **O corte** - É um passo não essencial em que, no calor húmido do forno, os gases do interior da massa expandem (particularmente se a segunda fermentação for feita no frio). O corte na superfície da massa dá a esta a oportunidade de expandir livremente, permitindo também a saída de vapor de forma controlada e com o potencial de ser esteticamente agradável (Kimbell, 2017);

- **A cozedura** - A cozedura de pão de fermentação natural (um pouco como a de pão normal) deve ser feita com um forno a temperatura bastante elevada (iniciada a 250-260°C e terminada a 200-220°C) e num ambiente bastante húmido (Chavan & Chavan, 2011a). Vapor de água é essencial, uma vez que impede a formação da cêdea do pão, permitindo à massa expandir livremente e atingir o máximo de expansão. O processo de cozedura é também uma das formas de manipular a espessura e crocância da cêdea do pão (Kimbell, 2017). É durante o cozimento do pão que se dão as reações de caramelização de açúcares e reações de Maillard (entre açúcares e aminoácidos), que lhe conferem a cor e o flavour que o caracterizam (Siepmann et al., 2017);

- **O Arrefecimento** - O arrefecimento é uma parte muito importante no processo de panificação. Durante o arrefecimento, diferenças de temperaturas internas tendem a

equilibrar-se e a humidade difunde-se para o exterior. Dá-se também a retrogradação do amido, enquanto a temperatura baixa, conferindo a firmeza tão desejada ao miolo (Cauvain, 2020; Kimbell, 2017).

Na Tabela 1 encontram-se resumidos os processos que ocorrem no pão durante a sua cozedura.

Tabela 1 - Resumo dos processos que ocorrem durante a cozedura de pão. Adaptado de (Guerreiro & Mata, 2010).

Temperatura da Massa (°C)	Fenómenos que ocorrem na massa durante a cozedura
30-35	Aumento da atividade de leveduras com produção de gás e expansão do gás pelo calor. A massa aumenta ainda mais de volume.
50-60	Fim da atividade de leveduras e bactérias.
60-80	Coagulação das proteínas; gelatinização do amido; Fim da expansão em volume.
100	Evaporação da água, libertação de vapor de água e início de formação da côdea.
130-200	Escurecimento - reações de caramelização de açúcares e reações de Maillard entre açúcares e aminoácidos. Flavour.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção do trigo Preto-Amarelo

O trigo escolhido, da variedade portuguesa Preto-amarelo, foi obtido em grão e gentilmente cedido pelo agricultor e moleiro Miguel Nobre Vilar, da sua colheita de 2020, da Serra de Montejunto.

O cereal utilizado para a preparação e estabelecimento da massa-mãe foi armazenado a 4°C, enquanto que o cereal para a sua alimentação, após estabilização, foi conservado a -18°C.

3.2 Produção da farinha para a massa-mãe

A farinha de trigo para a massa-mãe foi produzida num moinho de pedra de uso doméstico Mockmill 100 (Wolfgang Mock GmbH, Alemanha), na opção de moagem mais fina, e sem que a temperatura da farinha resultante ultrapassasse os 35°C. Após moagem, a farinha foi peneirada com uma peneira de 1,5 mm da marca KoMo para garantir que todas as partículas têm dimensões iguais ou inferiores a este valor.

3.3 Preparação da massa-mãe

A massa-mãe foi preparada com uma mistura de farinha e água da torneira ao longo do tempo, a uma temperatura constante de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com a utilização de uma estufa Brød and Taylor (EUA). A produção da massa-mãe considerou-se completa quando o seu pH se manteve constante por 3 dias, quando medido nas mesmas condições. A hidratação da massa-mãe foi de 80% (com 100% sendo o peso da farinha) e, aquando estabelecida, foi alimentada a cada 12h (Tabela 2). O processo de alimentação consistiu em retirar 10 g de massa-mãe e, noutra recipiente, misturá-la vigorosamente com 40 g de água e 50 g de farinha. A restante massa-mãe não utilizada é considerada descarte.

Tendo em consideração que um valor de Dough Yield é de cerca de 160 para uma massa firme e a partir de 200 se considera uma massa líquida (Decock & Cappelle, 2005), optou-se por um valor intermédio de 180 para este estudo. Esta valor foi calculado utilizando

o método apresentado na Introdução do presente trabalho e os valores de massa de farinha e água apresentados acima.

A Tabela 2 ilustra as etapas de preparação da massa-mãe até à sua maturação.

Tabela 2 - Preparação da massa-mãe até à sua maturação.

Dia e horário	Observações
Dia 0 19h	Misturou-se 50 g de farinha de trigo Preto-amarelo com 40 g de água e misturou-se vigorosamente.
Dia 1 19h	Adição de 20 g de água e 25 g de farinha.
Dia 2 19h	Primeira alimentação com pesagem de 10 g de massa-mãe, que se colocou noutro recipiente limpo. Misturou-se de seguida vigorosamente com 40 g de água e 50 g de farinha.
Dia 3 19h	Alimentou-se de novo.
Dias 4, 5, 6 e 7 19h	Alimentou-se como nos dias anteriores.
Dia 8, 9, 10 e 11 7h 19h	Alimentou-se duas vezes, com 12h de intervalo.

3.4 Medições de pH

O pH das massas-mãe, das massas de pão após fermentação e no decorrer das titulações foi medido utilizando um eletrodo de pH (PHM92 LAB pH meter, RADIOMETER COPENHAGEN).

3.5 Caracterização microbiológica do trigo e massa-mãe

3.5.1 Preparação da solução de farinha e da massa-mãe

Para se poderem realizar as análises microbiológicas, misturou-se 1 g de farinha de trigo Preto-amarelo, ou da respetiva massa-mãe, com 9 ml de água desmineralizada estéril num tubo falcon de 50 ml. Efetuou-se agitação vigorosa manual e no vortex até homogeneização da mistura e incubou-se à temperatura ambiente (23°C) durante 1h. De seguida, realizaram-se diluições decimais sucessivas até 10^{-7} . Todo este processo foi feito em duplicado.

No total, o trigo teve três momentos de colheita de amostras para análise microbiológica: farinha seca, massa-mãe aquando do pico de atividade inicial no Dia 2 e massa-mãe após estabilização dos valores de pH.

3.5.2 Meios de Cultura

No presente trabalho foram utilizadas placas com os seguintes meios de cultura:

- YPD (5g/L de extrato de levedura [Liofilchem Diagnostici], 20g/L de glucose, 10g/L de peptona [Biokar diagnostics, França], 20g/L de agar);
- YPD + CHL (5g/L de extrato de levedura [Liofilchem Diagnostici], 20g/L de glucose, 10g/L de peptona [Biokar diagnostics, França], 20g/L de agar, 2ml/L de cloranfenicol);
- YPD + CHL + CH (5g/L de extrato de levedura [Liofilchem Diagnostici], 20g/L de glucose, 10g/L de peptona [Biokar diagnostics, França], 20g/L de agar, 2ml/L de cloranfenicol, 1g/L de cicloheximida);
- MRS + CH (55.3g/L de MRS broth [Biokar diagnostics, França], 15g/L de agar, 1g/L de cicloheximida);
- GYC + Nat (50g/L de glucose, 10g/L de extrato de levedura [Liofilchem Diagnostici], 3g/L de carbonato de cálcio [Scharlau, Espanha], natamicina [Delvolid, DSM Food Specialties, Holanda] 0.1mg/mL, pH 4.5).

O objetivo da utilização de um alargado número de meios de cultura, prende-se com o facto de cada um ser bastante específico para os microrganismos que inibe, efetuando-se assim a seleção do que se desenvolve. Assim:

- Meio YPD – Meio muito rico, ideal para crescimento de leveduras e bactérias;

- Meio YPD com adição de cloranfenicol (YPD + CHL) – Meio muito rico, com a adição de cloranfenicol, que é um antibiótico utilizado para inibir o crescimento de bactérias (Howell et al., 2017);
- Meio YPD com adição de cloranfenicol e cicloheximida (YPD + CHL + CH) – Meio muito rico, com a adição de cloranfenicol (Zott et al., 2008), que é um antibiótico utilizado para inibir o crescimento de bactérias e cicloheximida, que é um antifúngico que inibe leveduras *Saccharomyces* (Zott et al., 2008);
- Meio MRS com adição de cicloheximida (MRS + CH) – Meio muito rico, muito utilizado para crescimento de bactérias lácticas, com adição de cicloheximida, que é um antifúngico que inibe leveduras *Saccharomyces*;
- Meio GYC com adição de Natamicina (GYC + Nat) – Meio muito rico utilizado para crescimento de bactérias acéticas (Raspor & Goranovič, 2008), com adição de natamicina, que é um antifúngico (Pedersen, 1992).

Após realizadas as diluições necessárias, inocularam-se 100µL de cada amostra por placa (em duplicado), por espalhamento de vareta em L. As placas inoculadas foram incubadas à temperatura ambiente (23°C) até crescimento visível das colónias.

3.5.3 Isolamento de Microrganismos

Quando se verificou o crescimento de colónias, fez-se uma primeira observação, descrição macromorfológica e, quando possível, a sua contagem. Selecionaram-se as mais distintas e representativas e realizou-se o seu isolamento, por riscado em placa de YPD, de cada colónia isolada representativa e incubou-se à temperatura ambiente (23°C) (Willey et al., 2020).

3.5.4 Técnicas de caracterização de microrganismos

Devido à natureza desconhecida dos microrganismos em cultura, tornou-se necessária a realização de alguns testes que servissem de guia ao tipo de amplificação por PCR a ser realizada (Willey et al., 2020).

3.5.4.1 Observação macroscópica das colónias

As colónias observadas nos vários meios de cultura foram primeiramente caracterizadas macromorfológicamente atendendo a critérios como: cor da colónia e do verso, tamanho, margem, perfil e textura (Willey et al., 2020).

3.5.4.2 Observação microscópica

Todas as colónias seleccionadas e isoladas foram observadas ao microscópio ótico, nas ampliações de 400x e 1000x. Para o efeito foram efetuadas montagens entre lâmina e lamela das amostras em água. As características morfológicas das células dos microrganismos observados proporcionaram informação adicional no que toca à sua identificação (Willey et al., 2020).

3.5.4.3 Caracterização microbiológica por meio de testes bioquímicos

Todas as colónias seleccionadas e isoladas foram submetidas ao teste rápido de hidróxido de potássio (*KOH*) e ao teste de produção da enzima catálase.

O teste *KOH* consistiu na colocação de uma gota de *KOH* 3% (p/v) numa lâmina limpa e, com a ajuda de uma ansa, ressuspendeu-se uma colónia nesta. Seguidamente elevou-se a ansa e observou-se a formação ou não de um fio (Willey et al., 2020).

O teste de produção da enzima catálase consistiu em colocar uma porção de colónia numa lâmina limpa e adicionar umas gotas de peróxido de hidrogénio 3% (Wells, Portugal). Observou-se de imediato a presença ou ausência de efervescência (Willey et al., 2020).

3.6 Técnicas Moleculares de Identificação de Microrganismos

3.6.1 Extração de ADN

3.6.1.1 Bactérias Láticas

Para esta extração de ADN, utilizou-se o método de fervura, adaptado de Abdulla (2014). Com um palito estéril, transferiu-se 1 colónia das culturas puras cultivadas em meio de YPD para tubos eppendorfs contendo 50µL de água milli-Q esterilizada. Agitou-se no vortex e aqueceu-se a 100°C durante 20 minutos. De seguida, arrefeceu-se em gelo e centrifugou-se (SIGMA 1-14, SIGMA, Alemanha) a 16000 x g durante 5 minutos. Recolheu-se a quantidade necessária de sobrenadante.

3.6.1.2 Bactérias Acéticas

Para a extração de ADN das bactérias que se consideraram como acéticas, utilizou-se novamente o método de fervura das amostras, mas adaptado de Millar et al. (2000). Com um palito estéril, transferiu-se 1 colónia das culturas puras cultivadas em meio de YPD para tubos eppendorfs contendo 50µL de uma solução tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8.0 com 1mM de EDTA). Agitou-se no vortex e aqueceu-se a 100°C durante 15 minutos. De seguida, arrefeceu-se em gelo e centrifugou-se (SIGMA 1-14, SIGMA, Alemanha) a 16000 x g durante 15 minutos. Recolheu-se a quantidade necessária de sobrenadante.

3.6.1.3 Leveduras

Para a extração de ADN das leveduras, seguiu-se um protocolo adaptado do método descrito por Akada et al. (2000). Com um palito estéril, transferiu-se 1 colónia das culturas puras cultivadas em meio de YPD para tubos eppendorfs contendo 30µL de uma solução de SDS (1% p/v). Agitou-se no vortex para favorecer a homogeneização e aqueceu-se a 100°C por 15 minutos. De seguida, arrefeceu-se em gelo e centrifugou-se (SIGMA 1-14, SIGMA, Alemanha) a 16000 x g durante 15 minutos. Recolheu-se a quantidade necessária de sobrenadante.

3.6.2 Amplificação do ADN por PCR

3.6.2.1 Bactérias Láticas

O ADN extraído foi amplificado por PCR, utilizando um protocolo adaptado de Santos (2016) e os primers pA e pH, descritos por Edwards et al. (1989), baseados na região 16S do ARN ribossomal (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências dos primers pA e pH utilizados no presente trabalho (Edwards et al., 1989).

Primer	Sentido	Sequência (5' - 3')
pA	Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
pH	Reverse	AAGGAGGTGATCCAGCCG

A mistura reacional utilizada para a identificação molecular encontra-se apresentada na Tabela 4:

Tabela 4 - Mistura reacional para a reação de amplificação utilizada para bactérias láticas.

Reagente	Volume (μL)
10x Reaction Buffer (Nzytech, Portugal)	5
Água Nuclease Free	30 (ou 31, no controlo)
Triton-X 100 2%	10
dNTPS	1
Primer pA	1
Primer pH	1
NzyProof DNA Polymerase (Nzytech, Portugal)	1
ADN extraído em 3.5.1.1	1
Volume Total	50

Realizou-se a reação de amplificação num Termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA) utilizando numa primeira fase o programa descrito na Tabela 5, adaptado de Camilo (2014).

Tabela 5 - Programa de PCR utilizado para as bactérias lácticas, adaptado de Camilo (2014).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5min	1
Desnaturação	94	30s	34
<i>Annealing</i>	56	30s	
Extensão	72	1	
<i>Elongation</i>	72	5	1
Arrefecimento	4		

Após a primeira reação de PCR realizou-se uma nova reação de amplificação utilizando um programa com gradiente de temperaturas de *annealing*, descrito abaixo (Tabela 6):

Tabela 6 - Programa com gradiente de temperaturas de PCR utilizado para as bactérias lácticas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5min	1
Desnaturação	94	30s	34
<i>Annealing</i>	56,4/58,3/60,8/62,0	30s	
Extensão	72	1	
<i>Elongation</i>	72	5	1
Arrefecimento	4		

O gradiente de temperaturas de *annealing* permitiu executar o procedimento de PCR, ao mesmo tempo, com quatro temperaturas diferentes nesta fase e avaliar qual delas oferece uma maior especificidade de ligação dos primers e, assim, uma maior definição das bandas no gel.

3.6.2.2 Bactérias Acéticas

O ADN extraído foi amplificado por PCR, utilizando um protocolo adaptado de Santos (2016) e utilizando os primers Ac1 e Ac3, descritos por Poblet et al. (2000) (Tabela 7).

Tabela 7 - Sequências dos primers Ac1 e Ac3 (Poblet et al., 2000).

Primer	Sentido	Sequência (5' - 3')
Ac1	Forward	GCTGGCGGCATGCTTAACACAT
Ac3	Reverse	AACCACATGCTCCACCGCTTG

A mistura reacional utilizada para a identificação molecular encontra-se apresentada na Tabela 8:

Tabela 8 - Mistura reacional para a reação de amplificação utilizada para bactérias acéticas.

Reagente	Volume (µL)
10x Reaction Buffer (Nzytech, Portugal)	5
Água Nuclease Free	30 (ou 31, no controlo)
Triton-X 100 2%	10
dNTPS	1
Primer Ac1	1
Primer Ac3	1
NzyProof DNA Polymerase (Nzytech, Portugal)	1
ADN extraído em 3.5.1.2	1
Volume Total	50

A reação de amplificação do ADN foi efetuada num Termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA), segundo o programa descrito na Tabela 9, adaptado de Camilo (2014):

Tabela 9 - Programa de PCR utilizado para as bactérias acéticas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	7	1
Desnaturação	95	1	39
<i>Annealing</i>	64	2	
Extensão	72	2	
<i>Elongation</i>	72	10	1
Arrefecimento	4		

3.6.2.3 Leveduras

O ADN extraído foi amplificado por PCR, utilizando os primers ITS1 e ITS4, descritos por White et al. (1990) (Tabela 10).

Tabela 10 - Sequências dos primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990).

Primer	Sentido	Sequência (5' - 3')
ITS1	Reverse	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	Forward	TCCTCCGCTTATTGATATGC

A mistura reacional utilizada para a identificação molecular encontra-se apresentada na Tabela 11:

Tabela 11 - Mistura reacional utilizada na reação de PCR com os primers ITS1 e ITS4.

Reagente	Volume (µL)
10x Reaction Buffer (Nzytech, Portugal)	5
Água Nuclease Free	27 (ou 28, no controlo)
Triton-X 100 2%	10
dNTPS	1
Primer ITS1	1
Primer ITS4	1
NzyProof DNA Polymerase (Nzytech, Portugal)	1
ADN extraído em 3.5.1.3	4
Volume Total	50

A reação de amplificação do ADN foi efetuada num Termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA), segundo o programa descrito na Tabela 12:

Tabela 12 - Programa de PCR utilizado para amplificação do ADN (região ITS) de leveduras.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	10	1
Desnaturação	95	1	30
Annealing	49	1	
Extensão	72	1	
Elongation	72	7	1
Arrefecimento	10		

Neste caso, foi necessária uma segunda amplificação do produto do primeiro PCR. A mistura reacional utilizada para a amplificação do produto anterior encontra-se apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 - Mistura reacional para o PCR de reamplificação do produto da reação de amplificação anterior.

Reagente	Volume (μL)
10x Reaction Buffer (Nzytech, Portugal)	5
Água Nuclease Free	30 (ou 31, no controlo)
Triton-X 100 2%	10
dNTPS	1
Primer ITS1	1
Primer ITS4	1
NzyProof DNA Polymerase (Nzytech, Portugal)	1
Produto do PCR anterior	1
Volume Total	50

Novamente, o PCR foi efetuado num Termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA), segundo o programa descrito na Tabela 14:

Tabela 14 - Programa de PCR utilizado para as leveduras.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	10	1
Desnaturação	95	1	30
<i>Annealing</i>	49	1	
Extensão	72	1	
<i>Elongation</i>	72	7	1
Arrefecimento	10		

3.6.3 Quantificação do Produto de PCR

Depois de amplificado, o ADN foi quantificado através de electroforese em gel de 1% (p/v) de agarose SeaKem® LE Agarose (Lonza, EUA), preparado com tampão TAE 1% (p/v), ao qual foram adicionados 2 μL de GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal) por cada 50 mL da mistura. As amostras e controlo foram preparadas com 10 μL de produto PCR e 3 μL de buffer de carga (NZYTech, Portugal). Utilizaram-se como marcadores de peso molecular o

NZYDNA Ladder I (NZYTech, Portugal) e o λ Hind III. Este último foi preparado num tubo onde se misturou 5 μ L de λ Hind III, 5 μ L de água desmineralizada estéril e 3 μ L de buffer de carga (NZYTech, Portugal).

Correu-se o gel a 60V durante 50 minutos.

Observou-se o resultado da eletroforese em gel de agarose num equipamento de raios ultravioleta (CleverClearView UV Transilluminator) (Anexo 2 - Figura 27, Figura 28 e Figura 29).

3.6.4 Sequenciação de ADN e identificação dos microrganismos

As amostras foram purificadas utilizando o sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (EUA) e seguindo as instruções do fabricante.

O ADN amplificado e purificado foi sequenciado pela empresa STABVida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências obtidas foram analisadas com a ajuda do programa BioEdit e depois analisadas através da plataforma BLAST® (NCBI, EUA). Utilizou-se a ferramenta Blastn, com as definições *Search Database – Nucleotide collection (nr/nt) – Highly similar sequences (megablast)*.

3.7 Preparação dos Pães

Todos os pães foram preparados com uma farinha comercial branca de trigo, tipo T65, moída em mós de pedra, da marca Natur' Avenir (Relais Vert SAS, França). A sua composição nutricional média (por 100 g) é de 0,7 g de gorduras, 69,0 g de glúcidos, 12,0 g de proteínas e 14,0 g de humidade.

Também foi utilizado fermento de padeiro comercial da marca Fermipan (Lallemand Iberia, SA, Portugal) e sal marinho tradicional da marca Marnoto (Necton, Portugal).

As formulações (Tabela 15) foram desenvolvidas e serão apresentadas em função do valor de massa de farinha T65 utilizada (Aplevicz et al., 2013), de forma a poderem melhor reproduzir o processo de panificação artesanal. Foram utilizadas duas percentagens diferentes de água nas formulações (para uma humidade base da farinha de 14%): 56.25%, que foi determinada e otimizada recorrendo aos testes efetuados no Micro-doughLAB (Perten Instruments, Australia) e 66.67%, que foi determinada de forma intuitiva e sensorialmente, como reprodução do que seria o processo artesanal. Embora as formulações tenham sido ajustadas para o agente levedante utilizado, tentou-se que fossem o mais semelhantes

possível, de forma a serem seguidos sempre os mesmos passos e técnicas e havendo apenas variações no tempo.

A temperatura da água utilizada foi sempre ajustada, bem como a temperatura da estufa, de modo a que a temperatura final das misturas estivesse sempre por volta de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Todos os ingredientes das formulações foram pesados tendo em conta uma quantidade de farinha de 300 g como base para cada pão.

De forma a poderem ser uniformizadas as condições de amassadura, utilizou-se para o efeito um processador de alimentos Bimby (Thermomix, Alemanha).

Tabela 15 - Formulações das diferentes massas e pães produzidos (valores expressos em percentagem relativamente ao peso da farinha).

Ingredientes (%)	Formulação			
	SD1	SD2	F1	F2
Farinha de Trigo T65	100	100	100	100
Massa-mãe	20	20	0	0
Fermento de Padeiro	0	0	1,1	1,1
Sal	2,2	2,2	2,2	2,2
Água	66,67	56,25	66,67	56,25

Foram produzidos quatro pães a partir das formulações SD1 (massa-mãe e 66,67% de hidratação) e F1 (fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) e dois pães partindo das formulações SD2 (massa-mãe e 56,25% de hidratação) e F2 (fermento de padeiro e 56,25% de hidratação).

As técnicas utilizadas abaixo foram produto de otimização prévia e adaptadas para poderem ser uma representação do método artesanal de panificação, mas que pudesse ser reproduzido em laboratório.

3.7.1 Pão de fermentação natural preparado com a massa-mãe

Doze horas antes de ser necessário, preparou-se a massa-mãe, com 20% de massa-mãe, 80% de água e 100% de farinha de trigo Preto-amarelo e colocou-se na estufa.

Onze horas e trinta minutos depois misturou-se a farinha e a água no processador por 1 minuto na função Espiga e aguardou-se 30 minutos (autólise sem massa-mãe). De seguida

adicionou-se a massa-mãe e, mais uma vez, amassou-se 1 minuto na função Espiga e fez-se uma pausa de 1 hora (autólise com massa-mãe). Adicionou-se então o sal e amassou-se a mistura durante 1 minuto na função Espiga, três vezes, com pausas de 5 minutos entre estas.

A massa foi depois colocada noutra recipiente e colocada na estufa. De 30 em 30 minutos, nas primeiras 2 horas, foram feitas dobras na massa. Após este período, a massa fermentou mais 1 hora. Foi feita então uma pré-modelagem da massa, que repousou na bancada durante 20 minutos antes de se efectuar a modelagem final e colocar numa forma retangular de 20 x 11 x 7 cm e se colocar novamente na estufa para uma segunda fermentação de 3 horas. Após este passo, a forma foi protegida com uma touca plástica e colocada no frigorífico a 7°C durante 1 hora. As massas foram cozinhadas cobertas com papel de alumínio, num forno pré-aquecido a 230°C durante 30 minutos. Após este tempo, as formas foram destapadas, a temperatura reduzida para 200°C e os pães cozinhados por mais 15 minutos. Após a cozedura, os pães arrefeceram à temperatura ambiente sobre uma grelha, durante 12h. Análises e cortes foram efetuados somente após arrefecimento completo.

3.7.2 Pão preparado com fermento de padeiro

Misturou-se a farinha e a água no processador por 1 minuto na função Espiga e aguardou-se 30 minutos (autólise). De seguida adicionou-se o fermento de padeiro e o sal e amassou-se a mistura durante 1 minuto na função Espiga, três vezes, com pausas de 5 minutos entre estas.

A massa foi depois colocada noutra recipiente, feita uma dobra e colocada na estufa a fermentar durante 1 hora. Foi feita então uma pré-modelagem da massa, que repousou na bancada durante 20 minutos antes de se efectuar a modelagem final e colocar numa forma retangular de 20 x 11 x 7 cm e se colocar novamente na estufa para uma segunda fermentação de 45 minutos. Após este passo, a forma foi protegida com uma touca plástica e colocada no frigorífico a 7°C durante 1 hora. O processo de cozimento foi semelhante ao realizado para o pão preparado com massa-mãe.

3.8 Avaliação reológica do comportamento da farinha numa mistura

Para avaliar o comportamento reológico da farinha utilizada para as massas e pães e a sua capacidade de absorção de água durante a amassadura, utilizou-se o equipamento Micro-doughLAB 2800 (Perten Instruments, Australia). Com a ajuda das curvas de

amassadura realizadas encontrou-se a absorção de água (WA) adequada para atingir um valor máximo de torque de 130 mN.m \pm 4%, valor referência para o trigo (AACC 54.70-01).

3.9 Caracterização das massas de pão elaboradas a partir da massa-mãe ou do fermento de padeiro

3.9.1 Comportamento viscoelástico linear das massas de pão

Para análise do comportamento viscoelástico linear das massas de pão, após a segunda fermentação, utilizou-se um reômetro de tensão controlada (Mars III, Haake, Alemanha) acoplado com um sistema de Peltier. O sensor utilizado foi um sistema de pratos paralelos serrados PP20 (20 mm de diâmetro) com uma distância entre pratos de 1,5 mm.

Para a realização dos testes, que foram sempre feitos em triplicado, foram colocadas entre os pratos do reômetro pequenas porções de massa. Após junção do sistema de pratos, a porção de massa visível foi coberta com parafina líquida, para prevenir a sua secagem durante a duração dos testes. Para evitar o processo de fermentação o mais possível, evitando a evolução da massa durante a análise, os ensaios foram realizados a uma temperatura de $5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e as massas foram mantidas no frigorífico entre testes.

Na figura abaixo pode observar-se a amostra colocada entre o sistema de pratos paralelos do reômetro durante um dos testes efetuados (Figura 2).



Figura 2 - Amostra durante o processo de testes no reômetro (Mars III, Haake, Alemanha), acoplado com sistema de pratos paralelos serrados PP20 (20 mm de diâmetro) com uma distância entre pratos de 1,5 mm.

O primeiro ensaio realizado para cada amostra de massa do mesmo pão foi sempre um teste de varrimento de tensões a 1 Hz, para identificação da zona viscoelástica linear. De

seguida, realizou-se sempre um teste de varrimento de tempo à frequência de 1 Hz e com o valor de tensão de 1 Pa, de modo a determinar o intervalo de tempo necessário para a estabilização da amostra, visível através da estabilização dos valores de G' e G'' ao longo do tempo. Este teste não é destrutivo, já que a tensão aplicada está abaixo da tensão crítica que separa o comportamento viscoelástico linear do não linear. Os testes de varrimento de frequências foram efetuados após um tempo de estabilização da amostra e da temperatura de 1200 s, uma tensão de 2 Pa e valores de frequência entre 0,01 e 100 Hz.

3.9.2 Avaliação da textura das massas

A caracterização da textura das massas foi realizada utilizando um texturómetro TA.XT.Plus (Stable Micro Systems, UK), com uma célula de carga de 5kg, no qual se procederam a análises de perfil de textura (TPA – *Texture Profile Analysis*). Este tipo de ensaio, também conhecido por teste das duas dentadas, consiste na penetração da amostra duas vezes, o que simula as condições a que os alimentos estão sujeitos durante o processo de mastigação (Bourne, 2002).

Todas as massas foram preparadas de forma a serem colocadas num recipiente cilíndrico apropriado para o teste (95 mm de diâmetro e 85 mm de altura), após a modelagem, sendo neste onde decorre a segunda fermentação e o subsequente arrefecimento no frigorífico.

Neste ensaio, foi utilizada uma sonda acrílica cilíndrica com 19 mm de diâmetro (P/19), uma distância de penetração de 15 mm, uma velocidade de penetração de 1 mm.s^{-1} e com um tempo de espera entre ciclos de 5 s. Foram realizadas pelo menos 3 repetições do teste para cada massa, sempre em locais diferenciados da superfície da amostra.

3.10 Caracterização dos pães elaborados a partir da massa-mãe ou fermento de padeiro

3.10.1 Avaliação da textura do pão

A caracterização da textura dos pães foi realizada recorrendo ao mesmo texturómetro e tipo de ensaio que foi utilizado para as massas.

Todos os pães foram preparados de forma a serem fatiados cerca de doze horas após cozedura e já com arrefecimento completo. Foram utilizadas 2 fatias com 2 cm de espessura por teste, cada uma cortada como auxílio de uma faca de pão, tendo sido descartada a fatia inicial de 2 cm em cada pão (topos do pão).

Neste ensaio, foi utilizada uma sonda acrílica cilíndrica com 19 mm de diâmetro (P/19), com uma distância de penetração de 8 mm, uma velocidade de penetração de 1 mm.s^{-1} e com um tempo de espera entre ciclos de 5 s. Foram realizadas pelo menos 2 repetições do teste para cada fatia de pão, sempre em locais diferenciados da superfície destas.

A Figura 3 mostra o texturómetro no decorrer de um teste TPA a uma fatia de pão.



Figura 3 – Texturómetro TA.XT.Plus (Stable Micro Systems, UK) no decorrer de um teste texture profile analysis a uma fatia de pão.

3.10.2 Medição da atividade da água

A determinação das variações da atividade da água foi efetuada com a utilização de um equipamento HygroPalm-AW (Rotronic, Reino Unido) a uma temperatura de $20,0^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$. Após arrefecimento completo do pão, efectuaram-se seis medições para cada amostra, utilizando miolo de pão que foi esfarelado em migalhas de pequenas dimensões.

3.10.3 Determinação do teor de Humidade do miolo de pão

A determinação do teor de humidade foi efetuada recorrendo um equipamento ADAM PMB 202 Moisture Analyzer, onde se pesam 5 g de amostra de miolo de pão, esfarelado em migalhas de pequenas dimensões, que é depois aquecido a 130°C. Foram realizadas seis repetições do teste para cada amostra.

3.10.4 Determinação do Volume do pão

Após arrefecimento completo, a determinação do volume do pão foi realizada pelo método de deslocamento de sementes de colza, seguindo a norma AACC 10-05.01, como utilizada por Graca et al., 2019.

O volume específico do pão foi calculado recorrendo à equação abaixo:

$$\text{Volume Específico (cm}^3/\text{g)} = \frac{\text{Volume do Pão (cm}^3\text{)}}{\text{Massa do Pão (g)}}$$

3.10.5 Avaliação da cor da còdea e do miolo do pão

A cor da còdea e do miolo do pão foi medida utilizando um colorímetro Minolta CR-400 (Japão) com o iluminante D65. Os resultados obtidos foram expressos em coordenadas do sistema CIELAB: L* - Luminosidade (0-100), a* - verde a vermelho (-60 a 60) e b* - azul a amarelo (-60 a 60), como realizado por Nunes et al., 2020. Cada medida foi repetida um total de seis vezes.

A diferença total de cor entre cada um dos pães foi calculada recorrendo à equação:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Os valores de ΔE^* são interpretados pela capacidade de um observador padrão detetar diferenças de cor, da seguinte forma (Mokrzycki & Tatol, 2011):

- $0 < \Delta E^* < 1$ - o observador não percebe a diferença;
- $1 < \Delta E^* < 2$ - apenas um observador experiente pode notar a diferença;
- $2 < \Delta E^* < 3,5$ - o observador inexperiente também nota a diferença;

- $3,5 < \Delta E^* < 5$ - diferença clara na cor é observada;
- $\Delta E^* > 5$ - o observador nota duas cores diferentes.

Recorrendo também ao sistema CIEL*C*h (*Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h*, n.d.), calculou-se também o valor de saturação da cor, C^*_{ab} , e tonalidade (McLellan et al., 1995), h_{ab} , através das equações:

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}}$$

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{180}{\pi}, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0$$

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{180}{\pi} + 180, \text{ se } a^* < 0$$

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{180}{\pi} + 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0$$

3.10.5 Determinação das perdas durante a cozedura

Durante a cozedura de uma massa de pão decorrem perdas de água e material orgânico (açúcares fermentados e dióxido de carbono que é libertado) (Graça et al., 2019), que podem ser calculadas recorrendo à equação seguinte:

$$\text{Perdas durante a cozedura (\%)} = \frac{\text{Massa antes da cozedura} - \text{Massa após cozedura}}{\text{Massa antes da cozedura}} \times 100$$

3.11 Determinação da acidez das massas e dos pães

A acidez, expressa em g ácido acético/100 g de matéria-fresca, foi determinada por titulação de 0,5 g de amostra de massa ou de pão no final da fermentação, aos quais se adicionou 100 ml de água desmineralizada e 2 gotas de solução de fenolftaleína, utilizando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (processo adaptado de Park et al. (2006)). Utilizou-se NaOH 0,05 M ou NaOH 0,1 M, conforme apropriado para controlo das subidas de pH durante o processo de titulação. Para cada amostra, a análise foi feita em duplicado.

3.12 Análise estatística

Os valores experimentais foram analisados estatisticamente recorrendo ao programa GraphPad Prism, onde foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey e um nível de significância de 95%.

4. Resultados e discussão



No presente trabalho preparou-se uma massa-mãe a partir de um trigo português (o trigo Preto-amarelo) e isolaram-se e identificaram-se os microorganismos mais significativos nos vários estágios da sua evolução.






Elaborou-se também massa e pão de fermentação natural a partir da massa-mãe produzida em comparação com fermento de padeiro comercial. Foram avaliadas textura e reologia das massas, bem como textura, volume, cor, humidade e atividade da água dos pães.






4.1 Aspetos macroscópicos da evolução da massa-mãe ao longo do tempo

A massa-mãe de trigo Preto-amarelo foi preparada no decorrer de 12 dias. Ao longo do tempo foi sendo propagada por *backslopping* (alimentada) e foi apresentando características que variaram bastante ao longo do tempo. Na Tabela 16 é apresentado um resumo das características mais marcantes apresentadas pela massa-mãe de dia 0 a dia 11.

Tabela 16 – Características apresentadas pela massa-mãe até à sua maturação.

Massa-Mãe	Observações	Foto
Dia 0 19h	Mistura de farinha e água. Nenhuma atividade detetada. Cheiro a farinha húmida.	
Dia 1 19h	Alguma atividade. Cheiro a farinha já com ligeiro aroma a queijo.	

<p>Dia 2</p> <p>19h</p>	<p>Muita atividade e bolhas de gás.</p> <p>Cheiro muito forte que relembra o cheiro a queijo.</p>		
<p>Dia 3</p> <p>19h</p>	<p>Boa atividade e bolhas de gás.</p> <p>Cheiro forte ainda, mas mais a vinagre do que a queijo. Ainda não tinha perdido gás após 24h sem ser alimentada.</p>		
<p>Dia 4</p> <p>19h</p>	<p>Muito boa atividade e bolhas de gás.</p> <p>Cheiro forte e acético, já sem qualquer cheiro a queijo. Ainda não tinha perdido estrutura e gás após 24h sem ser alimentada.</p>		
<p>Dia 5</p> <p>19h</p>	<p>Melhor atividade que no dia 5 e mais bolhas de gás.</p> <p>Cheiro forte e acético, já sem sinal do cheiro a queijo. Ainda não tinha perdido estrutura e gás após 24h sem ser alimentada.</p>		
<p>Dia 6</p> <p>19h</p>	<p>Muito boa atividade, muito semelhante ao dia 6.</p> <p>Cheiro semelhante também ao dia 6, agradável e um pouco a vinagre de cidra. Estrutura após 24h já um pouco mais frágil.</p>		

<p>Dia 7</p> <p>19h</p>	<p>Muito boa atividade. Cheiro já mais acético do que o desejável. Estrutura após 24h mais frágil.</p>	
<p>Dia 8</p> <p>7h</p> <p>19h</p>	<p>Atividade continua muito semelhante. Cheiro agradável, leve e frutado, com um toque de cidra. Atividade boa como a da manhã. Cheiro semelhante.</p>	
<p>Dia 9</p> <p>7h</p> <p>19h</p>	<p>Atividade mais intensa. Cheiro continua agradável, leve e frutado, com um toque de cidra. Atividade boa, mas mais calma do que na manhã. Cheiro semelhante.</p>	
<p>Dia 10</p> <p>7h</p> <p>19h</p>	<p>Atividade mais intensa. Cheiro continuou agradável, leve e frutado, com um toque de cidra. Atividade boa e tão ativa como na manhã. Cheiro semelhante.</p>	
<p>Dia 11</p> <p>7h</p> <p>19h</p>	<p>Atividade continuou boa. Cheiro continuou agradável, leve e frutado, com um toque de cidra/cítrico. Atividade boa e talvez um pouco menos ativa do que na manhã. Cheiro semelhante. Maturação atingida.</p>	

4.2 Avaliação da evolução do pH da massa-mãe

Segundo Calvert et al. (2021), massas-mãe habitualmente utilizadas em ambiente artesanal de padaria, são mantidas à temperatura ambiente (entre 20-30°C) e começam, normalmente, com um pH próximo do neutro, que vai diminuindo de uma forma regular ao longo de 5-15 dias até atingir a maturação. Chavan & Chavan (2011b) diz-nos que o valor final de pH da massa-mãe ao atingir a maturação será entre 3,5 e 4,3.

A fim de avaliar a evolução da massa-mãe e o seu grau de maturação, determinou-se o pH em amostras recolhidas ao longo do tempo (Tabela 17).

Tabela 17 - Evolução do pH na preparação da massa-mãe de trigo Preto-amarelo. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Dia	0	2	4	7	8	9	10	11
pH	6,04±0,02 ^a	4,39±0,04 ^b	3,82±0,03 ^d	3,92±0,03 ^c	3,75±0,03 ^{cf}	3,80±0,02 ^{cf}	3,86±0,02 ^{cdfg}	3,86 ± 0,04 ^{cdfg}

Através da análise dos valores de pH obtidos, podemos ver que o pH inicial é um pouco mais baixo do que o esperado e que foi efetivamente descendo até atingir um pH final em torno de 3,8 ao 4º dia, que depois se mantém a partir daí. A partir do dia 8 deixa de haver diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de pH medidos e ficam, efetivamente, entre os valores 3,5 e 4,3 referidos na literatura por Chavan & Chavan (2011a). Os valores de pH obtidos refletem também o que é descrito nos trabalhos de vários outros autores (Boreczek et al., 2020; Van Der Meulen et al., 2007). Estes autores descrevem o processo inicial de estabilização de uma massa-mãe como sendo uma evolução em três fases (como já descrito anteriormente), que ocorre principalmente nos primeiros 4-5 dias. Mais uma vez, os valores de pH obtidos parecem refletir esta evolução ao longo do tempo, sendo que se iniciou a massa-mãe com um pH de 6,04 no dia 0 (Fase 1), ao dia 2 houve um pequeno pico de atividade, um cheiro muito forte a queijo e o pH foi já de 4,39 (Fase 2) e, por fim, no dia 4, deu-se um pico de atividade, perdeu-se o cheiro a queijo para um cheiro acético (Fase 3) e o valor de pH não tem diferenças significativas ($p > 0,05$) ao longo do tempo (embora não ficasse estável até dia 8).

4.3 Identificação dos microrganismos da massa-mãe

4.3.1 Caracterização macroscópica e isolamento de microrganismos

A fim de determinar qual a contribuição da farinha de trigo Preto-Amarelo para a microbiota da massa-mãe, realizaram-se diluições seriadas de amostras de farinha e plaquearam-se em meios seletivos.

Os resultados obtidos revelaram que o número de colónias obtido nas placas com meios seletivos foi muito baixo ou nulo, apenas se tendo observado colónias no meio YPD. Esse facto levou a concluir que os níveis microbianos seriam bastante mais reduzidos do que o esperado (Boreczek et al., 2020; L. De Vuyst et al., 2014; Ercolini et al., 2013). Assim, para as culturas seguintes, escolheu-se prosseguir apenas com os meios de YPD e YPD + CHL.

O tipo de colónias formadas nos meios plaqueados a partir da mistura de farinha e água (*Diluição* $10^{-1} \Leftrightarrow [Farinha] = 100 \text{ g/L}$) não permitiu a utilização do processo de contagem de colónias como método de contagem. As colónias apresentadas foram poucas (número geralmente inferior a vinte no total por placa e entre todos os microrganismos) e muitas apresentavam grandes dimensões (Figura 4).



Figura 4 - Típicas colónias encontradas nas primeiras culturas realizadas em meio de cultura de YPD e com uma diluição de 10^{-3} .

O mesmo resultado foi obtido para as placas elaboradas a partir da massa-mãe no dia 0 que, na prática, era uma solução muito semelhante à anterior, mas com uma proporção de farinha inferior (*Diluição* $10^{-1} \Leftrightarrow [Farinha] = 60 \text{ g/L}$). Contudo, e apesar de se observarem muitas colónias semelhantes, a concentração significativamente inferior de farinha inicial

permitiu um crescimento microbiano menor, mais lento e com menor número e colónias mais isoladas. Esse facto, tornou muito mais acessível a seleção e identificação dos microrganismos predominantes e também mais significativos para este trabalho. Na Tabela 18 encontram-se as características macromorfológicas dos microrganismos predominantes.

Tabela 18 - Descrição macromorfológica dos microrganismos predominantes, identificados com o código que lhes foi atribuído antes da sua identificação.

Microrganismo	Descrição macromorfológica
AA	Colónias de grandes dimensões, de superfície lisa e brilhante, de cor transparente esbranquiçada junto às margens irregulares e com elevação umbilicada no centro de cor amarela. Consistência viscosa.
BB	Colónias de grandes dimensões, de superfície lisa e brilhante, de cor transparente esbranquiçada, margens irregulares e com elevação convexa no centro. Consistência viscosa.
CC	Colónias de grandes dimensões, de superfície estriada e translúcida, de cor amarelada, margens irregulares e com elevação convexa no centro. Consistência viscosa.
DD	Colónias de muito pequenas dimensões, de superfície lisa e brilhante, de cor branca leitosa e contornos irregulares. Consistência cremosa.
EE	Colónias de muito pequenas dimensões, de superfície lisa e brilhante, de cor esbranquiçada transparente, contornos irregulares e elevação convexa no centro. Consistência cremosa.
FF	Colónias de pequenas dimensões, de superfície lisa e elevada, brilhante, de cor branca e contornos circulares. Consistência cremosa.
GG	Colónias de muito pequenas dimensões, de superfície lisa e pulvinada, cor branca baça e contornos circulares. Consistência cremosa.
D	Colónias de dimensões médias, de superfície lisa, cor branca ligeiramente rosada opaca e opalescente, com contornos circulares e elevação convexa no centro. Consistência cremosa.
N	Colónias de pequenas dimensões, de superfície lisa e convexa, cor branca e opaca, com contornos circulares e consistência cremosa.

No conjunto de placas dos diversos meios com a mistura inicial de farinha e água verificou-se também contaminação por vários fungos, que deverão corresponder a esporos existentes nas farinhas ou a contaminações ambientais (Anexo 1). Este facto não é surpreendente dado que, por um lado os grãos não são acondicionados através de processos controlados e, por outro, a moagem foi realizada em condições não assépticas (caseiras) o que poderá ter originado esta contaminação.

4.3.2 Identificação de Microrganismos por métodos químicos e por observação microscópica

A identificação dos microrganismos incluiu o isolamento das colónias mais significativas. A observação microscópica das mesmas foi desafiante, mesmo na ampliação de 1000x, devido às suas pequenas dimensões (Figura 5).

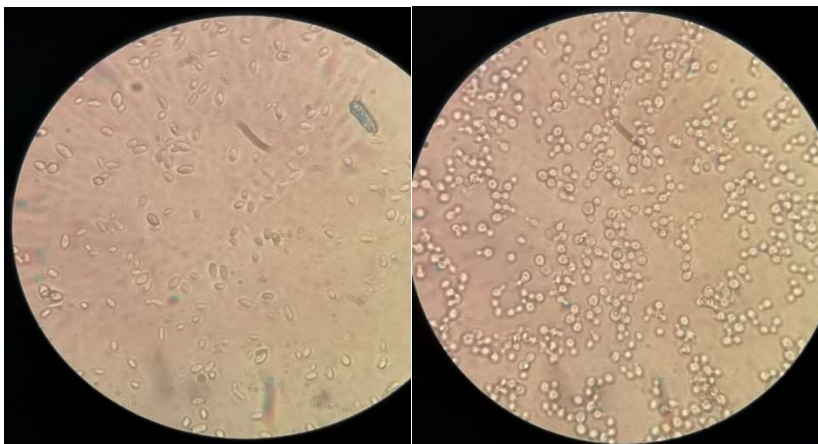


Figura 5 - Imagem microscópica das leveduras *Clavispora lusitanae* e *Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii*, respetivamente (ampliação 10 x 100x).

Assim, recorreu-se a testes bioquímicos como forma de complementar a identificação e recolher alguma informação extra que pudesse ajudar na seleção dos primers para a amplificação por PCR, nomeadamente quanto a Gram e à presença de catalase.

Em todos os organismos aeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos há produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Tendo um poderoso efeito oxidante, o H_2O_2 tem que ser degradado. Um dos principais agentes responsáveis pela degradação de H_2O_2 é a enzima catalase, que o desdobra em oxigénio e água. Assim, ao adicionar-se H_2O_2 a uma colónia de um organismo produtor de catalase, ir-se-á observar libertação visível de oxigénio livre, sob a forma de bolhas de gás.

Por outro lado, o hidróxido de potássio (KOH) rebenta facilmente as células Gram-negativas, uma vez que estas apresentam uma membrana lipopolissacarídica externa e uma camada de peptidoglicano que é degradado em condições fortemente alcalinas, expondo o conteúdo intracelular, nomeadamente o ADN, que irá conferir viscosidade à suspensão. Assim, ao ser misturado com uma amostra de colónias utilizando uma ansa de inoculação, formar-se-á um fio visível a olho nu.

Sendo as bactérias acéticas Gram-negativas e aeróbias obrigatórias, os dois testes positivos em microrganismos desconhecidos fornecem pistas importantes sobre a sua potencial natureza. Por outro lado, sendo as bactérias lácticas Gram-positivas e catalase negativas (Tamang, 2014), será de esperar resultados negativos para ambos os testes. Leveduras podem ser aeróbias obrigatórias, aeróbias facultativas ou anaeróbias obrigatórias (Visser et al., 1990) e também podem produzir catalase.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados do teste KOH e do teste de produção da enzima catalase, onde cada microrganismo está identificado pelo código que lhe foi atribuído antes da sua identificação (+ equivale a um resultado positivo e - equivale a um resultado negativo). A interpretação possível é também baseada na observação microscópica.

Microrganismo	Teste KOH	Teste Catalase	Interpretação Possível
AA	+	+	Bactéria potencialmente acética
BB	+	+	Bactéria potencialmente acética
CC	+	+	Bactéria potencialmente acética
DD	-	+	Bactéria potencialmente láctica
EE	-	+	Bactéria potencialmente láctica
FF	-	+	Bactéria potencialmente láctica
GG	-	+	Bactéria potencialmente láctica
D	-	+	Potenciais leveduras
N	-	+	Potenciais leveduras

Atendendo aos resultados obtidos identificaram-se duas colónias como correspondendo a leveduras, três colónias como correspondendo potencialmente a bactérias acéticas e quatro como podendo ser de bactérias lácticas.

4.3.3 Identificação por métodos moleculares de microrganismos presentes

Tal como discutido anteriormente para o pH, nos trabalhos de Boreczek et al. (2020) e Van Der Meulen et al. (2007), descreve-se o processo inicial de estabilização de uma massa-mãe espontânea como sendo uma evolução em três fases (como descrito em detalhe na Revisão bibliográfica), que ocorre principalmente nos primeiros 4-5 dias da sua produção. Como os valores de pH obtidos, bem como a avaliação sensorial (Calvert et al., 2021), pareceram refletir esta evolução ao longo do tempo, escolheu-se elaborar culturas para a determinação dos microrganismos nos dias 0, 2 e 11.

Tendo em conta os resultados obtidos nos testes bioquímicos, selecionaram-se os primers a usar (ITS1/ITS4 para leveduras; Ac1 e Ac3 no caso de potenciais bactérias acéticas e pH e pA no caso de potenciais bactérias lácticas). Utilizando cada um dos pares de primers selecionados, amplificou-se o ADN e sequenciou-se.

As sequências obtidas foram analisadas através do programa bioEdit e comparadas com as sequências existentes na base de dados NCBI das regiões ITS1/ITS4 de fungos e leveduras e com as sequências do ADN ribossomal 16S no caso das sequências provenientes de colónias de bactérias, através da realização de uma pesquisa com base no algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, que analisa as similaridades entre a sequência de interesse e as sequências disponíveis correspondentes. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultados do ADN extraído, amplificado e sequenciado, dias de recolha de cada amostra e código de identificação anterior à sua identificação.

Recolha da Amostra	Identificação	Microrganismo
Dia 0	D	<i>Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii</i>
Dia 0	N	<i>Clavispora lusitaniae</i>
Dia 0	AA	<i>Pantoea agglomerans</i>
Dia 0	BB	<i>Pseudomonas poae</i>
Dia 0	CC	<i>Pantoea sp.</i>
Dia 2	DD	<i>Ralstonia sp.</i>
Dia 2	EE	<i>Ralstonia sp.</i>
Dia 2	FF	<i>Ralstonia sp.</i>
Dia 11	GG	<i>Ralstonia sp.</i>

Os microrganismos identificados por sequenciação (Tabela 20) possuem as seguintes características:

- ***Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii*** – As leveduras do género *Debaryomyces* são excepcionalmente osmotolerantes, crescendo em meios com concentrações elevadas de cloreto de sódio e de glucose. Consequentemente, estas leveduras são frequentemente encontradas em alimentos doces, salgados e fermentados com alta osmolaridade (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). A levedura *Debaryomyces maramus* não é muito comum e pouco se encontra na literatura. A levedura *Debaryomyces hansenii* é, por sua vez, uma levedura heterogénea e halotolerante, muito comum na natureza (Al-Qaysi et al., 2017) com grande variedade fenotípica entre estirpes (Huang et al., 2021; Ramos-Moreno et al., 2021), capaz de crescer em condições extremas de salinidade, com baixos níveis de atividade da água e num alargado intervalo de pH entre 3 e 10 (Al-Qaysi et al., 2017). Possui baixa atividade fermentativa e grande capacidade respiratória (Ramos-Moreno et al., 2021) e é catalase positiva (González et al., 2020). Produz substâncias tóxicas para outras leveduras (Prista et al., 2016). Está presente em enchidos e outros produtos fermentados de carne (Ramos-Moreno et al., 2021), queijos (Huang et al., 2021) e massas-mãe (Chavan & Chavan, 2011b; Meroth et al., 2003).

- ***Clavispora lusitaniae*** – Levedura cosmopolita e fermentativa, que apresenta elevada halotolerância e tolerância osmótica. Possui uma elevada resistência a metais pesados e grande potencial para os remover do ambiente. Clinicamente, é reconhecida como um agente infeccioso oportunista em doentes imunodeprimidos (Pérez-Brito et al., 2015). Pode ser isolada de solos, água (espécie bastante abundante no rio Tejo (Coelho et al., 2010)), plantas, seus substratos e hospedeiros (Aibeche et al., 2021), humanos e outros animais de sangue quente, insetos, desperdício industrial e alimentos fermentados (Pérez-Brito et al., 2015). Korcari et al. (2020) isolou *Clavispora lusitaniae* de uma massa-mãe espontânea elaborada com trigo espelta.

- ***Pantoea sp./ Pantoea agglomerans*** – As bactérias do género *Pantoea* são bacilos, Gram-negativos, não-encapsulados e que não formam esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São associadas normalmente a plantas, mas podem, contudo, infetar humanos e outros animais invertebrados, sendo a *Pantoea agglomerans* a espécie mais comum em humanos. A *Pantoea agglomerans* é uma proteobactéria anaeróbia facultativa, está naturalmente presente em grãos de trigo duro (Celano et al., 2016), e foi detetada em massas-mãe por Comasio et al. (2020) e por Bessmeltseva et al. (2014). Foi também detetada, no dia 0 da produção de um *sourdough* a partir de farinha de centeio no trabalho de Rogalski et al. (2020), mas desapareceu ao final dos primeiros dias, devido à redução do pH, o que também aconteceu no trabalho de Ercolini et al. (2013).

▪ ***Pseudomonas poae*** – *Pseudomonas* são bactérias comuns Gram-negativas que se encontram naturalmente associadas a plantas e podem, nomeadamente, ser isoladas de barbas de trigo (Müller et al., 2018). *Pseudomonas poae* foi detetada em massas-mãe por Comasio et al. (2020) e no dia 1 da produção de um sourdough a partir de farinha de centeio no trabalho de Rogalski et al. (2020), mas desapareceu ao final dos primeiros dias, devido à redução do pH, o que também aconteceu no trabalho de Ercolini et al. (2013).

▪ ***Ralstonia sp.*** – As bactérias do género *Ralstonia* são bacilos Gram-negativos aeróbicos, oxidase and catálase-positivos e não fermentativos, que podem ser encontrados na água (incluindo canalizada) e nos solos (Ryan et al., 2011; Tondo et al., 2020; Waugh et al., 2010). Preferem ambientes húmidos e resistem a desinfetantes potentes, como a clorhexidina, sendo um género considerado como um agente patogénico oportunista globalmente emergente (Ryan & Adley, 2014; Waugh et al., 2010). *Ralstonia solanacearum*, quando associada aos solos pode ser causadora de uma doença infecciosa que pode afetar muitas das principais culturas de plantas (Michel & Mew, 1998). Utilizadas como microrganismos bioprotectores (juntamente com outros microrganismos) em produtos fermentados têm a capacidade de suprimir o crescimento de agentes patogénicos e toxicogénicos (Xiang et al., 2019). A *Ralstonia pickettii* foi uma das bactérias dominantes encontrada numa bebida de kombucha comercial (LEE et al., 2021). Foi também detetada *Ralstonia insidiosa*, no dia 0 da produção de um sourdough a partir de farinha de centeio no trabalho de Rogalski et al. (2020), mas desapareceu ao final dos primeiros dias, devido à redução do pH.

Pode observar-se pela breve descrição acima de cada um dos microrganismos identificados que os testes de adição de KOH e de deteção da enzima catálase (Tabela 19) foram bastante precisos nos seus resultados. Para a *Ralstonia sp.*, é muito provável que o teste de adição de KOH tenha dado negativo, muito embora estas bactérias sejam Gram-negativas, devido às pequenas dimensões das suas colónias e a dificuldade resultante em conseguir acumular biomassa suficiente para visualização apropriada do procedimento do teste.

Os microrganismos *Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii*, *Clavispora lusitaniae*, *Pantoea sp./ Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas poae* identificados no dia 0 são todos naturalmente presentes em plantas, solos e água, pelo que estão de acordo com o esperado e encontrado na literatura para os dias iniciais da produção de uma massa-mãe espontânea (Rogalski et al., 2020) ou mesmo após a sua maturação (Comasio et al., 2020; Korcari et al., 2020).

O facto de apenas se ter identificado o género *Ralstonia sp.* a partir do dia 0 foi inesperado e surpreendente, uma vez que não é uma bactéria muito documentada em alimentos fermentados pois não é fermentativa. Apesar de não se ter desenvolvido no dia 0,

há uma forte possibilidade deste microrganismo ter feito parte da microbiota da farinha de trigo Preto-amarelo. Pode também ter sido uma contaminação posterior, quer da massa-mãe em si, quer dos meios de cultura, muito embora esta última hipótese seja menos provável, uma vez que esta bactéria foi a única que se desenvolveu, quer no dia 2, quer no dia 11. *Ralstonia sp.* pode ter sido a única a colonizar os meios de cultura nos dias 2 e 11 pois poderá ter um desenvolvimento mais rápido que as restantes leveduras e bactérias presentes ou, como descrito por Xiang et al. (2019), produzir substâncias com capacidade de inibição de outros microrganismos. Pode também dar-se o caso de estarmos perante microrganismos com a capacidade de serem viáveis, mas não cultiváveis. Num estado de viabilidade não cultivável, as células, muito embora se mantenham vivas e com atividade metabólica e celular, não se reproduzem nem formam colónias em meios de cultura, o que inviabiliza a sua deteção (Liu et al., 2018; Serpaggi et al., 2012). É comum nas bactérias do género *Lactobacilli*, que são as bactérias lácticas mais comuns em massas-mãe (Calvert et al., 2021; Landis et al., 2021), terem a capacidade de entrar num estado de viabilidade não cultivável, quando em determinadas condições ambientais (Liu et al., 2018). Nomeadamente, segundo Liu et al. (2018), sabe-se que algumas das bactérias lácticas mais comuns em massas-mãe, como as *Lactocaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*), *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*) e *Lactiplantibacillus platarum* (*Lactobacillus platarum*) conseguem ser estimuladas a entrar num estado de viabilidade não cultivável. Por outro lado, Salma et al. (2013) reporta que também a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a mais comum em massas-mãe, também tem a capacidade de entrar num estado de viabilidade não cultivável. Seria altamente improvável que a *Ralstonia sp.* fosse o microrganismo mais abundante na massa-mãe, uma vez que é não fermentativo e a massa-mãe demonstrou um bom crescimento, grande acumulação de gás e capacidade de levedação de massa e produção de pão.

4.4 Análise farinográfica da farinha

Num estudo farinográfico obtêm-se os seguintes parâmetros: torque máximo (que representa o valor do pico máximo de torque atingido durante o teste), o tempo de desenvolvimento (tempo no qual é atingido o valor de torque máximo), a estabilidade (tolerância da farinha à mistura) e o abrandamento (corresponde à diferença em torque, entre o torque máximo e o torque final) (Khemiri et al., 2020).

A farinha usada para preparar os vários pães em estudo foi sempre a mesma, tendo variado o agente levedante (fermento industrial e massa-mãe obtida a partir de trigo Preto-amarelo), e também o teor de água adicionado à farinha. No presente trabalho usaram-se dois valores de absorção de água (WA) (em relação a 100 g de farinha com 14% de

humidade): um que utilizasse o máximo potencial das características tecnológicas da farinha e outro que reproduzisse melhor as quantidades utilizadas a nível de panificação artesanal. É importante salientar que, ao ser adicionada a massa-mãe à mistura, se estão a adicionar também farinha e água (apesar de estarem já fermentadas). Tal como nos trabalhos de Aplevicz et al. (2013), Di et al. (2018) e Rinaldi et al. (2015), escolheu-se não se fazerem ajustes nas quantidades de farinha e água, nas formulações em que a massa-mãe foi adicionada.

Assim, nas análises reológicas ajustou-se o teor de água até se atingir um valor próximo do valor de referência para o torque máximo de 130 mN.m (AACC 54.70-01) correspondente a uma percentagem de água de 56,25%.

Na panificação artesanal tendem a usar-se percentagens de água entre os 60% e os 75%, sendo que a escolha do valor exato reside em técnicas de análise sensorial empíricas (Calvert et al., 2021) que se realizam por utilização dos sentidos, quando se mistura a farinha com a água. Foi dessa forma encontrada a segunda percentagem de água utilizada nas formulações, 66,67%.

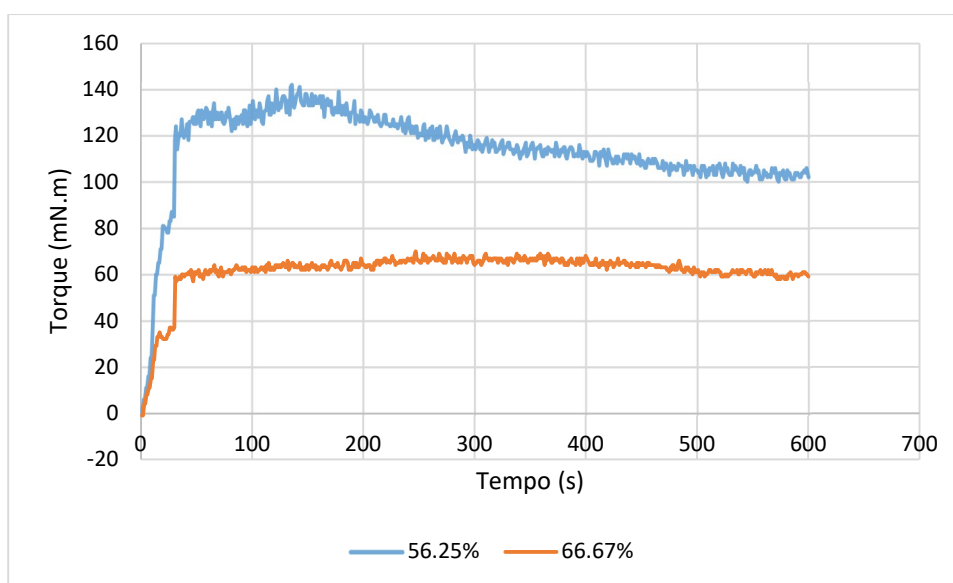


Figura 6 - Curvas obtidas no micro-doughLAB para a farinha de trigo com duas percentagens de água utilizadas (56,25% e 66,67%).

Tabela 21 - Parâmetros obtidos no micro-doughLAB para as diferentes percentagens de água (56,25% e 66,67%).

Absorção de água (WA) (%)	Torque Máximo (mN.m)	Tempo de Desenvolvimento (s)	Estabilidade (s)	Abrandamento (mN.m)
56.25	132	142	160	27
66.67	67	270	390	7

As curvas obtidas no micro-doughLAB encontram-se representadas na Figura 6 e na Tabela 21 encontram-se apresentados os parâmetros calculados a partir das curvas. Com um valor de absorção de água (WA) de 56,25% obteve-se uma massa com um pico de viscoelasticidade similar ao valor de referência (130 mN.m) para pão convencional e, com o aumento da WA para 66,67%, observou-se uma diminuição da viscoelasticidade, tal como seria expectável.

Pelos parâmetros da Tabela 21, pode observar-se que para 56,25%, o tempo de desenvolvimento é muito inferior, o que é muito desejável em panificação, principalmente com fermento de padeiro industrial, que é um processo que se deseja mais rápido. Por outro lado, e apesar do valor de torque máximo ser de apenas 67 mN.m, o valor de estabilidade é muito superior nos 66,67%, o que é o ideal para a produção de pão de fermentação natural, cujo processo é longo.

4.5 Comportamento viscoelástico linear das massas fermentadas

Na Figura 7 estão representados os resultados obtidos nos testes de varrimento de frequência efetuados para as massas fermentadas das diferentes formulações com massa-mãe e com fermento de padeiro.

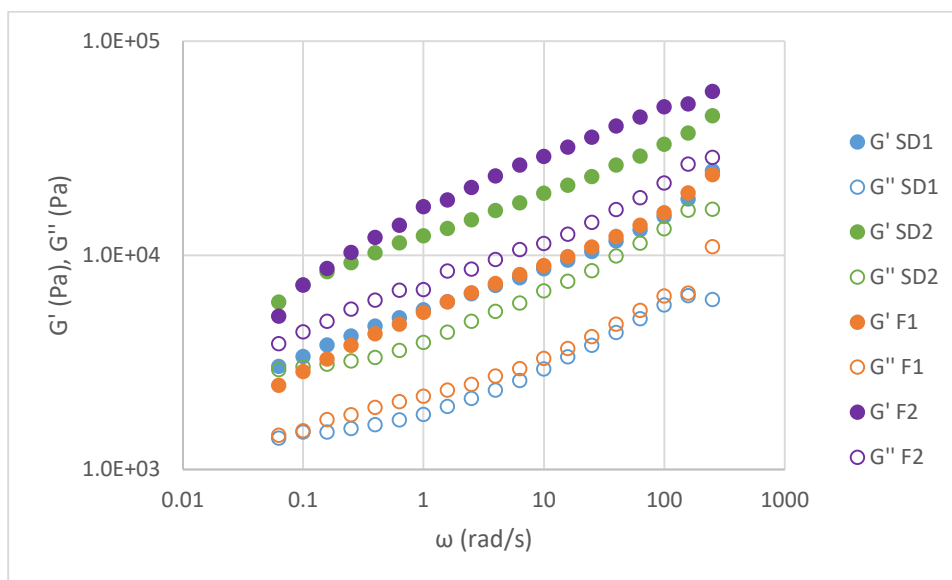


Figura 7 - Espectros mecânicos das massas fermentadas a 5°C para todas as formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).

Nos espectros mecânicos da Figura 7, obtidos para as massas de pão fermentadas com massa-mãe (SD1, SD2) e fermento de padeiro (F1, F2), encontra-se representada a variação do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') em função da frequência angular (ω).

Ao observar os resultados obtidos, pode verificar-se que os valores de G' são sempre superiores a G'' e que existe uma forte dependência da frequência, comportamento típico de massas de pão fermentadas, que são consideradas sistemas viscoelásticos (Macedo et al., 2020; Martins et al., 2020; Nunes et al., 2020). Verifica-se também que os valores de G' e G'' estão muito próximos entre si, tendo um desfasamento de menos de uma ordem logarítmica, o que nos indica que se tratam de sistemas pouco estruturados.

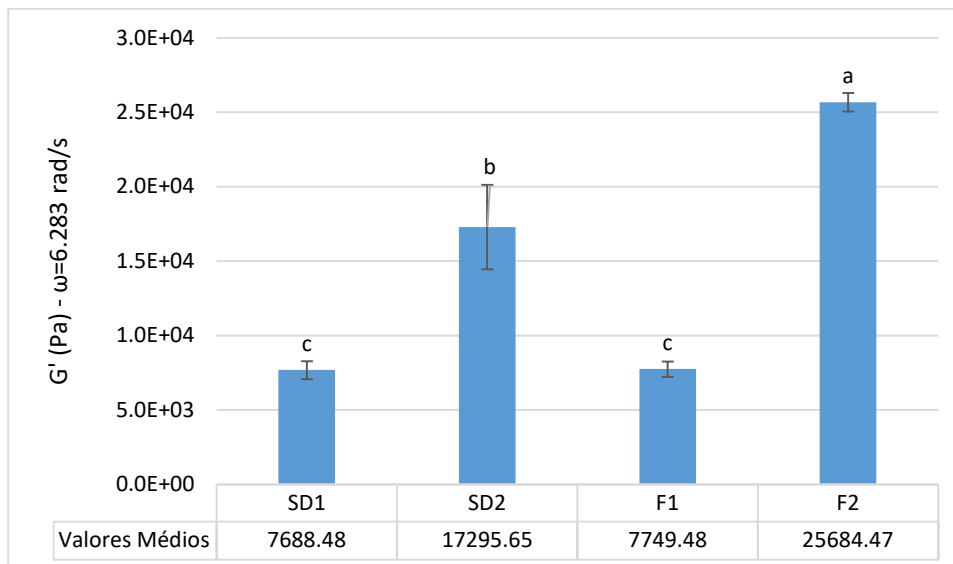


Figura 8 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 6.283rad/s (1Hz) para as massas fermentadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

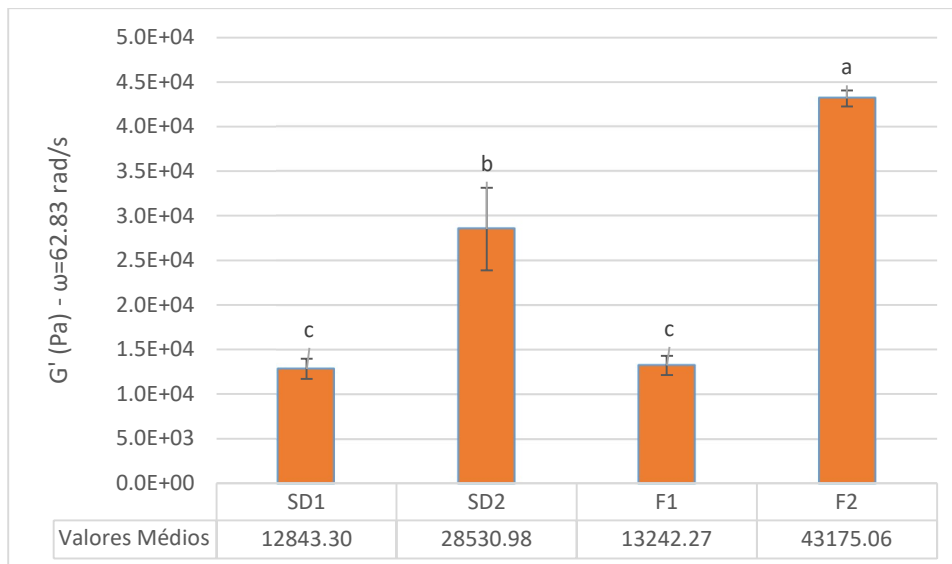


Figura 9 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 62.83rad/s (10Hz) para as massas fermentadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

A Figura 8 e a Figura 9 representam os valores do módulo elástico (G') de cada amostra de massa fermentada (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação), obtidos a partir dos seus espectros mecânicos, a duas frequências fixas (6,28 rad/s e 62,8 rad/s). Pode verificar-se que, quer a 6,28 rad/s, quer a 62,8 rad/s, não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre as formulações de SD1 e F1, sendo estas que possuem valores de G' mais baixos, correspondentes às formulações com maior teor de água (66,67%). Por outro lado, os valores de G' para as formulações de SD2 e F2 a 6,28 rad/s e a 68,2 rad/s possuem diferenças significativas entre si ($p<0,05$) e F2 é aquela que possui os valores mais elevados ($p<0,05$) de todas. Assim, para valores menores de WA (56,26%), o tipo de levedante teve impacto nas propriedades viscoelásticas da massa.

A dependência de G' e de G'' da frequência pode ser descrita pela Lei da Potência (Bernaerts et al., 2017; Fradinho et al., 2020):

$$G' = \alpha' \times f^{b'}$$

$$G'' = \alpha'' \times f^{b''}$$

Os valores de α e b são determinados através de uma regressão linear do logaritmo de G' e de G'' em função do logaritmo da frequência, onde b' e b'' são os declives e α' e α'' são calculados a partir da ordenada na origem ($\alpha' = 10^B$ e $\alpha'' = 10^B$, sendo B o valor da ordenada na origem da reta).

Tabela 22 - Valores ajustados para as equações da Lei da Potência (R^2 entre 0,9458 e 0,9968). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

Formulações	α'	b'	α''	b''
SD1	7998 ^c	0,232 ^b	2932 ^c	0,199 ^a
SD2	17777 ^b	0,233 ^{ab}	6503 ^b	0,212 ^a
F1	7782 ^c	0,254 ^a	3204 ^c	0,221 ^a
F2	24926 ^a	0,247 ^{ab}	10204 ^a	0,263 ^a

Pode observar-se pela Tabela 22 que o parâmetro α' possui um valor significativamente superior ($p<0,05$) para as amostras das formulações SD2 e F2, enquanto SD1 e F1 apresentam valores inferiores, mas sem diferenças significativas entre si ($p>0,05$). De acordo com Fradinho et al. (2020), uma maior ordenada na origem (maior α') implica um sistema mais estruturado. É efetivamente o que parece acontecer, uma vez que está de acordo com os valores obtidos para G' às frequências de 6,28 rad/s e 62,8 rad/s. Numa visão global, os valores do parâmetro b' não são muito diferentes entre si. Os valores de SD2, F1 e F2 não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$) e o mesmo acontece para SD1, SD2 e F2. O valor mais elevado ($p<0,05$) de b' é o da amostra da formulação F1, o que está de acordo com o esperado. Declives mais elevados representam uma maior dependência do seu comportamento com o tempo, sendo amostras menos estruturadas (Fradinho et al., 2020), o que acontece nas massas com maior teor de água.

4.6 Avaliação da textura das massas fermentadas

Na Figura 10 podemos observar os valores de firmeza das massas fermentadas das diferentes formulações.

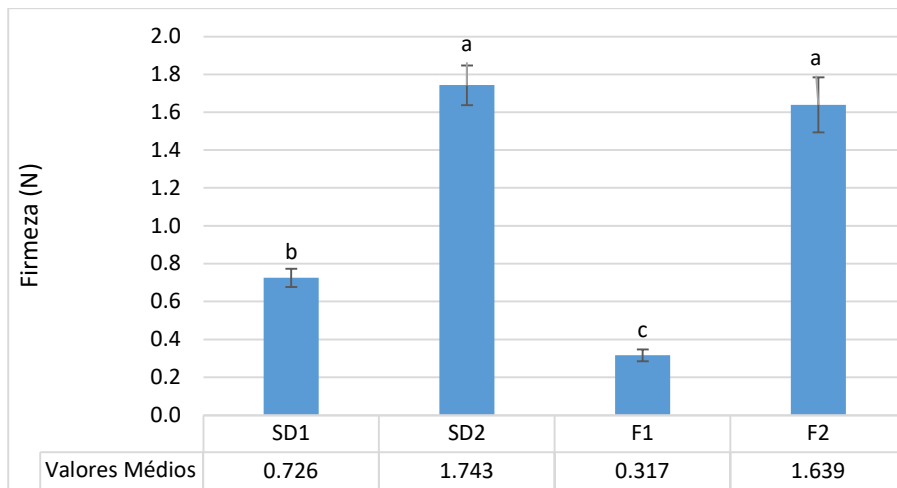


Figura 10 - Valores de Firmeza das massas com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de SD2 e F2, mas são ambas muito mais firmes ($p < 0,05$) que SD1 e F1, uma vez que têm menos água adicionada. Por sua vez, os valores de firmeza de SD1 são muito superiores ($p < 0,05$) aos de F1. As formulações de SD1 e de F1 incluem um teor de água superior ao das formulações de SD2 e F2, o que explica a firmeza muito superior ($p < 0,05$) destas últimas. Estes valores estão de acordo com os obtidos na avaliação do comportamento viscoelástico das massas uma vez que, para as massas com um teor de água superior e firmeza inferior, se obtiveram valores de módulo elástico G' mais baixos e indicadores de uma menor estruturação.

Quando comparando massas em relação ao agente levedante, nota-se que as massas fermentadas com fermento comercial apresentam firmeza inferior ($p < 0,05$) que as massas fermentadas com massa-mãe. Uma possível explicação será o facto de que o processo de fermentação com massa-mãe causa a produção de ácidos e as frações proteicas do glúten são parcialmente solúveis nestes. A atividade de enzimas proteínases de algumas espécies de bactérias ácido lácticas pode também causar hidrólise proteica, o que afeta a estrutura do glúten (Crowley et al., 2002). Assim, as massas retêm menos ar, apresentam menor volume e maior firmeza.

As amostras das formulações de SD2 e F2 foram elaboradas com um teor de água determinado laboratorialmente pela utilização do micro-doughLAB, de a forma serem obtidas as condições tecnológicas ideais para o melhor desempenho da farinha em utilização. Apesar das diferenças no agente levedante, as massas parecem ter beneficiado do teor de água encontrado e mantém iguais características ($p > 0,05$) de retenção de ar e consequente firmeza. Contrariamente, a amostra da massa da formulação SD1 exibe um valor de firmeza

significativamente superior ($p < 0,05$) a F1, o que pode ser explicado recorrendo a atributos que se refletiram no pão que dela originou.

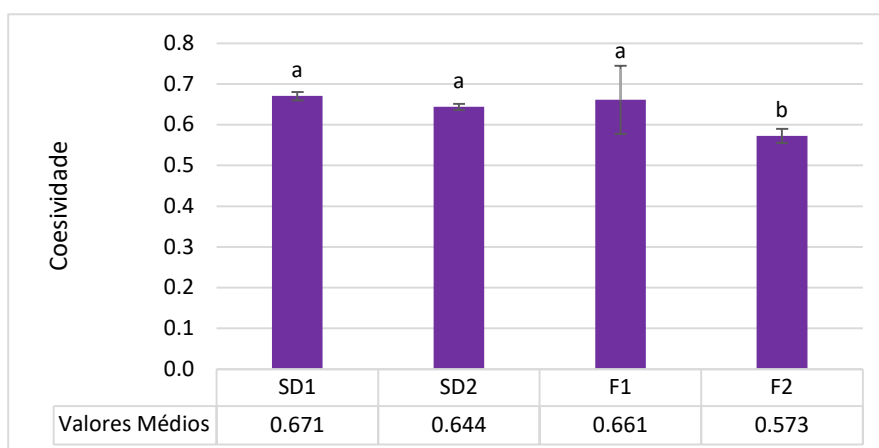


Figura 11 - Valores de Coesividade das massas das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

A coesividade está associada com o nível de estruturação entre os diferentes elementos que fazem parte da matriz da massa (Martins et al., 2020). Na Figura 11 podem observar-se os valores de coesividade das amostras das diferentes formulações. Podemos verificar que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a coesividade das massas das formulações SD1, SD2 e F1. A amostra de massa fermentada F2 é significativamente inferior ($p < 0,05$) a todas as outras.

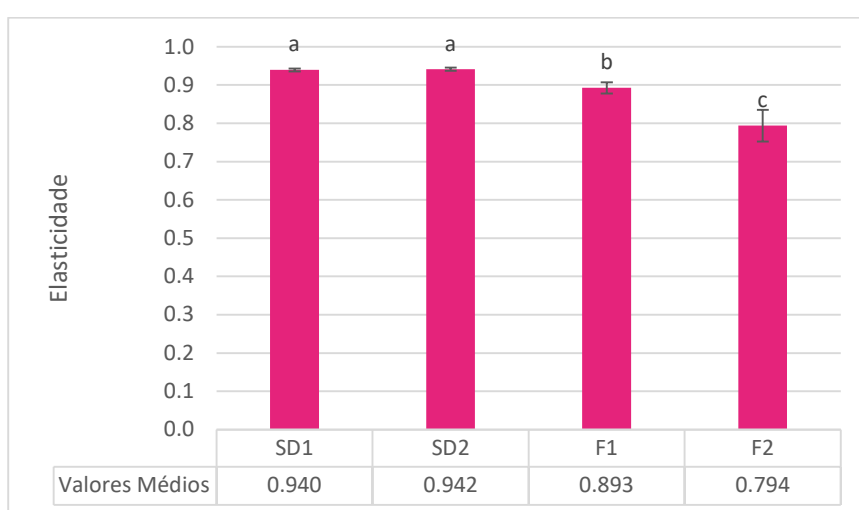


Figura 12 - Valores de Elasticidade das massas com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Como se pode observar na Figura 12, não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de elasticidade das massas fermentadas com massa-mãe, SD1 e SD2. Contudo, estas possuem um valor de elasticidade superior ($p < 0,05$) aos de F1 e F2 e, por sua vez, a elasticidade de F1 é superior ($p < 0,05$) a F2. O valor de elasticidade inferior ($p < 0,05$) da massa F2 pode ser explicada pelo seu teor de água inferior a F1. Em relação aos valores da elasticidade das formulações com massa-mãe (SD1 e SD2), a sua superioridade ($p < 0,05$) contradiz a literatura, que em Chavan & Chavan (2011b) afirma que a utilização da massa-mãe como agente levedante reduz a elasticidade das massas de pão, embora não ofereça qualquer explicação para esse facto.

4.7 Determinação do pH e acidez das massas e dos pães

Por observação cuidada dos resultados (Tabela 23), verificamos que os valores de pH para as massas fermentadas de sourdough, além de não serem significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$), estão de acordo com os valores obtidos pelos autores Boreczek et al. (2020 e Robert et al. (2006). São também muito semelhantes aos valores de pH da massa-mãe, após atingir a estabilidade. Apesar de apresentarem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), os valores de pH de F1 e F2 são da mesma ordem de grandeza e também são corroborados pelo trabalho de Park et al. (2006). Como seria de esperar, os valores de pH das massas fermentadas com massa-mãe são muito inferiores ($p < 0,05$) aos valores de pH das massas fermentadas com fermento de padeiro.

Tabela 23 - Valores de pH das massas fermentadas de cada uma das formulações estudadas (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Massa	pH
SD1	3,74 ± 0,038 ^c
SD2	3,80 ± 0,006 ^c
F1	5,21 ± 0,012 ^b
F2	5,41 ± 0,031 ^a

Os valores de acidez obtidos (Tabela 24) para amostras de massa e pão fermentadas com massa-mãe (SD1 e SD2) não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). O mesmo acontece para a comparação entre as amostras de massa e pão fermentadas com

fermento de padeiro (F1 e F2). Como seria de esperar, os valores de acidez das massas e pães fermentados com massa-mãe são significativamente superiores ($p < 0,05$) aos das massas e pães fermentados com fermento de padeiro comercial. Os valores de acidez para os pães fermentados com massa-mãe são muito próximos aos obtidos por Park et al. (2006).

Tabela 24 - Valores de acidez do pão e das massas fermentadas das diferentes formulações em estudo (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Acidez (g ácido acético / $100g$ Matéria fresca)

Formulação	Massa	Pão
SD1	0,5454 ± 0,0095 ^a	0,4001 ± 0,0263 ^a
SD2	0,5036 ± 0,0400 ^a	0,3839 ± 0,0180 ^a
F1	0,1768 ± 0,0008 ^b	0,1526 ± 0,0003 ^b
F2	0,0915 ± 0,0534 ^b	0,1342 ± 0,0022 ^b

4.8 Avaliação da textura do pão

Na Figura 13 encontram-se representados os resultados de firmeza inicial para os pães das diferentes formulações. Todos os valores são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), estão intimamente ligados ao teor em água das diferentes formulações e são inversamente proporcionais ao volume específico atingido pelos pães (Nunes et al., 2020). Os pães com menor firmeza ($p < 0,05$) são as formulações F1 e F2, que também apresentam os valores superiores ($p < 0,05$) de volume (Tabela 30). Contudo, a firmeza de F1 é significativamente inferior ($p < 0,05$) a F2, porque a sua formulação envolve um teor de água mais elevado. Os pães com maior firmeza ($p < 0,05$) são SD1 e SD2, o que está de acordo com um valor de volume específico inferior ($p < 0,05$) (Tabela 30). O valor mais elevado de firmeza ($p < 0,05$) de todas as formulações é o de SD2 que é o pão fermentado com massa-mãe, mas com teor inferior de água na sua composição.

É também claro que os pães fermentados com massa-mãe apresentam uma firmeza em muito superior ($p < 0,05$) aos fermentados com fermento comercial, independentemente do teor de água. Não se encontram na literatura explicações para estes resultados, uma vez que não existe consistência nos métodos utilizados e características comparadas. Uma possível explicação será o facto de que o processo de fermentação com massa-mãe causa a produção

de ácidos e as frações proteicas do glúten são parcialmente solúveis nestes. A atividade de enzimas proteinases de algumas espécies de bactérias ácido lácticas pode causar hidrólise proteica, o que afeta a estrutura do glúten (Crowley et al., 2002). Assim, as massas retêm menos ar e apresentam menor volume, o que também se reflete no pão resultante. Uma menor quantidade de ar retido e volume inferior resultam num pão com uma maior firmeza.

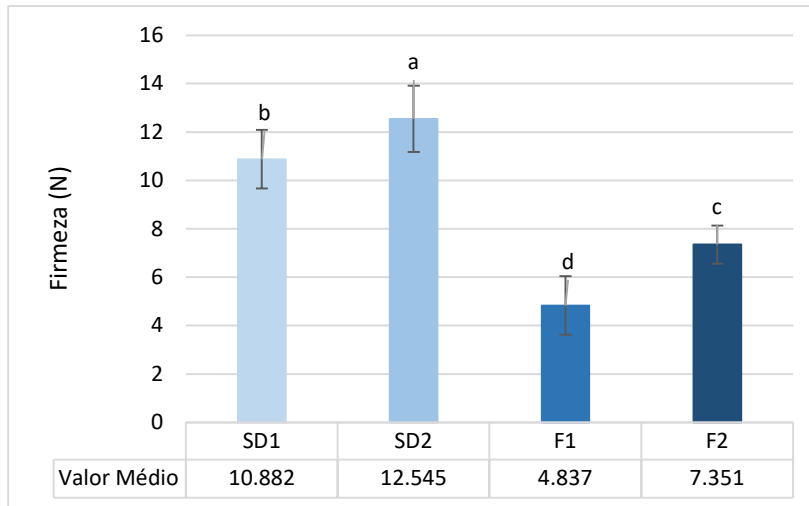


Figura 13 - Valores de Firmeza inicial (T_0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Nos valores de coesividade obtidos e apresentados na Figura 14, pode verificar-se que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os pães das formulações SD2 e F2, bem como entre SD1 e SD2. O pão que apresenta a maior coesividade ($p < 0,05$) de todas as amostras é F1.

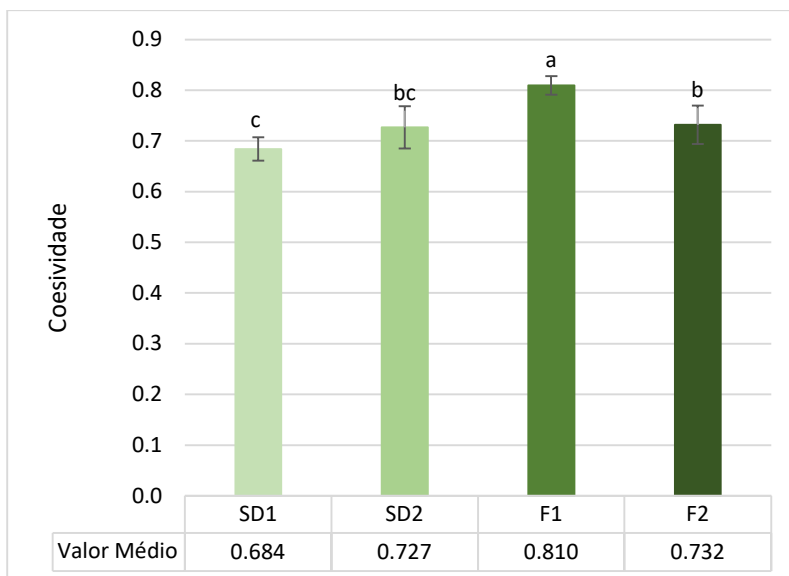


Figura 14 - Valores de Coesividade inicial (T_0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

Quanto aos valores de elasticidade, podemos observar na Figura 15 que não existem diferenças significativas entre os pães com as diferentes formulações ($p>0,05$).

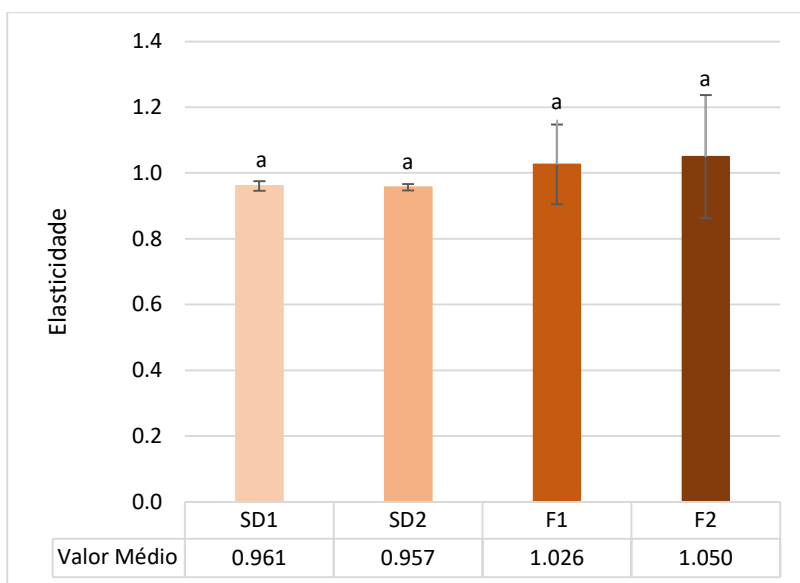


Figura 15 - Valores de Elasticidade inicial (T_0) dos pães com diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

4.8.1 Evolução da textura durante o envelhecimento do pão

A perda de flavour e textura que sucede durante o armazenamento do pão é geralmente considerada como envelhecimento (Di et al., 2018). Os fenómenos físicos e químicos que causam o envelhecimento do pão resultam da perda de humidade e da cristalização/retrogradação do amido, que causam um aumento de firmeza do miolo (Graça et al., 2020).

Neste estudo, avaliou-se a evolução da textura das amostras das formulações SD1 e F1 ao longo de 72h de armazenamento dentro de um saco plástico.

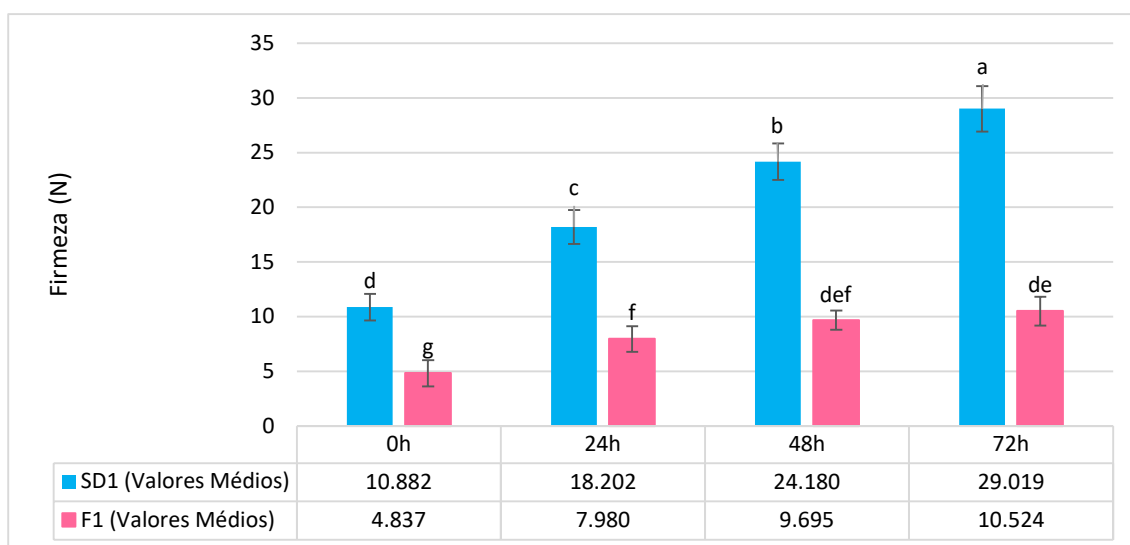


Figura 16 - Evolução da Firmeza dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

Na Figura 16 encontra-se a evolução da firmeza dos pães das formulações SD1 e F1 ao longo de um tempo de armazenamento de 72h, em intervalos de 24h. A firmeza inicial do pão da formulação SD1 é significativamente superior ($p<0,05$) à firmeza da formulação F1, e esta relação mantém-se ao longo de todo o tempo de armazenamento. Na evolução dos valores da amostra de SD1, verifica-se um aumento progressivo de firmeza ao longo das 72h. Na amostra da formulação F1, também se verifica um aumento progressivo dos valores de firmeza ao longo do tempo, mas deixa de haver diferenças significativas entre eles ($p>0,05$) entre as 48h e as 72h. Estes resultados contradizem de certa forma os resultados de Crowley et al. (2002), onde os valores de firmeza das amostras de pão fermentadas com fermento de padeiro e as fermentadas com massa-mãe têm valores muito semelhantes às 4h e às 26h. A partir das 50h, o pão fermentado com fermento de padeiro começa a apresentar valores de firmeza superiores aos da formulação com massa-mãe, e esse aumento mantém-se às 74h.

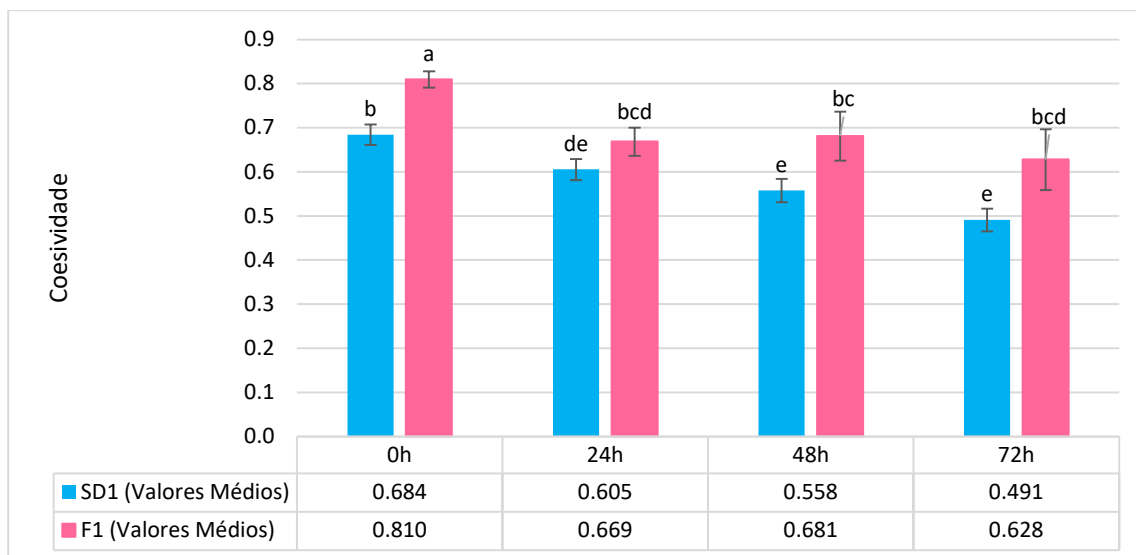


Figura 17 - Evolução da Coesividade dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0.05$).

Pode observar-se na Figura 17 que, após os valores iniciais de coesividade já discutidos anteriormente, não se verificam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as coesividades de SD1 às 24h, 48h e 72h. O mesmo se verifica para as amostras de F1. Ao longo das 72h, os valores de coesividade das amostras da formulação SD1 mantêm-se sempre superiores aos de F1 ($p < 0,05$).

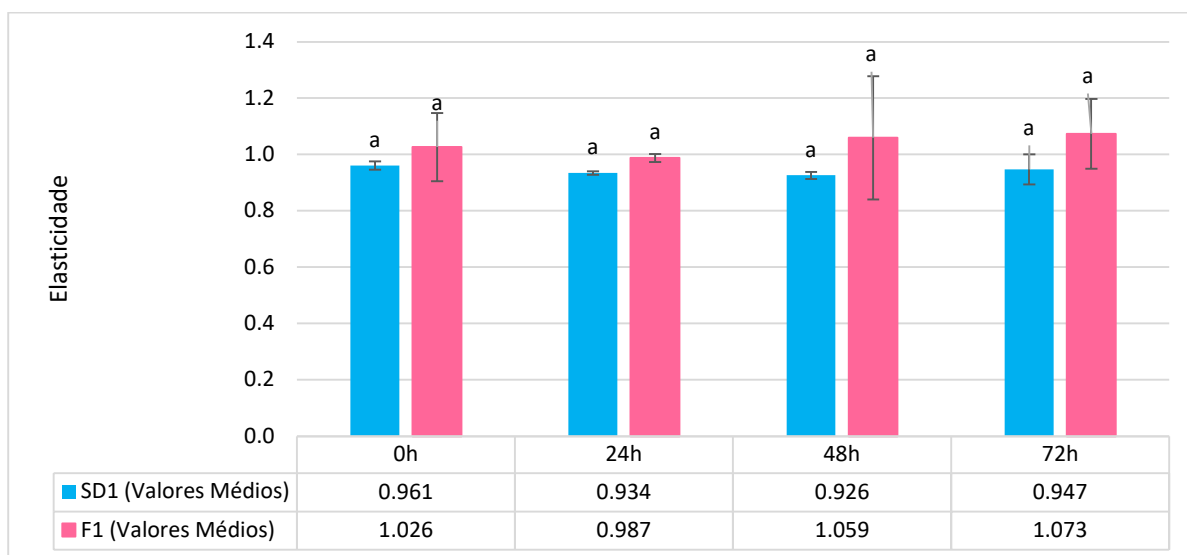


Figura 18 - Evolução da Elasticidade dos pães de formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) ao longo do tempo de armazenamento. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0.05$).

Pela Figura 18, pode verificar-se que, tal como acontece no tempo inicial deste estudo, não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de elasticidade das amostras ao longo das 72h.

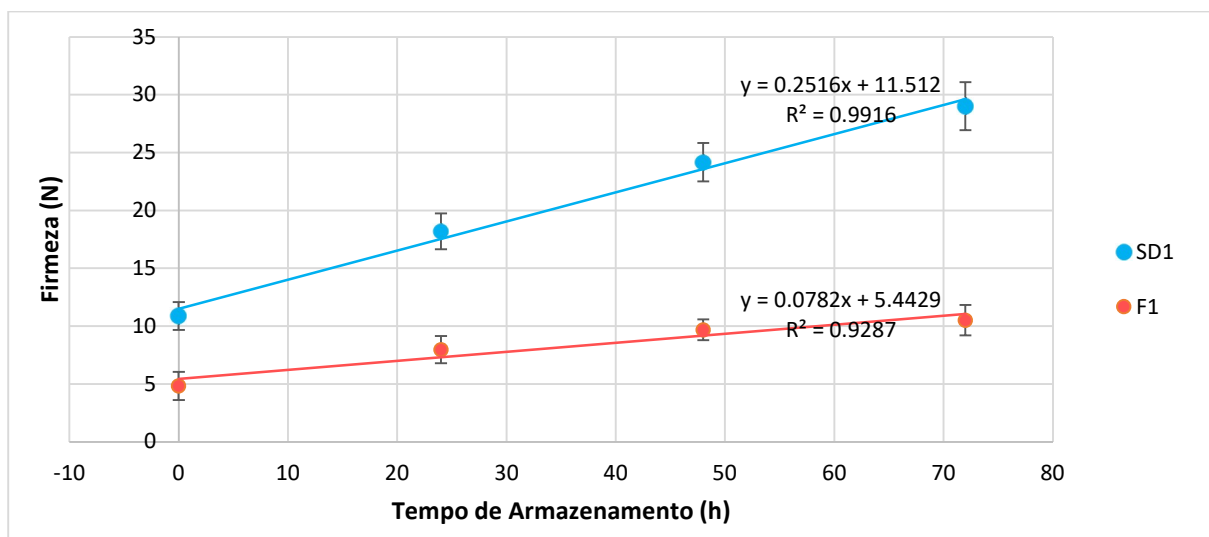


Figura 19 - Cinética de envelhecimento dos pães com as formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação).

Tabela 25 - Parâmetros da cinética de envelhecimento dos pães das formulações SD1 e F1 (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação e F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação) extraídos das regressões lineares efetuadas (A – Velocidade de Envelhecimento; B – Firmeza Inicial).

F (N) = A t(h) + B	A	B	R²
SD1	0,2516	11,5120	0,9916
F1	0,0782	5,4429	0,9287

A partir dos resultados obtidos, foi também avaliada a cinética de envelhecimento das amostra das formulações SD1 e F1 pela seguinte regressão linear, onde A é a velocidade de envelhecimento e B a firmeza inicial (Graça et al., 2019):

$$Firmeza = A \times Tempo + B$$

A regressão linear encontra-se apresentada na Figura 19 e os resultados obtidos, bem como determinação dos parâmetros mencionados acima, encontram-se na Tabela 25. Pelos parâmetros apresentados na Tabela 25, pode observar-se que, não só a firmeza do pão da formulação SD1 é muito superior à da formulação F1, também o é a sua velocidade de envelhecimento, como se pode ver pelo declive da reta da Figura 19. Não é muita a literatura

sobre o processo de envelhecimento de pão fermentado unicamente com massa-mãe produzida espontaneamente, em comparação com pão fermentado com fermento de padeiro. Em Crowley et al. (2002), já mencionado acima, não há partilha de informação sobre a velocidade de envelhecimento, mas os valores de firmeza ao longo do tempo contradizem os que se obtiveram neste estudo. Os valores de firmeza das suas amostras de pão fermentadas com fermento de padeiro e as fermentadas com massa-mãe apresentaram valores muito semelhantes às 4h e às 26h e, a partir das 50h, o pão fermentado com fermento de padeiro começou a apresentar valores de firmeza superiores aos da formulação com massa-mãe, e esse aumento mantém-se às 74h.

4.9 Medição da cor do pão

4.9.1 Cor da cõdea

A cor é um atributo muito importante num alimento e o pão não é exceção (Martins et al., 2020). A cor do pão é influenciada pelos ingredientes, bem como pelas reações que ocorrem durante o processo de cozedura. Assim, enquanto coze, e principalmente na cõdea, ocorrem reações de Maillard (açúcares redutores, aminoácidos e compostos de nitrogénio) e de caramelização (ocorre por aquecimento de hidratos de carbono e açúcares redutores) que são responsáveis pela cor castanha que se vai formando.

Na Tabela 26 e na Tabela 27 encontram-se os valores dos parâmetros da cor: coordenadas cromáticas a^* e b^* , luminosidade (L^*), saturação da cor (C^*_{ab}), tonalidade da cor (h_{ab}) e a diferença total de cor (ΔE^*), para as cõdeas dos pães.

Tabela 26 - Valores dos parâmetros L^ , das coordenadas a^* e b^* , saturação de cor (C^*_{ab}) e tonalidade de cor (h_{ab}) das cõdeas dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$).*

Formulação	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}
SD1	51,05 ± 4,57 ^c	9,14 ± 3,53 ^b	29,71 ± 2,23 ^a	31,25 ± 2,63 ^a	73,20 ± 6,13 ^b
SD2	60,65 ± 2,46 ^a	4,55 ± 1,86 ^c	25,64 ± 2,39 ^b	26,08 ± 2,63 ^b	80,18 ± 3,28 ^a
F1	55,34 ± 5,15 ^b	8,73 ± 2,16 ^b	26,77 ± 3,51 ^b	28,27 ± 3,28 ^b	71,68 ± 5,31 ^{bc}
F2	55,99 ± 3,43 ^{ab}	12,93 ± 1,61 ^a	31,15 ± 2,19 ^a	33,78 ± 1,80 ^a	67,38 ± 3,49 ^c

Tabela 27 - Valores da diferença total de cor das côdeas dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).

$\Delta E^*_{SD1,SD2}$	$\Delta E^*_{SD1,F1}$	$\Delta E^*_{SD1,F2}$	$\Delta E^*_{SD2,F1}$	$\Delta E^*_{SD2,F2}$	$\Delta E^*_{F1,F2}$
11,40	5,22	6,39	6,86	11,05	6,09

Ao observarem-se os resultados, tem-se que todos os conjuntos dos valores a^* e b^* são positivos, estando assim numa região do espectro com predominância do vermelho e do amarelo, respetivamente. A côdea com coloração mais escura, isto é, com valor de L^* mais baixo é a de SD1, seguida pelas formulações F1 e F2, que não apresentam diferenças significativas entre os seus valores ($p > 0,05$). A amostra com valor de L^* mais elevado, ou seja, com coloração mais clara, parece ser a SD2 que, no entanto, não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$) do valor de L^* de F2. Os valores de L^* para SD1 e F1 parecem estar de acordo com Rinaldi et al. (2015), que também obteve valores significativamente mais baixos ($p < 0,05$) para o pão produzido com sourdough.

Quanto à saturação de cor (C^*_{ab}) pode verificar-se que as amostras SD1 e F2 apresentam um valor significativamente ($p < 0,05$) mais elevado do que as amostras SD2 e F1, significando que apresentam uma cor mais viva.

A observação dos valores da tonalidade (h_{ab}) é muito interessante, pois verifica-se que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as duas amostras de pão elaboradas com fermento de padeiro (F1 e F2). Todos os valores médios de tonalidade (h_{ab}) se encontram entre $67,38^\circ$ e $80,18^\circ$, o que os coloca na zona do correspondente aos tons amarelos alaranjados (*Compreendendo o Espaço de Cor CIE L^*C^*h* , n.d.; MCLELLAN et al., 1995).

Os valores da diferença total de cor (ΔE^*) entre todas as diferentes formulações (Tabela 27) são todos superiores a 5 (Mokrzycki & Tatol, 2011), o que demonstra que um observador consegue identificar duas cores diferentes entre cada um deles (Figura 20).



Figura 20 - Fotografias da coeda dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação, por esta ordem).

4.9.2 Cor do miolo

Na Tabela 28 e na Tabela 29 encontram-se os valores dos parâmetros da cor: coordenadas cromáticas a* e b*, luminosidade (L*), saturação da cor (C*ab), tonalidade da cor (hab) e a diferença total de cor (ΔE^*), para o miolo dos pães.

Tabela 28 - Valores dos parâmetros L*, das coordenadas a* e b*, saturação de cor e tonalidade de cor do miolo dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Formulação	L*	a*	b*	C* _{ab}	h _{ab}
SD1	59,28 ± 2,72 ^{bc}	0,19 ± 0,14 ^b	14,41 ± 0,70 ^a	14,41 ± 0,70 ^a	89,24 ± 0,53 ^c
SD2	61,97 ± 2,77 ^{ab}	0,41 ± 0,13 ^a	13,66 ± 0,65 ^{ab}	13,67 ± 0,65 ^{ab}	88,31 ± 0,51 ^d
F1	56,91 ± 3,52 ^c	-1,05 ± 0,17 ^d	9,96 ± 1,11 ^c	10,02 ± 1,11 ^c	96,08 ± 1,17 ^a
F2	65,00 ± 2,33 ^a	-0,68 ± 0,10 ^c	13,40 ± 0,78 ^b	13,42 ± 0,77 ^b	92,91 ± 0,52 ^b

Tabela 29 - Valores da diferença total de cor do miolo dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação).

$\Delta E^*_{SD1,SD2}$	$\Delta E^*_{SD1,F1}$	$\Delta E^*_{SD1,F2}$	$\Delta E^*_{SD2,F1}$	$\Delta E^*_{SD2,F2}$	$\Delta E^*_{F1,F2}$
0,81	5,19	5,88	6,43	3,23	8,80

Os conjuntos dos valores a^* e b^* , estão numa região do espaço de cor com predominância do verde e do amarelo, respetivamente, com os valores de a^* muito próximos de zero ou negativos e os valores de b^* positivos.

Os miolos com coloração mais escura, isto é, com valor de L^* mais baixo, são os de SD1 e F1, que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). A amostra com valor de L^* mais elevado, ou seja, com coloração mais clara, é a F2 que, no entanto, não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$) do valor de L^* de SD2. Ao contrário do que seria de esperar, as amostras com maior teor de água na sua formulação (SD1 e F1), são os que possuem a coloração mais escura ($p < 0,05$). Segundo Rinaldi et al. (2015), isto pode acontecer devido à existência de buracos no miolo que podem afetar a medição instrumental.

Quanto à saturação de cor (C^*_{ab}) pode verificar-se que as amostras SD1 e SD2 apresentam um valor significativamente superior ($p < 0,05$), significando que apresentam uma cor mais viva.

Em relação aos valores da tonalidade (h_{ab}), pode verificar-se que os valores de todas as amostras são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Todos os valores médios de tonalidade (h_{ab}) se encontram entre $88,31^\circ$ e $96,08^\circ$, o que os coloca na zona do correspondente aos tons amarelos (*Compreendendo o Espaço de Cor CIE L^*C^*h , n.d.; MCLELLAN et al., 1995*).

Os valores da diferença total de cor (ΔE^*) entre todas as diferentes formulações (Tabela 29) são bastante variáveis (Figura 21). Assim, pode ver-se que entre o miolo das amostras SD1 e SD2 um observador não consegue perceber a diferença de cor, pois o valor de ΔE^* está entre zero e um. A diferença de cor entre os miolos de SD2 e F2 é já notória para um observador inexperiente, pois tem um valor entre 2,0 e 3,5. As restantes diferenças totais de cor (ΔE^*) entre as formulações (Tabela 29) são todas superior a 5 (Mokrzycki & Tatol, 2011), o que demonstra que um observador consegue identificar duas cores diferentes entre cada um deles (Figura 21).

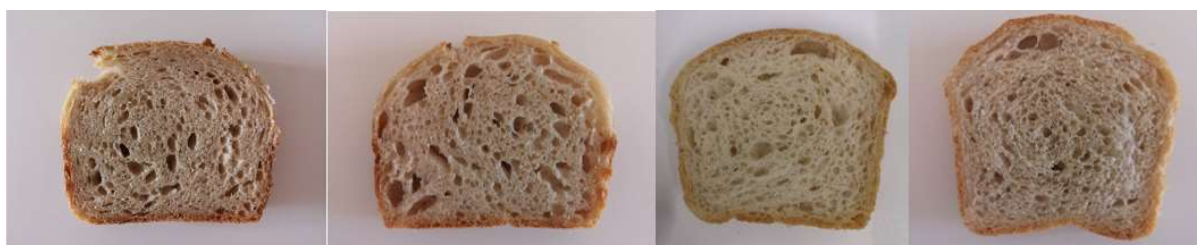


Figura 21 - Fotografias de fatias dos pães das diferentes formulações (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação, por esta ordem).

4.10 Determinação da atividade da água, do teor de humidade, das perdas durante a cozedura e do volume dos pães

Os valores da atividade da água são todos bastante elevados e próximos de 1 (Tabela 30), como é desejável. Os valores obtidos são bastante semelhantes aos medidos por Ayub et al. (2007) para pães comprados a padarias (entre 0,9425 e 0,9725), por Martins et al., (2020) para pães sem glúten com e sem incorporação de farinha de bolota (valores entre 0,949 e 0,965) e ao identificado por Luc De Vuyst et al. (2016) como valor teórico aproximado para pães de fermentação natural produzidos em padarias artesanais (valor próximo de 0,98). Os valores de a_w das amostras SD1, SD2 e F1 não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) entre si.

Em relação ao teor de humidade (Tabela 30), como seria de esperar, não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre as formulações com a mesma quantidade de água. Os valores estão também de acordo com os encontrados em outros trabalhos (Jitrakbumrung & Therdthai, 2014; Rinaldi et al., 2015).

Verifica-se que os valores de volume (Tabela 30) específico dos pães levedados com fermento de padeiro não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$) e são, por sua vez, superiores ($p<0,05$) aos dos pães fermentados com massa-mãe. Como seria de esperar, o volume específico das formulações com o mesmo teor de água é significativamente maior ($p<0,05$) para o pão levedado com fermento de padeiro, tal como se verificou no trabalho de Rinaldi et al. (2015). Os valores de volume específico dos pães fermentados com massa-mãe são muito semelhantes aos obtidos por Yezbick et al. (2013) nos seus pães enriquecidos com soja e fermentados também com sourdough ($2,2 \pm 0,1 \text{ cm}^3/\text{g}$). Curiosamente, o volume da amostra SD2 apresentou um volume superior ($p<0,05$) a SD1, apesar de ter sido produzido com um teor de água inferior. Tal diferença pode dar-se ao facto de que, sendo que todos os restantes procedimentos foram semelhantes, terá que se ter em consideração que um maior teor de água potencia atividade microbiológica (Esener et al., 1981). Assim, pode ter sido produzido um excesso de ácido acético (produzido por bactérias lácticas heterofermentativas) e conseqüente acidez, que endureceu e encurtou a rede de glúten e potenciou a sua hidrólise (Rinaldi et al., 2015) no pão SD1. O volume específico obtido para a formulação do pão F1 ($3,5 \pm 0,2 \text{ cm}^3/\text{g}$) foi muito superior ($p<0,05$) ao obtido para a formulação do pão SD1 ($1,9 \pm 0,0 \text{ cm}^3/\text{g}$) pelo que, apesar de não ter sido efetuada tal medida, pode extrapolar-se que esta diferença já existiria antes da cozedura da massa. Efetivamente, a um maior volume, correspondeu também uma massa com maior retenção de ar e, conseqüentemente, menor firmeza (Figura 10). Os valores de firmeza dos pães também corroboram esta extrapolação de resultados, uma vez que o pão SD1 é muito mais firme ($p<0,05$) que o pão F1 (Figura 13).

Os valores de perdas durante a cozedura (Tabela 30) são muito semelhantes aos apresentados noutros trabalhos, como em Graça et al. (2019). Contudo, apesar dos valores de F1 e F2 não apresentarem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), estas observam-se ($p < 0,05$) entre SD1 e SD2.

Tabela 30 - Valores de atividade da água (a_w), humidade, volume, volume específico e perdas durante a cozedura dos diferentes pães preparados (SD1 - massa-mãe e 66,67% de hidratação, SD2 - massa-mãe e 56,25% de hidratação, F1 - fermento de padeiro e 66,67% de hidratação e F2 - fermento de padeiro com 56,25% de hidratação). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Formulações	a_w	Humidade (%)	Volume (cm³)	Volume Específico (cm³/g)	Perdas durante a cozedura (%)
SD1	0,936 ± 0,016 ^a	45,83 ± 0,50 ^{ab}	945 ± 82 ^b	1,9 ± 0,2 ^c	13,0 ± 0,2 ^b
SD2	0,926 ± 0,007 ^{ab}	45,10 ± 0,69 ^b	1060 ± 42 ^b	2,2 ± 0,1 ^b	11,6 ± 0,0 ^c
F1	0,938 ± 0,015 ^a	46,72 ± 1,09 ^a	1510 ± 8 ^a	3,5 ± 0,0 ^a	13,8 ± 0,3 ^a
F2	0,917 ± 0,004 ^b	43,84 ± 0,85 ^{bc}	1380 ± 14 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	13,3 ± 0,4 ^{ab}

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Muito embora o pão de fermentação natural seja uma técnica milenar, o ecossistema de uma massa-mãe é uma cultura altamente especializada de microrganismos que determinam a qualidade, estrutura e funcionalidade do pão produzido. As práticas de fazer e usar uma massa-mãe são altamente variáveis e subjetivas, e começam a acumular-se evidências da grande variação das suas características microbianas, sensoriais e tecnológicas. Neste sentido, tentar compreender as farinhas e práticas tradicionais de gestão de uma massa-mãe e de panificação, os seus efeitos na ecologia microbiana da massa-mãe e as características sensoriais e tecnológicas do pão resultante torna-se urgente.

No presente trabalho foi possível a produção de uma massa-mãe a partir de um trigo tradicional português, o triplo Preto-amarelo, e acompanhar todo o processo até à sua maturação. Durante o desenvolvimento desta massa-mãe, mediu-se o pH e fizeram-se culturas a partir de amostras colhidas nos pontos-chave, associados às 3 fases do seu desenvolvimento.

Foi possível a identificação de duas leveduras (*Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii* e *Clavispora lusitaniae*) e três bactérias (*Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas poae* e *Pantoea sp.*) no dia 0 e bactérias do género *Ralstonia sp.* nos dias 2 e 11 do processo de produção da massa-mãe e até à sua maturação. A não identificação de *Saccharomyces cerevisiae* e de bactérias lácticas indica a possibilidade de (1) o número inicial destes microrganismos ou destes microrganismos em condições de culturabilidade ser baixo nas farinhas, tal como acontece no caso dos vinhos artesanais, e (2) de ter havido uma perda de capacidade de multiplicação durante o processo que leva a que estejam viáveis e metabolicamente ativos mas não sejam contabilizados em processos de identificação que implicam um passo de cultura e isolamento. Para obviar a esta questão e ter um conhecimento mais detalhado da microbiota envolvida, a solução poderá passar pela utilização de métodos moleculares que não implicam o crescimento prévio dos microrganismos, extraíndo o DNA total e sequenciando.

Com os estudos apresentados nesta dissertação, pode considerar-se que a panificação por métodos tradicionais com massa-mãe tem um forte impacto nas propriedades reológicas das massas e na aptidão tecnológica dos pães.

A determinação das propriedades reológicas durante a mistura da farinha de trigo utilizada e da água, analisadas no micro-doughLAB, permitiu concluir que a utilização de um maior teor de água (66,67% em vez dos 56,25% determinados no teste farinográfico como sendo a capacidade ótima de absorção de água desta farinha), determinado apenas por características sensoriais, como é comum utilizar-se em panificação tradicional, deu origem a

uma massa que não atinge o valor de referência de torque máximo para pães convencionais (67 mN.m em vez de 130 mN.m), aumentou o tempo de desenvolvimento da massa, mas também aumentou a sua estabilidade.

Os valores de pH das massas fermentadas com massa-mãe (SD1 e SD2) foram muito inferiores aos das amostras fermentadas com fermento de padeiro (F1 e F2) e com valores próximos do pH da massa-mãe. Como previsto, a acidez das massas e pães com formulações com massa-mãe foram superiores aos valores de acidez das massas e pães com formulações com fermento de padeiro.

A caracterização das massas fermentadas (massa-mãe vs levedura comercial) através do seu comportamento viscoelástico linear demonstrou que todas as massas possuem um comportamento predominantemente elástico. As massas das amostras com menor teor de água (56,25%) foram as que apresentaram maior estruturação, caracterizada por valores de módulo elástico superiores. Este facto foi também comprovado pelos valores de firmeza superiores de SD2 e F2 obtidos com recurso ao texturómetro.

A utilização da massa-mãe obtida a partir do trigo ancestral português Preto-amarelo dá origem a pães substancialmente mais firmes (com valores médios de 10,882 N para SD1 e 12,545 N para SD2 em comparação com 4,837 N para F1 e 7,531 N para F2) e com menor volume específico (com valores médios de 1,9 cm³/g para SD1 e 2,2 cm³/g para SD2 em comparação com 3,5 cm³/g para F1 e 3,3 cm³/g para F2) comparativamente com os pães levedados com fermento de padeiro, independentemente dos teores de água utilizados neste estudo. Como seria de esperar, o teor de água das massas teve um papel fulcral na textura dos pães resultantes, com as amostras com menor teor de água (56,25%, SD2 e F2) a apresentarem maior firmeza.

No estudo comparativo da cinética de envelhecimento das amostras F1 e SD1 (ambas com 66,67% de água), a amostra SD1 produzida com massa-mãe destacou-se pela firmeza muito mais elevada ao longo das 72h e uma velocidade de envelhecimento superior.

A cor da còdea de todos os pães encontra-se na região do espectro com predominância do vermelho e do amarelo e a diferença total de cor entre as amostras é superior a 5, o que indica que um observador conseguirá distingui-las. Os valores da diferença total de cor entre o miolo dos pães com massa-mãe e dos pães com fermento de padeiro são distinguíveis pelo olho humano.

O estudo da utilização de massas-mãe em panificação apresenta, contudo, várias limitações. Uma das mais marcantes é a da sua reprodutibilidade ser desafiante. Cada massa-mãe é única e as suas características microbiológicas variam no tempo ao longo da sua existência. Assim, mesmo reproduzindo em detalhe um protocolo de um determinado processo de panificação e, mesmo utilizando a mesma massa-mãe, o simples facto de ter modificado o ambiente ou o operador (e as respetivas microbiotas), poderá ter um impacto

significativo na microbiota da massa-mãe e, assim, no resultado final. Outra limitação deste tipo de estudos prende-se no facto de que todos os processos são realizados em ambiente laboratorial, que é bastante diferente das condições reais de panificação. Apesar disso, é importante realçar a importância deste estudo que, apesar das limitações, oferece indicações preciosas sobre os efeitos da utilização de um fermento composto por uma microbiota diversa, face aos da levedura comercial, e sobre os quais existem poucos trabalhos publicados.

Assim, este trabalho, não só estabelece uma forte ligação entre os Universos de investigação laboratorial e da panificação artesanal, preenchendo uma lacuna existente, como abre portas para um estudo mais amplo, talvez com uma produção mais alargada de massas-mãe espontâneas, produzidas com diferentes tipos de trigo e outros cereais, ou mesmo com incorporação de algo inesperado, como microalgas. Por fim, seria muito interessante poder fazer-se um estudo alargado e comparativo de massas e pães produzidos com as massas-mãe, incluindo testes nutricionais e de digestibilidade, reológicos (massa), de textura (massas e pães) e parâmetros de qualidade (pães).

Referências Bibliográficas

- Abdulla, A. A. (2014). *Optimization of DNA Extraction of Lactobacillus spp for Identification by tuf B gene-Based Polymerase Chain Reaction*. 4(8). www.iiste.org
- Aibeche, C., Selami, N., Zitouni-Haouar, F. E. H., Oeunzar, K., Addou, A., Kaid-Harche, M., & Djabeur, A. (2021). Bioremediation potential and lead removal capacity of heavy metal-tolerant yeasts isolated from Dayet Oum Ghellaz Lake water (northwest of Algeria). *International Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/S10123-021-00191-Z/FIGURES/5>
- Akada, R., Murakane, T., & Nishizawa, Y. (2000). Isolation of Chromosomal DNA from Yeast Cells. *BioTechniques*, 28(4), 668–674. <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/00284st02>
- Al-Qaysi, S. A. S., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A. R., & Ibrahim, J. A. A. R. (2017). Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2605382>
- Aplevicz, K. S., Singer Aplevicz, K., Ogliari, P. J., & Sant'anna, S. (2013). Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. *Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2).
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71–83. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.12.008>
- Ayub, M., Rafiq, A., Wahab, S., & Durrani, Y. (2007). Effect of water activity (aw), moisture content and total microbial count on the overall quality of buns. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 50(1), 47–50. <http://www.ijab.org>
- Barberán, A., Dunn, R. R., Reich, B. J., Pacifici, K., Laber, E. B., Menninger, H. L., Morton, J. M., Henley, J. B., Leff, J. W., Miller, S. L., & Fierer, N. (2015). The ecology of microscopic life in household dust. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1814). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2015.1139>
- Barboff, M. (2005). *Terra Mãe Terra Pão*. Âncora Editora.
- Barboff, M. (2017a). *O Pão em Portugal*. Scribe.
- Barboff, M. (2017b). *Pão das Mulheres*. Âncora Editora.
- Bernaerts, T. M. M., Panozzo, A., Doumen, V., Foubert, I., Gheysen, L., Goiris, K., Moldenaers, P., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2017). Microalgal biomass as a (multi)functional ingredient in food products: Rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing. *Algal Research*, 25, 452–463.

<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.05.014>

- Bessmeltseva, M., Viiard, E., Simm, J., Paalme, T., & Sarand, I. (2014). Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation. *PLoS ONE*, 9(4), e95449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095449>
- Blatchford, E. (2016). Is Bread really That Bad For You? *Huffington Post*. https://www.huffpost.com/archive/au/entry/is-bread-bad-for-you-_n_9093114
- Boiocchi, F., Porcellato, D., Limonta, L., Picozzi, C., Vigentini, I., Locatelli, D. P., & Foschino, R. (2017). Insect frass in stored cereal products as a potential source of *Lactobacillus sanfranciscensis* for sourdough ecosystem. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 944–955. <https://doi.org/10.1111/JAM.13546>
- Boreczek, J., Litwinek, D., Żylińska-Urban, J., Izak, D., Buksa, K., Gawor, J., Gromadka, R., Bardowski, J. K., & Kowalczyk, M. (2020). Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt, and rye wholemeal flour. *MicrobiologyOpen*, 9(4), e1009. <https://doi.org/10.1002/MBO3.1009>
- Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. Academic Press.
- Calvel, R. (2001). *The Taste of Bread*. Aspen Publishers, Inc.
- Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. In *PeerJ* (Vol. 9). PeerJ, Inc. <https://doi.org/10.7717/peerj.11389>
- Camilo, S. (2014). *Origem e disseminação dos microorganismos no vinho*. Instituto Superior de Agronomia.
- Catzeddu, P. (2011). Sourdough Breads. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (pp. 37–46). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380886-8.10004-2>
- Cauvain, S. P. (2020). Introduction and overview to breadmaking. *Breadmaking*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102519-2.00001-3>
- Celano, G., De Angelis, M., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2016). Different flour microbial communities drive to sourdoughs characterized by diverse bacterial strains and free amino acid profiles. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1770. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01770/FULL>
- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011a). Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 10, Issue 3, pp. 169–182). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>
- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011b). Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*

- Safety*, 10(3), 169–182. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2011.00148.X>
- Coelho, M. A., Almeida, J. M. F., Martins, I. M., da Silva, A. J., & Sampaio, J. P. (2010). The dynamics of the yeast community of the Tagus river estuary: testing the hypothesis of the multiple origins of estuarine yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(3), 331–342. <https://doi.org/10.1007/S10482-010-9445-1/FIGURES/5>
- Comasio, A., Verce, M., Van Kerrebroeck, S., & De Vuyst, L. (2020). Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1212. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01212/BIBTEX>
- Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h*. (n.d.). Konica Minolta. Retrieved December 18, 2021, from <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/#>
- Crowley, P., Schober, T. J., Clarke, C. I., & Arendt, E. K. (2002). The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *European Food Research and Technology* 2002 214:6, 214(6), 489–496. <https://doi.org/10.1007/S00217-002-0500-7>
- de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. (2003). *Progress in Industrial Microbiology*, 37(C), 511–513. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80066-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80066-8)
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37, 11–29. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2013.06.002>
- De Vuyst, Luc, Harth, H., Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.07.018>
- De Vuyst, Luc, Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2017). Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 49–160. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.02.003>
- Decock, P., & Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1–3), 113–120. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2004.04.012>
- Di, C., Jinshui, W., Feng, J., & Changfu, Z. (2018). Effects of Sourdough Addition on the Quality and Shelf Life of Chinese Steamed Bread. *Grain & Oil Science and Technology*, 1(2), 85–90. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1447.GOST.2018.18019>
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., & Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853.
- El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I. J. (2018). A Review on the Gluten-Free Diet: Technological and Nutritional Challenges. *Nutrients*, 10(10).

<https://doi.org/10.3390/NU10101410>

- Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., Storia, A. La, Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7827–7836. https://doi.org/10.1128/AEM.02955-13/SUPPL_FILE/ZAM999104964SO1.PDF
- Esener, A. A., Bol, G., Kossen, N. W. F., & Roels, J. A. (1981). EFFECT OF WATER ACTIVITY ON MICROBIAL GROWTH. *Scientific and Engineering Principles*, 339–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025383-1.50062-X>
- Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. *Algal Research*, 45, 101743. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101743>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., & Rizzello, C. G. (2019a). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 302(April 2018), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., & Rizzello, C. G. (2019b). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 103–113. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.05.018>
- Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2014). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, 37, 30–40. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2013.04.012>
- González, J., Castillo, R., García-Campos, M. A., Noriega-Samaniego, D., Escobar-Sánchez, V., Romero-Aguilar, L., Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevsky, C. (2020). Tolerance to Oxidative Stress in Budding Yeast by Heterologous Expression of Catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, 77(12), 4000–4015. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02237-3/FIGURES/7>
- Graça, C., Lima, A., Raymundo, A., & Sousa, I. (2021). Sourdough fermentation as a tool to improve the nutritional and health-promoting properties of its derived-products. *Fermentation*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040246>
- Graca, C., Raymundo, A., & Sousa, I. (2019). Wheat Bread with Dairy Products — Technology , Nutritional , and Sensory Properties. *Applied Sciences*, 9, 4101.
- Graça, C., Raymundo, A., & Sousa, I. (2019). Wheat bread with dairy products-technology, nutritional, and sensory properties. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(19). <https://doi.org/10.3390/app9194101>
- Graça, C., Raymundo, A., & Sousa, I. (2020). Improving the Technological and Nutritive

- Properties of Gluten-Free Bread by Fresh Curd Cheese Enrichment. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 6868, 10(19), 6868. <https://doi.org/10.3390/APP10196868>
- Howell, K., Sidari, R., Rosa, A. L., Raymond Eder, M. L., Reynoso, C., & Lauret, S. C. (2017). *Isolation and Identification of the Indigenous Yeast Population during Spontaneous Fermentation of Isabella (Vitis labrusca L.) Grape Must*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00532>
- Huang, C., Zhang, L., Johansen, P. G., Petersen, M. A., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2021). Debaryomyces hansenii Strains Isolated From Danish Cheese Brines Act as Biocontrol Agents to Inhibit Germination and Growth of Contaminating Molds. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1552. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.662785/BIBTEX>
- Jitrakbumrung, S., & Therdthai, N. (2014). Effect of addition of sourdough on physicochemical characteristics of wheat and rice flour bread. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 48(6), 964–969. https://www.researchgate.net/publication/273452618_Effect_of_addition_of_sourdough_on_physicochemical_characteristics_of_wheat_and_rice_flour_bread
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. *The Yeasts*, 1, 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Kariluoto, S., Vahteristo, L., Salovaara, H., Katina, K., Liukkonen, K. H., & Piironen, V. (2004). Effect of Baking Method and Fermentation on Folate Content of Rye and Wheat Breads. *Cereal Chemistry*, 81(1), 134–139. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.134>
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K. H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Åman, P., & Poutanen, K. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, 24(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.07.012>
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., & Autio, K. (2006). Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 479–491. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.03.013>
- Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M. C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., & Raymundo, A. (2020). Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research*, 50, 101998. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.101998>
- Kimbell, V. (2017). *The Sourdough School - The ground-breaking guide to making gut-friendly bread*. Kyle Cathie Limited.
- Korakli, M., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958–965. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2002.01607.X>

- Korcari, D., Ricci, G., Quattrini, M., & Fortina, M. G. (2020). Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 70(1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/LAM.13241>
- Laatikainen, R., Koskenpato, J., Hongisto, S. M., Loponen, J., Poussa, T., Huang, X., Sontag-Strohm, T., Salmenkari, H., & Korpela, R. (2017). Pilot Study: Comparison of Sourdough Wheat Bread and Yeast-Fermented Wheat Bread in Individuals with Wheat Sensitivity and Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/NU9111215>
- Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., Shell, L. K., Madden, A. A., Shapiro, L., Sakunala, S., Drake, K., Robbat, A., Booker, M., Dunn, R. R., Fierer, N., & Wolfe, B. E. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *ELife*, 10, 1–24. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61644>
- Lau, S. W., Chong, A. Q., Chin, N. L., Talib, R. A., & Basha, R. K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9071355>
- LEE, K. R., JO, K., RA, K. S., SUH, H. J., & HONG, K.-B. (2021). Kombucha fermentation using commercial kombucha pellicle and culture broth as starter. *Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1590/fst.70020>
- Liu, J., Deng, Y., Soteyome, T., Li, Y., Su, J., Li, L., Li, B., Shirliff, M. E., Xu, Z., & Peters, B. M. (2018). Induction and Recovery of the Viable but Nonculturable State of Hop-Resistance *Lactobacillus brevis*. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02076>
- Liukkonen, K.-H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymaki, O., Lampi, A.-M., Kariluoto, S., Piironen, V., Heinonen, S.-M., Nurmi, T., Adlercreutz, H., Peltoketo, A., Pihlava, J.-M., Hietaniemi, V., & Poutanen, K. (2003). Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 117–122. <https://doi.org/10.1079/PNS2002218>
- Lopez, H. W., Krespine, V., Guy, G., Messenger, A., Demigne, C., & Remesy, C. (2001). Prolonged Fermentation of Whole Wheat Sourdough Reduces Phytate Level and Increases Soluble Magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2657–2662. <https://doi.org/10.1021/JF001255Z>
- Macedo, C., Nunes, M. C., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Rheology methods as a tool to study the impact of whey powder on the dough and breadmaking performance of wheat flour. *Fluids*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fluids5020050>
- Martins, R. Beltrão, Nunes, M. C., Ferreira, L. M. M., Peres, J. A., Barros, A. I. R. N. A., & Raymundo, A. (2020). Impact of Acorn Flour on Gluten-Free Dough Rheology Properties. *Foods 2020, Vol. 9, Page 560*, 9(5), 560. <https://doi.org/10.3390/FOODS9050560>

- Martins, Rita Beltrão, Gouvinhas, I., Nunes, M. C., Peres, J. A., Raymundo, A., & Barros, A. I. R. N. A. (2020). Acorn Flour as a Source of Bioactive Compounds in Gluten-Free Bread. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3568, 25(16), 3568. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163568>
- McCann, T. H., & Day, L. (2013). Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.01.011>
- McGee, H. (2004). *McGee on food and cooking – An encyclopedia of kitchen science, history and culture*. Hodder & Stoughton.
- McClellan, M. R., Lind, L. R., & Kime, R. W. (1995). Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter L, a, b Data. *Journal of Food Quality*, 18, 235–240. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1995.tb00377.x>
- MCCLELLAN, M. R., LIND, L. R., & KIME, R. W. (1995). HUE ANGLE DETERMINATIONS AND STATISTICAL ANALYSIS FOR MULTIQUADRANT HUNTER L,a,b DATA. *Journal of Food Quality*, 18(3), 235–240. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4557.1995.TB00377.X>
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7453–7461. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003>
- Michel, V. V., & Mew, T. W. (1998). *Effect of a Soil Amendment on the Survival of Ralstonia solanacearum in Different Soils*.
- Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E., & Earle, J. A. P. (2000). A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, 42(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00174-3)
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2012). Influence of Artisan Bakery- or Laboratory-Propagated Sourdoughs on the Diversity of Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5328. <https://doi.org/10.1128/AEM.00572-12>
- Mokrzycki, W., & Tatol, M. (2011). Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20(4), 383–411. https://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey
- Mondal, A., & Datta, A. K. (2008). Bread baking – A review. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 465–474. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.11.014>
- Müller, T., Ruppel, S., Behrendt, U., Lentzsch, P., & Müller, M. E. H. (2018). Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads colonizing wheat heads against mycotoxin

- producing alternaria and fusaria. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2124. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02124/BIBTEX>
- Nunes, M. Cristiana, Graça, C., Vlaisavljević, S., Tenreiro, A., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Microalgal cell disruption: Effect on the bioactivity and rheology of wheat bread. *Algal Research*, 45. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101749>
- Nunes, Maria Cristiana, Fernandes, I., Vasco, I., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Tetraselmis chuii as a sustainable and healthy ingredient to produce gluten-free bread: Impact on structure, colour and bioactivity. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050579>
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Alexandraki, V., Kazou, M., Anastasiou, R., & Tsakalidou, E. (2019). Sourdough Bread. *Innovations in Traditional Foods*, 127–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00006-X>
- Park, Y.-H., Jung, L.-H., & Jeon, E.-R. (2006). Quality Characteristics of Bread Using Sour Dough. *Preventive Nutrition and Food Science*, 11(4), 323–327. <https://doi.org/10.3746/jfn.2006.11.4.323>
- Pedersen, J. C. (1992). Natamycin as a fungicide in agar media. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 58, Issue 3, pp. 1064–1066). <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.1064-1066.1992>
- Pérez-Brito, D., Magaña-Alvarez, A., Lappe-Oliveras, P., Cortes-Velazquez, A., Torres-Calzada, C., Herrera-Suarez, T., Larqué-Saavedra, A., & Tapia-Tussell, R. (2015). Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Microbiology* 2015 53:1, 53(1), 14–20. <https://doi.org/10.1007/S12275-015-4373-4>
- Pinto, A. J., Schroeder, J., Lunn, M., Sloan, W., & Raskin, L. (2014). Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. *MBio*, 5(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.01135-14/SUPPL_FILE/MBO003141850ST5.DOCX
- Poblet, M., Roze, N., Guillamo, J. M., & Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 63–67.
- Pontonio, E., Arora, K., Dingeo, C., Carafa, I., Celano, G., Scarpino, V., Genot, B., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2021). Commercial Organic Versus Conventional Whole Rye and Wheat Flours for Making Sourdough Bread: Safety, Nutritional, and Sensory Implications. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674413>
- Pontonio, E., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Dousset, X., Clément, H., Filannino, P., Onno, B., & Gobbetti, M. (2016). How organic farming of wheat may affect the sourdough and the nutritional and technological features of leavened baked goods. *International Journal of*

- Food Microbiology*, 239, 44–53. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.07.013>
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/YEA.3177>
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., & Giudici, P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), 113–117. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2003.01454.X>
- Ramos-Moreno, L., Ruiz-Pérez, F., Rodríguez-Castro, E., & Ramos, J. (2021). *Debaryomyces hansenii* Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9071512>
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
- Reese, A. T., Madden, A. A., Joossens, M., Lacaze, G., & Dunn, R. R. (2020). Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread. *MSphere*, 5(1). https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00950-19/SUPPL_FILE/MSPHERE.00950-19-SF005.TIF
- Ribeiro-Carvalho, C., Guedes-Pinto, H., Igrejas, G., Stephenson, P., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2004). High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace “Barbela.” *Annals of Botany*, 94(5), 699–705. <https://doi.org/10.1093/aob/mch194>
- Ribeiro, G., Fonseca, M., Ferreira, J., Santos, R., & Fonseca, J. (2006). Levantamento de Variedades Regionais da Península de Setúbal. In C. M. de Sesimbra (Ed.), *Ao Encontro da Semente 2006* (p. 17). Colher Para Semear – Rede Portuguesa de Variedades Tradicionais.
- Rinaldi, M., Paciulli, M., Caligiani, A., Sgarbi, E., Cirlini, M., Dall’Asta, C., & Chiavaro, E. (2015). Durum and soft wheat flours in sourdough and straight-dough bread-making. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6254–6265. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1787-2>
- Rizzello, C. G., Coda, R., Mazzacane, F., Minervini, D., & Gobbetti, M. (2012). Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Research International*, 46(1), 304–313. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.12.024>
- Robert, H., Gabriel, V., Lefebvre, D., Rabier, P., Vayssier, Y., & Fontagné-Faucher, C. (2006). Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT - Food Science and Technology*,

- 39(3), 256–265. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.01.013>
- Rogalski, E., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2020). Role of *Kazachstania humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the strain-specific assertiveness of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains in rye sourdough. *European Food Research and Technology*, 246(9), 1817–1827. <https://doi.org/10.1007/S00217-020-03535-7>
- Rubel, W. (2011). *Bread: a Global History* (1st Editio). REaktion Books.
- Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2014). *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(3), 291–304. <https://doi.org/10.1007/S10096-013-1975-9>
- Ryan, Michael P., Pembroke, J. T., & Adley, C. C. (2011). Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiology*, 11, 194. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-194>
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., & Alexandre, H. (2013). Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077600>
- Santos, M. (2016). *Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração*. Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Scotti-Campos, P., Semedo, J. N., Pais, I., Oliveira, M., Passarinho, J., & Ramalho, J. C. (2014). Heat tolerance of Portuguese old bread wheat varieties. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(2), 170–179. <https://doi.org/10.9755/EJFA.V26I2.16761>
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., & Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*, 30(2), 438–447. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.12.020>
- Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczyński, N., & Spier, M. R. (2017). Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food and Bioprocess Technology* 2017 11:2, 11(2), 242–270. <https://doi.org/10.1007/S11947-017-1968-2>
- Specter, M. (2014). Against The Grain. *The New Yorker*. <https://www.newyorker.com/magazine/2014/11/03/grain>
- Tamang, J. P. (2014). BIOCHEMICAL AND MODERN IDENTIFICATION TECHNIQUES | Microfloras of Fermented Foods. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 250–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00038-0>
- Tondo, M. L., de Pedro-Jové, R., Vandecasteele, A., Piskulic, L., Orellano, E. G., & Valls, M. (2020). KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival

- to Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.01156/FULL>
- Van Der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2007). Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4741–4750. <https://doi.org/10.1128/AEM.00315-07/ASSET/8C5ED85E-8BB5-4699-8EE6-BE7B1224C676/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0150780040008.JPEG>
- Vasconcelos, J. de C. (1933). *Trigos Portugueses ou de há muito cultivados no país* (Série 1). Serviço de Publicidade e Biblioteca da Direcção Geral da Acção Social Agrária.
- Venturi, F., Sanmartin, C., Taglieri, I., Nari, A., Andrich, G., & Zinnai, A. (2016). Effect of the baking process on artisanal sourdough bread-making: A technological and sensory evaluation. *Agrochimica*, 60(3), 222–234. <https://doi.org/10.12871/00021857201635>
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-Van Der Vegte, W. H., & Van Dijken, J. P. (1990). *Oxygen Requirements of Yeasts*. 56(12).
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van Der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., & Daniel, H. M. (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Research*, 10(4), 471–481. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2010.00621.X>
- Waugh, J. B., Granger, W. M., & Gaggar, A. (2010). Incidence, Relevance and Response for Ralstonia Respiratory Infections. *Clinical Laboratory Science : Journal of the American Society for Medical Technology*, 23(2), 99. <https://doi.org/10.29074/ascls.23.2.99>
- Weckx, S., Van Der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., & De Vuyst, L. (2010). Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5402–5408. https://doi.org/10.1128/AEM.00570-10/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_DATA.PDF
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *Pcr Protocols. A Guide to Methods and Applications* (pp. 383–406). Academic Press.
- Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2020). *Prescott's Microbiology* (Eleventh). McGraw-Hill Education.
- Wood, B. J. B. (2003). BREAD | Sourdough Bread. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 638–642). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00123-1>
- Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human*

Wellness, 8(3), 203–243. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2019.08.003>

Yezbick, G., Ahn-Jarvis, J., Schwartz, S. J., & Vodovotz, Y. (2013). *Physicochemical Characterization and Sensory Analysis of Yeast-leavened and Sourdough Soy Breads*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12246>

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.04.001>

Anexos

Anexo 1. Microrganismos presentes nas culturas iniciais.



Figura 22 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10^{-1}).



Figura 23 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10^{-1}).



Figura 24 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10⁻¹).

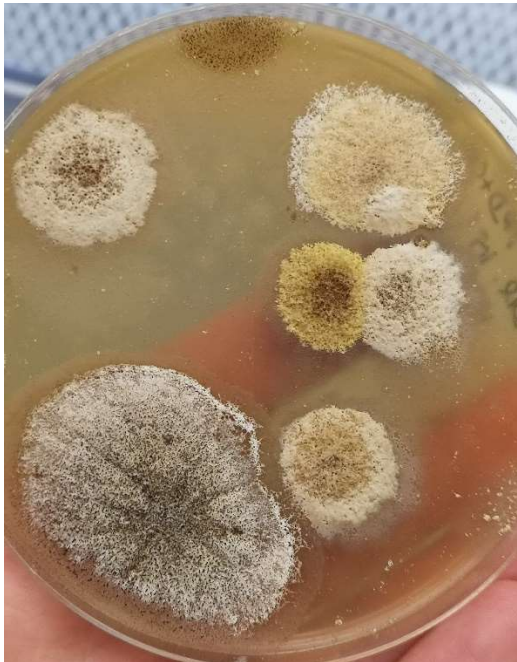


Figura 25 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10⁻¹).



Figura 26 - Fungos contaminantes da mistura de água e farinha de trigo Preto-amarelo (diluição 10^{-1}).

Anexo 2. Bandas de ADN obtidas por electroforese em gel de agarose

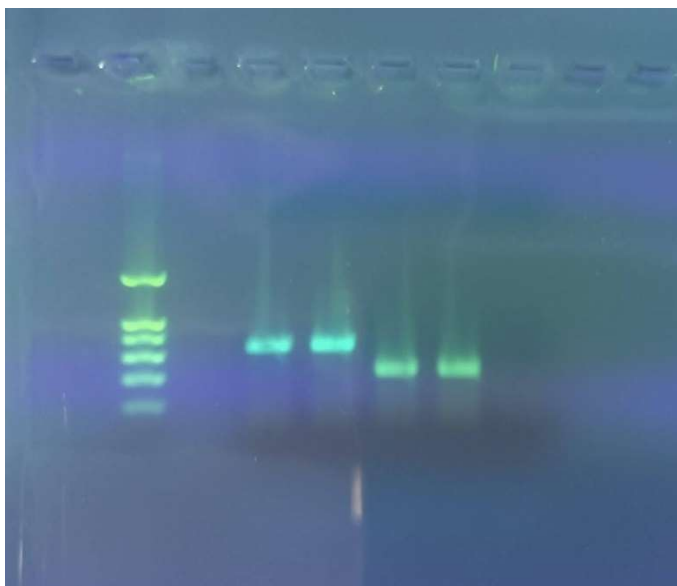


Figura 27 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado das leveduras isoladas *Debaryomyces maramus/Debaryomyces hansenii* e *Clavispora lusitaniae*, respetivamente.

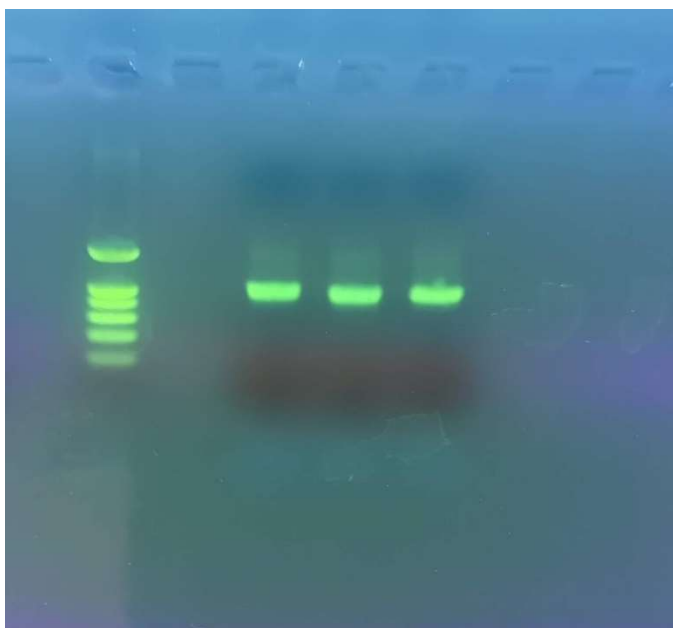


Figura 28 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado dos microrganismos isolados *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas poae* e *Pantoea sp.*, respetivamente.

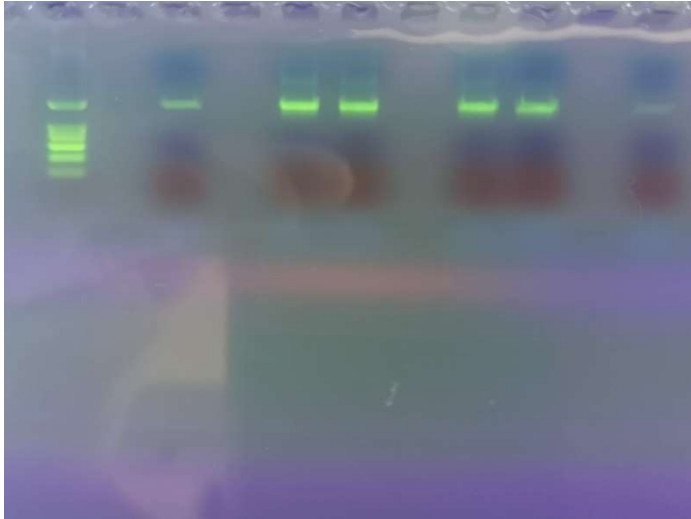


Figura 29 - Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado dos microrganismos isolados do género Ralstonia sp.