

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

GIULLIANA PETEAN TORRANO

**Desenvolvimento de levedura híbrida não-geneticamente modificada resistente ao
congelamento para massa de pão francês**

São Paulo

2022

GIULLIANA PETEAN TORRANO

Desenvolvimento de levedura híbrida não-geneticamente modificada resistente ao congelamento para massa de pão francês

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Cecilia Tadini

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 27 de maio de 2022

Assinatura do autor: Giulliana Petean Torrano

Assinatura do orientador: COO Talipiro

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

Torrano, Giulliana Petean

Desenvolvimento de levedura híbrida não-geneticamente modificada resistente ao congelamento para massa de pão francês / G. P. Torrano -- versão corr. -- São Paulo, 2022.

111 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Fermentação 2.Hibridização 3.Trealose I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Nome: TORRANO, Giulliana Petean

Título: Desenvolvimento de levedura híbrida não-geneticamente modificada resistente ao congelamento para massa de pão francês

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: 29 de março de 2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carmen Cecilia Tadini

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Pablo Daniel Ribotta

Instituição: Universidad Nacional de Córdoba

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Tatiana Guinoza Matuda Masaoka

Instituição: Instituto Mauá de Tecnologia

Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Carmen Tadini, por todas as oportunidades, por acreditar em mim e me permitir guiar esse projeto, me orientando por toda essa jornada e contribuindo para meu amadurecimento científico e pessoal. Além disso, por ser um exemplo de pesquisadora e professora, a qual admiro e me inspiro para que um dia possa ser uma profissional à altura.

Ao professor Thiago Basso, por abraçar esse projeto junto conosco e participar desde a elaboração de experimentos à discussão dos resultados e apresentação dos mesmos neste texto, se tornando meu coorientador de consideração.

À pesquisadora Thalita Basso, por toda a ajuda no planejamento e execução de parte do projeto, além da parceria nos momentos em Piracicaba.

Aos professores Adriano Azzoni e Luiz Basso, por me receberem de braços abertos em seus laboratórios.

À pesquisadora Mercedes Tamame, por todo aprendizado e acolhimento recebidos em Salamanca, assim como à rede E-COST, por aceitar a realização do meu STSM.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2013/07914-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA) da USP, por todos os momentos maravilhosos que fizeram com que essa jornada se tornasse mais leve. Em especial, ao Kaiky Amaro, por todo tempo dedicado em me ajudar na execução de experimentos e nas discussões de resultados, assim como por todo apoio nos momentos difíceis dessa jornada e toda parceria no dia a dia de laboratório.

Aos meus colegas dos outros laboratórios pelos quais passei, em especial ao Gabriel Cunha, Thamiris Giacón e Dielle Pierotti, do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (BELa) da USP, por me auxiliarem em alguns dos experimentos.

Aos meus pais, Sandra e Eduardo, por me apoiarem nessa jornada e me permitirem seguir em busca dos meus sonhos.

Ao meu namorado, Felipe Trevisan, por me apoiar e incentivar em todos os momentos dessa jornada, desde pequenos passos até a ida à Salamanca, e por dedicar parte de seu tempo para me ajudar com suas opiniões sobre o trabalho.

Aos meus primos, em especial ao Gabriel Angelini, Thalyta Petean e Tânia Attie, por serem os irmãos que eu não tive e por estarem ao meu lado em cada passo dessa jornada.

Aos meus amigos, em especial ao Thiago Trafimovas, por estar sempre ao meu lado me impulsionando cada vez mais alto no meu crescimento pessoal e profissional, e à Amanda Lanzotti, por toda a parceria na nossa jornada dentro da USP e por ter me dado o empurrãozinho necessário para que eu entrasse no mestrado e descobrisse minha verdadeira paixão.

*"[...] I won't give up
No, I won't give in till I reach the end [...]"
(Try Everything - Shakira)*

RESUMO

O congelamento da massa de pão francês, quando realizado antes da fermentação, reduz a capacidade fermentativa da levedura, resultando em um produto com menor volume específico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de levedura híbrida resistente ao congelamento, para aplicação em massa de pão francês congelada antes da fermentação. Os híbridos foram gerados pelo método esporo-esporo com a utilização de duas cepas industriais, oriundas da indústria do etanol (PE-2) e da indústria de panificação (FLE). Foram obtidos 53 haploides viáveis, dos quais 43 oriundos da PE-2 e 10 da FLE. Após as etapas de triagem e hibridização, foram obtidos quatro híbridos denominados F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42. Ao avaliar o crescimento dos híbridos em cultivo em microplaca com etapa prévia de congelamento, foi observado que os híbridos F5P33 e F5P42 apresentaram perfis de curva muito semelhantes ao da FLE, porém apenas o F5P1 apresentou velocidade específica de crescimento (μ), sem diferença estatística ($p > 0,05$) ao da FLE. Não houve alteração na curva em relação à microplaca sem etapa prévia de congelamento, portanto, tem-se um indício de que os híbridos apresentam resistência ao congelamento. No crescimento em suspensão aquosa de farinha de trigo, os híbridos responsáveis pelos maiores crescimentos das massas foram F5P1 e F5P40, com $(64,9 \pm 3,1) \%$ e $(85,0 \pm 2,4) \%$, respectivamente. Apesar de não serem equivalentes ao da FLE, foram crescimentos muito superiores aos haploides da PE-2 que os originaram, mostrando uma prevalência das características do Ha-FLE-5, haploide oriundo da FLE, nesse aspecto. Para os resultados obtidos nos cultivos em microplaca, os valores de μ e densidade ótica máxima ($DO_{\text{máx}}$) dos híbridos foram superiores aos dos dois haploides de origem. Além disso, apesar do híbrido F5P40 apresentar acúmulo de trealose quase 30 vezes inferior ao indicado como necessário para resistência ao congelamento, a altura da suspensão aquosa atingiu aproximadamente o dobro. Portanto, os híbridos F5P1 e F5P40, principalmente o F5P40, se apresentaram como possibilidade para aplicação em massas congeladas com menor suplementação de trealose, ou para aplicação de engenharia evolutiva, com o objetivo de melhorar a capacidade fermentativa em massas de pão.

Palavras-chave: Fermentação. Hibridização. Trealose.

ABSTRACT

Freezing French bread dough before its fermentation decreases the yeast fermentation capacity, which results in a bread with a low specific volume. Therefore, this work aims to develop a hybrid yeast resistant to freezing to be applied to frozen French bread dough before fermentation. The hybrids were generated by spore-to-spore mating using two industrial strains, from the ethanol industry (PE-2) and a baker's yeast (FLE). 53 haploid spores were obtained, 43 from PE-2 and 10 from FLE. A screening was made and the selected haploids were directly mated, generating four viable hybrids: F5P1, F5P33, F5P40 and F5P42. According to the frozen 96-well microplate analyses, the growth curves of F5P33 and F5P42 were similar to FLE, whereas the specific growth rate (μ), of the hybrid F5P1 was the only one that did not differ significantly ($p>0.05$) from that of FLE. The curves obtained were the same as the experiment without freezing, indicating that the hybrids are not affected by the freezing process. In the leavening capacity experiment, an aqueous suspension of wheat flour prepared with F5P1 or F5P40 achieved the highest growth, with values of $(64.9 \pm 3.1) \%$ and $(85.0 \pm 2.4) \%$, respectively. Although these heights were not equivalent to that of FLE, they were higher than those observed using haploids from PE-2, therefore these hybrids had major characteristics from Ha-FLE-5, haploid from FLE, in leavening capacity. As for the 96-well microplate grown, F5P1 and F5P40 showed higher μ and maximum optical density (OD_{max}), than both parent haploids. Moreover, although the trehalose content of the hybrid F5P40 was 30 times lower than the indicated as necessary for freezing resistance, F5P40 was able to double the height of wheat flour aqueous suspension. Therefore, there is a potential for the use of these two hybrids in frozen dough or can be applied on evolutive engineering focusing on leavening capacity.

Keywords: Fermentation. Hybridization. Trehalose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Típico pão francês brasileiro	26
Figura 2 – Estruturas das cadeias de amilose e amilopectina com indicação das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6.....	27
Figura 3 – Regiões de ação das enzimas α -amilase e β -amilase nas cadeias de amilose e amilopectina do amido da farinha de trigo	30
Figura 4 – Formação da matriz de glúten. (A) Realinhamento das cadeias de glutenina. (B) Inserção das moléculas de gliadina	31
Figura 5 – Diagrama de estado para o processo de panificação. (A) Ingredientes secos, passando do estado vítreo para o estado borracha após hidratação. (B) Durante a etapa de assamento. (C) Após o assamento	35
Figura 6 – Esquema das possibilidades de congelamento no processo de produção do pão-francês. Os quadrados com linha contínua representam o processo padrão sem congelamento	37
Figura 7 – Cruzamento entre haploides de tipos sexuais diferentes para formação do zigoto e, na sequência, o diploide a/α	44
Figura 8 – Métodos de hibridização. (A) Cruzamento esporo-esporo. (B) Cruzamento raro. (C) Fusão de protoplasto.....	45
Figura 9 – Esquema das etapas realizadas nesse trabalho	46
Figura 10 – Esquema das etapas de seleção dos haploides e da caracterização dos híbridos...49	
Figura 11 – Exemplo de uma curva obtida no programa em Python onde é possível observar os pontos utilizados para o ajuste de um modelo linear.....	50
Figura 12 – Foto de uma microplaca montada para o experimento de resistência ao congelamento com microplaca com etapa prévia de congelamento.....	52
Figura 13 – Esquema do arranjo experimental para o teste de capacidade fermentativa após o congelamento. O esquema representa uma visão da estufa, com as duas réguas fixadas nas laterais e os tubos contendo as suspensões.....	53
Figura 14 – Microscópio Scope A1 AXIO da Carl Zeiss com micromanipulador acoplado. (A) Microscópio completo. (B) Agulha de fibra de carbono utilizada para fazer as separações....	54
Figura 15 – Curva de crescimento da cepa parental FLE em meio YPD10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de glicose.....	56

Figura 16 – Curva de crescimento da cepa parental FLE em meio YPM10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de maltose.....	58
Figura 17 – Curva de crescimento da cepa parental PE-2 em meio YPD10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de glicose.....	59
Figura 18 – Curva de crescimento da cepa parental PE-2 em meio YPM10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de maltose.....	60
Figura 19 – (A) Exemplo de decantação da farinha, inviabilizando a realização do experimento. (B) Duas configurações de hélices construídas para homogeneizar a suspensão dentro dos tubos.....	62
Figura 20 – Experimento de capacidade fermentativa da FLE, sem congelamento. (A) Início do experimento. (B) Após 80 min de fermentação.....	62
Figura 21 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo para a FLE, sem congelamento, e a PE-2, medida durante o experimento de capacidade fermentativa	63
Figura 22 – Foto tirada no microscópio (CH-2, Olympus, Japão), com a lente objetiva 100x, onde é possível ver a formação das tétrades.....	64
Figura 23 – Placa contendo esporos da PE-2 após 72 h de crescimento	64
Figura 24 – Placa para realização do teste de identificação sexual contendo <i>tester</i> MAT α e esporos da PE-2	65
Figura 25 – Curvas de crescimento em YPD20 dos haploides selecionados após a primeira triagem por microplaca.....	66
Figura 26 – Curvas de crescimento em YPM10 dos haploides selecionados após a primeira triagem por microplaca em YPD20.....	68
Figura 27 – Curvas de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplaca com etapa prévia de congelamento e descongelamento	69
Figura 28 – Curva de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplacas com etapa prévia de congelamento, e posterior descongelamento, ao longo de 5 h.....	70
Figura 29 – Curva de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplaca, linearizada na fase exponencial	71
Figura 30 – Cinéticas de crescimento dos haploides em microplaca em YPD20, com presença ou ausência da etapa prévia de congelamento	72

Figura 31 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, adicionada da FLE e dos haploides após submetidos ao congelamento e descongelamento	73
Figura 32 – Experimento de capacidade fermentativa do Ha-FLE-5, após congelamento. (A) Início do experimento, com a suspensão lisa e homogênea. (B) Após 60 min de experimento, com um aumento significativo da altura.....	74
Figura 33 – Fotos obtidas no microscópio (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha) com lente objetiva de 100x dos zigotos formados. (A) Início da formação dos zigotos. (B) Após 15 min. (C) Após 30 min	77
Figura 34 – Fotos obtidas em microscópio (CH-2, Olympus, Japão) com lente objetiva de 100x contendo células dos haploides e dos seus respectivos híbridos. (A) Híbrido F5P1 e seus haploides. (B) Híbrido F5P33 e seus haploides. (C) Híbrido F5P40 e seus haploides. (D) Híbrido F5P42 e seus haploides	78
Figura 35 – Curva de crescimento da FLE e dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, cultivados em YPD20 em microplaca.	79
Figura 36 – Curva de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os haploides utilizados para sua geração, cultivados em YPD20 em microplaca	80
Figura 37 – Curva de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, após o congelamento, cultivados em YPD20 em microplaca, em comparação a curva da FLE, não submetida ao congelamento.	82
Figura 38 – Curvas de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os respectivos haploides utilizados para o cruzamento em YPD20 em microplaca após congelamento	83
Figura 39 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, dos híbridos e seus respectivos haploides.....	85
Figura 40 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, da FLE (sem congelamento) e dos híbridos, após congelamento, utilizados como fermento.....	86
Figura 41 – Crescimentos máximos da FLE, após 80 min de fermentação, e dos híbridos F5P1 e F5P40, após 90 min de fermentação	87
Figura 42 – Crescimentos máximos da FLE, após 80 min de fermentação, e dos híbridos F5P33 e F5P42, após 60 e 90 min de fermentação, respectivamente	88

Figura 43 – Curvas de crescimento dos híbridos em microplaca com e sem etapa prévia de congelamento.....	89
Figura B1 – Curvas de crescimento das cepas parentais PE-2 e FLE e dos seus haploides obtidas em YPD20.....	110
Figura B2 – Curvas de crescimento das cepas parentais PE-2 e FLE e dos seus haploides obtidas em YPM10.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados.....	47
Tabela 2 – Valores da produção e porcentagem de conversão de etanol das cepas parentais PE-2 e FLE cultivadas em meio YPD10 e YPM10.....	61
Tabela 3 – Valores da produção de massa secas das cepas parentais PE-2 e FLE em meio YPD10 e YPM10.....	61
Tabela 4 – Valores de μ e $DO_{m\acute{a}x}$ em YPD20 das cepas selecionadas na primeira triagem por microplaca.....	67
Tabela 5 – Valores de μ e $DO_{m\acute{a}x}$ em YPM10 das cepas selecionadas na primeira triagem por microplaca em YPD20.....	68
Tabela 6 – Crescimentos máximos e seus respectivos tempos da FLE e dos haploides.....	74
Tabela 7 – Concentração de trealose intracelular medida dos haploides após cultivo em YPD50.....	75
Tabela 8 – Etapas de identificação e seleção dos haploides para utilização no processo de hibridização.....	76
Tabela 9 – Valores de μ e de $DO_{m\acute{a}x}$ da FLE e dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, obtidos em cultivo em YPD20 em microplaca.....	79
Tabela 10 – Valores de μ e de $DO_{m\acute{a}x}$ da dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, e seus respectivos haploides, obtidos em crescimento em YPD20 em microplaca.....	81
Tabela 11 – Valores de μ e de $DO_{m\acute{a}x}$ dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os respectivos haploides utilizados para o cruzamento obtidos em cultivo em microplaca com etapa prévia de congelamento.....	84
Tabela 12 – Valores máximos de crescimento após congelamento e seus respectivos tempos medidos dos haploides e seus respectivos híbridos.....	84
Tabela 13 – Crescimentos máximos e seus respectivos tempos da FLE, sem congelamento, e dos híbridos.....	87
Tabela 14 – Concentração de acúmulo de trealose intracelular dos haploides e seus respectivos híbridos, medidos após crescimento em YPD50.....	88
Tabela A1 – Dados obtidos no experimento para a identificação do tipo sexual dos esporos da PE-2 e da FLE	103

Tabela A2 – Valores de μ e $DO_{m\acute{a}x}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPD20 de todas as cepas estudadas.....106

Tabela A3 – Valores de μ e $DO_{m\acute{a}x}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPM10 de todas as cepas trabalhadas.....108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIP	Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COST	Do inglês <i>European Cooperation in Science & Technology</i>
CSL	Estearoil-2-lactil Lactato de Cálcio
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DATEM	Monoglicérides de ésteres de ácido tartárico diacetilado
ESALQ	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
FB-FB	Do inglês <i>Fully Baked Frozen Bread</i>
FD	Do inglês <i>Frozen Dough</i>
FLE	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> utilizada para panificação
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
P-FD	Do inglês <i>Pre fermented Frozen Dough</i>
PB-FB	Do inglês <i>Part-Baked Frozen Bread</i>
PE-2	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> isolada da produção de etanol
PIB	Produto Interno Bruto
PS80	Polisorbato
SSL	Estearoil-2-lactil lactato de Sódio
STSM	Do inglês <i>Short Term Scientific Mission</i>
YPD	Extrato de Levedura, Peptona e Glicose
YPM	Extrato de Levedura, Peptona e Maltose

LISTA DE SÍMBOLOS

DO	Densidade Ótica	[-]
$DO_{máx}$	Densidade Ótica máxima	[-]
H_0	Altura da suspensão aquosa de farinha de trigo no tempo 0	[cm]
H_t	Altura da suspensão aquosa de farinha de trigo no tempo t	[cm]
t	Tempo	[h]

LISTA DE SÍMBOLOS GREGOS

λ	Tempo de duração da fase <i>lag</i>	[h]
μ	Velocidade específica de crescimento	[h ⁻¹]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	24
2.1	Etapas.....	24
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	Mercado de panificação	25
3.2	Características e composição da massa	25
3.2.1.	Farinha de trigo	26
3.2.2.	Água	28
3.2.3.	Sal.....	28
3.2.4.	Fermento.....	28
3.2.5.	Açúcar	29
3.2.6.	Demais ingredientes adicionados	29
3.3	Processo de panificação	30
3.3.1.	Mistura e amassamento	31
3.3.2.	Descanso.....	32
3.3.3.	Divisão e modelagem	32
3.3.4.	Fermentação	32
3.3.5.	Assamento	33
3.4	Congelamento	35
3.4.1.	Variedades de massa congelada	36
3.4.2.	Taxa de congelamento e armazenamento.....	38
3.5	Leveduras.....	40
3.5.1.	Hibridização	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Cepas utilizadas	46
4.1.1.	Meios de cultivo	47

4.1.2. Preparação do inóculo	48
4.1.3. Manutenção das cepas e geração do estoque	48
4.2 Caracterização fisiológica das cepas	48
4.2.1. Curvas de crescimento	49
4.2.2. Quantificação dos metabólitos	50
4.2.3. Massa seca.....	51
4.2.4. Trealose	51
4.2.5. Resistência ao congelamento em cultivo em microplaca.....	51
4.2.6. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo	52
4.3 Esporulação e hibridização	53
4.3.1. Dissecação das tétrades	53
4.3.2. Identificação do tipo sexual dos haploides.....	54
4.3.3. Formação dos híbridos	54
4.4 Análise estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Cepas parentais	56
5.1.1. Curva de crescimento e quantificação de metabólitos	56
5.1.2. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo	61
5.1.3. Acúmulo de trealose.....	63
5.2 Haploides	64
5.2.1. Curva de crescimento em microplaca	66
5.2.2. Resistência ao congelamento e capacidade fermentativa.....	69
5.2.3. Acúmulo de trealose.....	75
5.2.4. Hibridização	76
5.3 Híbridos	77
5.3.1. Curva de crescimento em microplacas	78
5.3.2. Resistência ao congelamento e capacidade fermentativa.....	81

5.3.3. Acúmulo de trealose.....	88
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A	103
APÊNDICE B.....	110

1 INTRODUÇÃO

O setor de panificação, um dos mais representativos do mercado brasileiro, apresentou em 2020, um faturamento de R\$ 91,94 bilhões e foi responsável pela movimentação de cerca de 1,22 % do PIB nacional. Esses números são significativos, visto o avanço da pandemia de COVID-19 e a recessão econômica que o país enfrentou (ABIP, 2021). Dentro desse setor, o pão francês é responsável por 45 % do volume vendas que ocorrem nos mercados e padarias, sendo, portanto, o produto de maior relevância (ABIP, 2020; ABIP; ITPC; SEBRAE, 2017).

Para produzir pão francês são necessários diversos ingredientes, dentre os quais a farinha de trigo, a água, o sal e o fermento biológico desempenham papéis fundamentais. A farinha de trigo e a água, após o devido fornecimento de energia, formam a rede de glúten, responsável pela elasticidade e extensibilidade da massa, necessárias para que o pão cresça e mantenha sua estrutura (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007; GOESAERT et al., 2005). Já o fermento, que compreende a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é responsável pelo crescimento da massa por meio da fermentação, liberando gás carbônico no meio (CAUVAIN; YOUNG, 2007). Sendo assim, tem grande participação no volume específico do produto.

O congelamento é uma técnica que vem sendo muito utilizada, visando maior tempo de conservação dos produtos, assim como maior conveniência e rápida resposta às demandas dos consumidores (OMEDI et al., 2019). No congelamento do pão francês, que pode ocorrer em diversas etapas de seu processo de produção, tem-se diferentes benefícios e possíveis desafios. Por exemplo, ao congelar o pão após um pré-assamento, há a garantia da estrutura já formada, porém, há a necessidade de um rigoroso controle de temperatura para que a casca se mantenha intacta, devido ao maior volume e à maior sensibilidade às mudanças de temperatura. Por outro lado, ao congelar a massa antes da fermentação, tem-se um produto com menor volume específico devido aos danos causados na levedura, causando uma perda da sua capacidade fermentativa, além daqueles na própria rede de glúten. Com isso, uma solução adotada na indústria é a adição de uma maior quantidade de levedura, acarretando um maior custo no processo (OMEDI et al., 2019).

Dentro desse panorama, uma das possibilidades para inovação no setor é o melhoramento da levedura, tornando-a resistente ao processo de congelamento, para que não ocorra perda de sua capacidade fermentativa após o processo de congelamento e descongelamento. Para isso, técnicas de hibridização podem ser utilizadas, buscando pelas características desejadas em leveduras já conhecidas (KROGERUS et al., 2017). Dentre as

técnicas, é possível gerar um híbrido que não seja um organismo geneticamente modificado, o que é uma característica desejável no setor de alimentos (KROGERUS et al., 2017).

O desenvolvimento de leveduras híbridas encontra-se em ascensão, pois apresenta um potencial promissor para melhorias nos processos industriais com a geração de cepas mais resistentes à diversos estresses (BENDIXSEN; FRAZÃO; STELKENS, 2022). Além disso, com o avanço das técnicas de biologia molecular, constatou-se que a maioria das leveduras industrialmente utilizadas são híbridos naturalmente formados entre as cepas presentes no meio de produção, proporcionando um aumento em sua complexidade e à resistência às condições do processo (LOPANDIC, 2018). A utilização de leveduras híbridas já é adotada no setor de cervejas e vinhos para a obtenção de novos sabores e aromas (BELLON et al., 2011, 2013, 2015; HART; JOLLY; NDIMBA, 2019; HEBLY et al., 2015; KANTER et al., 2020; KROGERUS et al., 2015; MERTENS et al., 2015; RESTUCCIA et al., 2011; WINANS, 2022).

Recentemente, com o crescimento do consumo de pães feitos com *massa madre*¹ e a utilização de novas leveduras, o desenvolvimento de híbridos tornou-se uma possibilidade no setor de panificação (CHIVA et al., 2014). Na literatura, existem dois trabalhos com a utilização de leveduras híbridas em panificação, sendo um híbrido entre as espécies *S. mikatae* e *S. cerevisiae* para massa fresca (ODA et al., 2020), e entre *S. cerevisiae* e outras espécies, como *S. eubayanus*, *S. jurei* e *S. arboricola* para massa congelada (MAGALHÃES et al., 2021). No primeiro caso, apesar do pão apresentar bom desenvolvimento, apresentou aroma e sabor diferente do convencional, enquanto para o segundo, pode haver complicações do ponto de vista do processo, por serem cepas que não são utilizadas industrialmente.

Em 2020, a eCOST (*European Cooperation in Science & Technology*), por meio de uma rede de colaboração científica chamada *Sourdomics*, realizou diversos STSMs (*Short Term Scientific Mission*) relacionados a *massa madre*, visando o estudo de novos bioprocessos para o desenvolvimento de alimentos mais sustentáveis e saudáveis, como por exemplo, a utilização de novas leveduras. Dentre os STSMs oferecidos, a participação no “*Technological properties of novel yeast hybrids for bread and wine fermentations*”, realizado no Instituto de Biologia Funcional e Genômica da Universidade de Salamanca em março de 2020, também motivou a utilização de híbridos neste trabalho.

Portanto, a utilização de cepas industriais para o desenvolvimento de levedura híbrida resistente ao congelamento não geneticamente modificada para a produção de massa de pão

¹ Massa na qual ocorre fermentação natural feita pela própria microbiota da farinha, sendo posteriormente utilizada em substituição ao fermento nos produtos de panificação.

francês congelada antes da fermentação se apresenta como uma possibilidade de inovação no setor de panificação.

2 OBJETIVO

Esse trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de leveduras híbridas por meio do método esporo-esporo para utilização em massa de pão francês congelada, visando uma fermentação e desenvolvimento de massa similar ao processo padrão sem congelamento.

2.1 Etapas

Para atingir o objetivo, as seguintes etapas foram realizadas:

- I. Caracterização das cepas parentais;
- II. Esporulação;
- III. Seleção dos haploides com características desejáveis;
- IV. Desenvolvimento e caracterização dos híbridos; e
- V. Análise e comparação do desempenho dos híbridos obtidos e do fermento comercial em relação à resistência ao congelamento

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção são apresentados conceitos fundamentais para a realização do trabalho, assim como o estado da arte referente à panificação, ao congelamento e à geração de leveduras híbridas.

3.1 Mercado de panificação

O pão, em suas diversas variações, é um dos alimentos mais consumidos rotineiramente em diversas regiões do mundo e pode ser considerado como um dos primeiros alimentos processados desenvolvidos pelo homem. Apesar de cada região ter suas diferentes variações, seja em processos ou ingredientes, o consumo de produtos de panificação encontra-se em escala global (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

A busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis e minimamente processados exigiu mudanças de pensamento e novas formulações para a indústria de alimentos. Entretanto, esse novo cenário no mercado de panificação não impactou negativamente seu crescimento (ABIP; ITPC; SEBRAE, 2017). O mercado mundial de pães permaneceu em crescimento nos últimos anos, tendo um aumento da receita de 18,1 % em relação a 2020, chegando a US\$ 474,351 milhões. Além disso, é esperado um crescimento anual de 5,03 % entre os períodos de 2022 a 2026 (STATISTA, 2022).

Arelado ao mercado de panificação, encontra-se o consumo do trigo, principal ingrediente de diversas variedades de pão. O seu consumo total mundial passou de 716 milhões de toneladas em 2015 para 757,8 milhões de toneladas em 2020; no Brasil, passou de 11,1 milhões de toneladas em 2015 para 12,2 milhões de toneladas em 2020. O aumento desses índices corrobora o crescimento da indústria de panificação (ABIP, 2021).

No Brasil, em 2020, apesar da pandemia de COVID-19, o setor de panificação e confeitaria apresentou um faturamento de R\$ 91,94 bilhões, uma queda de apenas 3,3% em relação à 2019 (ABIP, 2021). Sendo assim, o setor está entre os maiores da indústria nacional e movimentou cerca de 1,22 % do PIB nacional em 2020.

3.2 Características e composição da massa

Tradicionalmente, os pães são produzidos com farinha obtida de algum cereal, porém existem diversas variedades de pães no mundo, com diferentes formulações e estruturas, o que inviabiliza a apresentação dos principais ingredientes e características desejáveis de forma global. Sendo assim, a denominação “pão” é utilizada para uma vasta gama de produtos de

diferentes formas, tamanhos, texturas, cores e sabores (CAUVAIN, 2015). Devido a isso, dependendo da variedade de pão, os parâmetros necessários para determinar sua qualidade são completamente diferentes e estão associados aos gostos dos consumidores em determinada região (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

De maneira geral, os pães são constituídos por farinha, normalmente de trigo, água, fermento e sal de cozinha. Dependendo da variedade, também podem conter gordura, leite, açúcar e alguns aditivos, como emulsificantes, enzimas e melhoradores de farinha (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007). Cada ingrediente tem sua função dentro do processo de panificação e vai além de apenas estar relacionada ao sabor.

Dentre os produtos do setor de panificação no Brasil, o destaque encontra-se no pão francês que, mesmo com as atuais mudanças nos hábitos dos consumidores, permanece como o principal produto do setor, sendo responsável por 45 % do volume de vendas nas padarias brasileiras (ABIP, 2019; ABIP; ITPC; SEBRAE, 2017). Um típico pão francês brasileiro (Figura 1) tem entre (12,5 e 14,0) cm de comprimento e (5,5 e 7,0) cm de diâmetro, pesando 50 g em média, e apresenta uma casca crocante marrom e um miolo branco macio (ABNT; SEBRAE, 2015; CARR; TADINI, 2003; QUEIROZ, 2001).

Figura 1 – Típico pão francês brasileiro

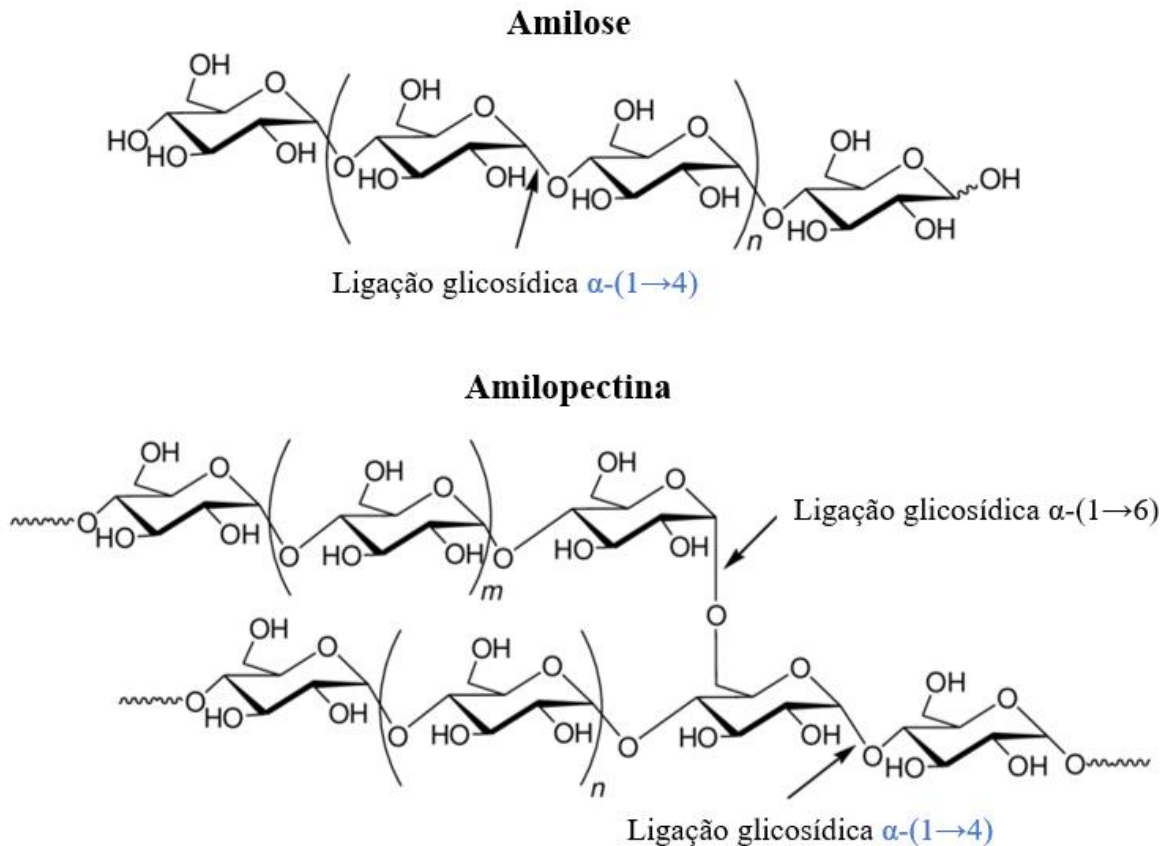


Fonte: Adaptado de ABNT e SEBRAE (2015)

3.2.1. *Farinha de trigo*

A farinha de trigo, obtida do endosperma do grão de trigo, é constituída entre (70 e 75) % por amido e entre (10 e 12) % por proteínas (GOESAERT et al., 2005). O amido presente na farinha é composto por amilose (23 %), um polímero essencialmente linear formado por ligações glicosídicas α -1,4 com peso molecular de aproximadamente 100 kDa, e amilopectina (73 %), um polímero também formado por unidades de glicose, porém ramificado, com ligações α -1,4 e α -1,6, e com peso molecular de aproximadamente 20.000 kDa (CAUVAIN, 2015; CAUVAIN; YOUNG, 2007), cujas estruturas podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 – Estruturas das cadeias de amilose e amilopectina com indicação das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6



Fonte: Adaptado de Kadokawa (2012)

As proteínas presentes na farinha de trigo podem ser divididas em dois grupos, sendo eles as proteínas do glúten entre (80 a 85) % do total e as que não são proteínas do glúten entre (15 e 25) % (GOESAERT et al., 2005). As proteínas do glúten, no caso a gliadina e a glutenina, exercem um papel importante no processo de panificação. As gliadinas são compostas por prolínas e glutaminas, possuem uma única cadeia e apresentam pontes dissulfeto intramoleculares. Já as gluteninas, também compostas por prolínas e glutaminas, são formadas por várias cadeias e apresentam pontes dissulfeto intra e entre-cadeias (CAUVAIN; YOUNG, 2007; GOESAERT et al., 2005; VAN DER BORGHT et al., 2005).

Enquanto o amido tem participação na formação do miolo do pão devido à sua gelatinização e retrogradação, as proteínas gliadina e glutenina são responsáveis pela formação do glúten, que promovem elasticidade e extensibilidade para o desenvolvimento de uma massa viscoelástica, possibilitando tanto a formação da estrutura do pão quanto a expansão da massa (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007; GOESAERT et al., 2005).

3.2.2. Água

A água é responsável pela hidratação do amido, cuja absorção depende da qualidade da farinha. Essa característica está diretamente relacionada à capacidade de absorção de água pelo grão, que pode estar na forma íntegra ou danificada. Uma farinha de boa qualidade permite uma maior absorção e retenção de água na massa, o que resultará em um maior volume do pão (LAAKSONEN, 2001; SULTAN, 1990).

A água também é necessária para a formação do glúten, por meio de sua absorção pelas suas proteínas formadoras, e promove um meio favorável tanto para a atividade enzimática quanto para a fermentação realizada pela levedura. Além disso, quando utilizada em uma temperatura baixa, entre (4 e 13) °C, impede que a massa atinja a temperatura ideal para a fermentação enquanto se está no processo de amassamento (ABNT, SEBRAE, 2015; CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

3.2.3. Sal

O cloreto de sódio (NaCl) utilizado, popularmente conhecido como sal de cozinha, além de realçar o sabor do pão, favorece o desenvolvimento da rede de glúten e ajuda no controle da atividade enzimática e da fermentação. Esse controle na fermentação é fundamental, pois, ao impedir que ela se torne selvagem, ou seja, ao manter um ritmo adequado para a fermentação, a massa tem tempo de se estruturar para conseguir se expandir e reter o gás que será produzido durante a fermentação (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

3.2.4. Fermento

Para que o pão possa ser produzido, é necessário a utilização do que é popularmente chamado de fermento, constituído pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se de um fungo, um microrganismo unicelular de formato arredondado que se reproduz de forma assexuada por meio de brotamento ou de forma sexuada por meio de esporulação (CAUVAIN; YOUNG, 2007). É um organismo heterotrófico que utiliza fontes orgânicas de carbono para seu crescimento que, no caso do pão, são os açúcares presentes na farinha de trigo após a quebra do amido pela α e β -amilase, como glicose e maltose. Além disso, são aeróbios ou facultativos, podendo realizar a fermentação ao invés da respiração, o que possibilita a liberação de etanol e gás carbônico no meio, causando o crescimento da massa (BORZANI et al., 2001).

As leveduras têm diferentes funções na panificação, sendo a principal delas o aumento do volume do pão devido aos produtos da fermentação alcoólica realizada. Além disso, devido às bolhas de gás carbônico formadas, há mudança na textura e estrutura do pão. Por fim, também

contribuem para o *flavor*² do pão (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007; ROSE; HARRISON, 1993).

3.2.5. Açúcar

O açúcar é adicionado à massa do pão francês como substrato para a levedura, visto que se apresenta na forma de sacarose e, com isso, se encontra mais acessível à levedura desde o início do processo. Além disso, também participa nas reações de *Maillard* e caramelização, que ocorrem no processo de assamento da massa e são responsáveis pela coloração da casca e pelo sabor (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

3.2.6. Demais ingredientes adicionados

Para melhorar as características do produto ou mesmo parte do processo, outros ingredientes são adicionados nas formulações. Dentre eles, é possível encontrar emulsificantes, agentes oxidantes e enzimas. Tanto as quantidades quanto os tipos de aditivos que podem ser adicionados às formulações são regulados pela ANVISA (BRASIL, 2007).

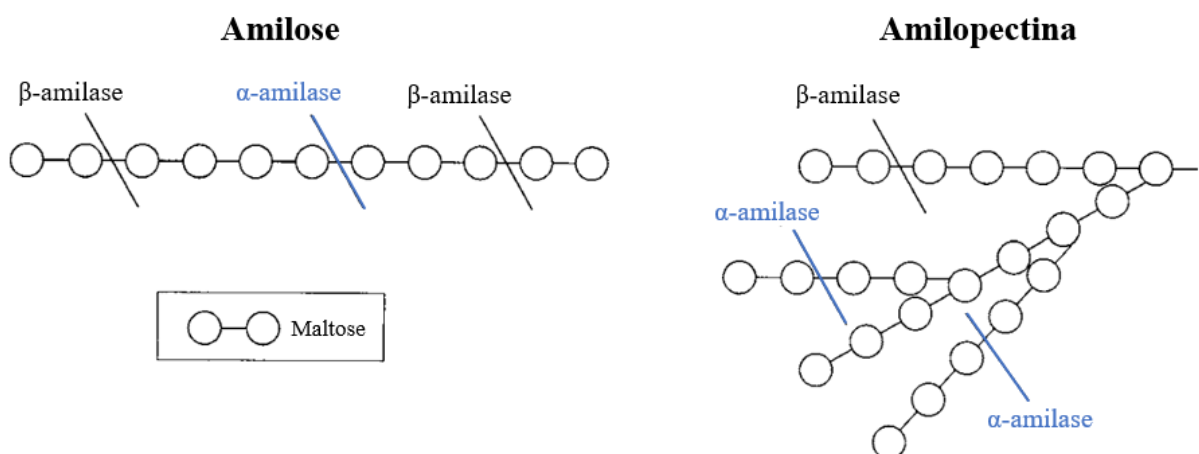
Os emulsificantes são moléculas que possuem uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica, sendo considerados surfactantes. Com isso, podem formar micelas que permitem a formação de uma emulsão. Devido a essa característica, em panificação, os emulsificantes são utilizados para fortalecer a massa ou para conferir maciez ao miolo. Os mais utilizados para fortalecimento da massa são DATEM (Monoglicerídeos de ésteres de ácido tartárico diacetilado), SSL (Estearoil-2-lactil Lactato de Sódio), CSL (Estearoil-2-lactil Lactato de Cálcio) e Polisorbato (STAMPFLI; NERSTEN, 1995). Os DATEM se ligam ao glúten hidratado, tornando a rede mais forte e extensível, resultando em um maior volume final do pão, visto que a massa consegue reter uma maior quantidade de gás (CAUVAIN; YOUNG, 2007). Os SSL e os CSL agem da mesma maneira, apesar de serem um pouco menos eficientes para aumentar a capacidade de retenção de gás (CAUVAIN; YOUNG, 2007). Já para conferir maior maciez ao miolo, os monoglicerídeos são utilizados, pois conseguem se ligar às frações de amilose em temperaturas elevadas. Com isso, desaceleram a retrogradação do amido, trazendo maior maciez ao miolo e retardando o envelhecimento do pão (CAUVAIN; YOUNG, 2007; STAMPFLI; NERSTEN, 1995).

² Termo em inglês que compreende as sensações geradas pelo paladar e pelo olfato, sendo assim, uma junção do sabor e do aroma.

Os agentes oxidantes auxiliam no fortalecimento da matriz de glúten. Um exemplo de agente oxidante utilizado é o ácido ascórbico (vitamina C). Ele é responsável pela oxidação das ligações S-H das proteínas, o que causa um aumento de ligações dissulfídicas inter-gluteninas, produzindo uma estrutura mais elástica. Com isso, tem-se uma rede de glúten mais forte, que consegue se expandir devido ao gás retido na massa no início do assamento, resultando em pães com volumes específicos maiores (CAUVAIN; YOUNG, 2007; NAKAMURA; KURATA, 1997; PEREIRA et al., 2009).

Já as enzimas são responsáveis pela catálise de reações químicas e, caso possam substituir compostos químicos, são uma melhor alternativa, visto que são consideradas seguras e são inativadas no processo de assamento (PEREIRA et al., 2009). No pão francês, tem-se principalmente a adição da enzima α -amilase. Essa adição torna-se necessária, pois no processo de obtenção da farinha branca, uma grande parte da enzima naturalmente presente principalmente na casca do grão do trigo é perdida. A α -amilase é responsável pela quebra das grandes cadeias de amilose e amilopectina em pequenas cadeias de dextrina (Figura 3). Com isso, tem-se dois sítios que permitem a ação da β -amilase, naturalmente presente em quantidade suficiente e que não é perdida no processo de produção da farinha. A β -amilase é responsável pela quebra nas pontas das cadeias de amilose e amilopectina, produzindo unidades de maltose, que serão utilizadas como substrato pelas leveduras (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

Figura 3 – Regiões de ação das enzimas α -amilase e β -amilase nas cadeias de amilose e amilopectina do amido da farinha de trigo



Fonte: Adaptado de Cauvain e Young (2007)

3.3 Processo de panificação

Para a produção do pão francês, são necessárias as seguintes etapas: mistura dos ingredientes, amassamento, descanso, divisão e modelagem da massa, fermentação e

assamento. Cada uma das etapas tem sua importância para que determinada característica desejável do pão seja atingida e atenda às necessidades dos consumidores. Dependendo da variedade de pão, mais etapas de descanso ou fermentação da massa são necessárias (CAUVAIN, 2015; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

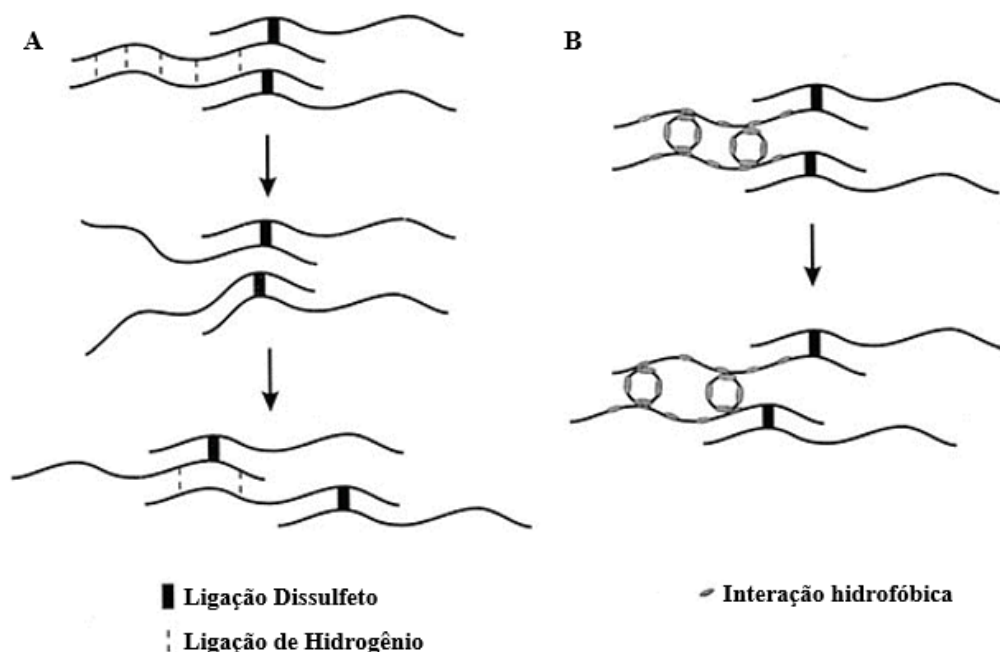
3.3.1. Mistura e amassamento

A primeira etapa do processo consiste na mistura dos ingredientes secos, com exceção do NaCl, seguido da adição de água e posterior adição do NaCl. Nos equipamentos utilizados em escala industrial, tem-se dois processos sequenciais, sendo eles a mistura dos ingredientes, visando a formação de uma massa homogênea, e o amassamento, responsável por fornecer a energia necessária para que as moléculas de amido sejam hidratadas e a rede de glúten possa ser formada (BLANSHARD et al., 1986; CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

Por meio da hidratação das moléculas de amido, tem-se uma maior mobilidade das cadeias proteicas, fazendo com que ocorra uma redistribuição das moléculas, permitindo uma interação entre as proteínas e a formação de ligações de hidrogênio. Neste caso, com a energia fornecida e a tensão de cisalhamento aplicada, por meio do rompimento e formação de novas ligações de hidrogênio, tem-se o alinhamento das cadeias de glutenina (Figura 4A). Além disso, também ocorre a inserção de moléculas de gliadina entre as cadeias de glutenina (Figura 4B) (BLANSHARD et al., 1986; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

Figura 4 – Formação da matriz de glúten. (A) Realinhamento das cadeias de glutenina.

(B) Inserção das moléculas de gliadina



Fonte: Adaptado de Cauvain (2015)

Sendo assim, devido à energia fornecida, à hidratação e à consequente formação dessa estrutura, tem-se uma mudança na qual a farinha, inicialmente no estado vítreo, passa para um estado de borracha, correspondente à massa viscoelástica formada após esse processo (RAHMAN, 2012). A formação adequada da rede de glúten, associada ao chamado “desenvolvimento ótimo” da massa, é necessária para que, além da expansão da massa, essa seja forte o suficiente para reter o CO₂ que será gerado durante a fermentação. Para auxiliar nesse processo, a temperatura da água adicionada deve ser baixa, pois com a energia fornecida no amassamento, tem-se o aquecimento da massa, que pode atingir a temperatura ideal da fermentação da levedura antes do seu “desenvolvimento ótimo”. Por fim, durante esse processo, também ocorre a incorporação de bolhas de ar na estrutura da massa. Com isso, tem-se a criação de cavidades dentro da rede de glúten que, após a fermentação, são preenchidas por CO₂ (BLANSHARD et al., 1986; CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007; PYLER; GORTON, 2009).

3.3.2. *Descanso*

O período de descanso, realizado a temperatura ambiente e compreendido entre o amassamento e a divisão da massa, permite o relaxamento da matriz de glúten, por meio da dissipação da energia adquirida anteriormente. Com isso, tem-se a reestruturação das proteínas, principalmente a glutenina, permitindo a máxima extensibilidade da massa (CAUVAIN; YOUNG, 2007; DON et al., 2005; PYLER; GORTON, 2009; WEEGELS et al., 1996; WEEGELS; HAMER; SCHOFIELD, 1997).

3.3.3. *Divisão e modelagem*

Após o descanso, tem-se a divisão e modelagem das peças, uma etapa delicada na qual podem ocorrer danos na massa, mas que permite que as unidades adquiram seus formatos e pesos específicos. Essa modelagem é importante para produzir uma estrutura que permitirá a melhor textura no produto, tanto do miolo quanto da casca (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

3.3.4. *Fermentação*

Com as peças modeladas, tem-se a etapa de fermentação. Essa etapa subsequente à modelagem terá condições favoráveis para a fermentação, a uma temperatura ótima de atividade da levedura, entre (28 e 32) °C, e geralmente ocorre em fermentadoras a umidade relativa controlada próxima de 100 %. Essa umidade é responsável para controlar a flexibilidade da massa, impedindo que ela se torne seca e permitindo sua expansão (CALVEL, 1987;

CAUVAIN; YOUNG, 2007; PYLER; GORTON, 2009). Nessa etapa, a massa dobra seu volume e o tempo necessário varia dependendo das condições empregadas. Por exemplo, em torno de 45 min com (30 a 32) °C e 100 % de umidade relativa, ou 90 min, a 27 °C e 75 % de umidade relativa (CARR et al., 2006; ROUILLÉ et al., 2010; SOMMIER et al., 2005).

Durante a etapa de fermentação, o amido é convertido em açúcares devido à presença da enzima α -amilase. Estes açúcares servem como substrato para que as leveduras produzam etanol e CO₂ por meio da fermentação alcoólica. Devido à produção de gás, ocorre a expansão da massa que, nesse ponto, deve possuir o glúten bem desenvolvido para conferir extensibilidade e força suficiente à massa, permitindo sua expansão, sem rompimento, e o aprisionamento do gás produzido nas cavidades que foram formadas na própria estrutura da rede de glúten durante o amassamento (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007).

3.3.5. Assamento

Por fim, a última etapa consiste no assamento. Durante essa etapa, uma série de mudanças ocorrem interna e externamente no pão, desde sua estrutura até sua coloração e sabor. Essa etapa tem duração entre (18 e 20) min, em uma temperatura entre (200 e 220) °C, dependendo do forno utilizado (ABNT; SEBRAE, 2015). Além disso, é necessário que o forno esteja equipado com dispositivo de injeção de vapor para a formação da crosta.

3.3.5.1. Parte externa do pão (Crosta)

A crosta do pão, devido à exposição direta à alta temperatura, sofre rápida desidratação, acelerada pela injeção de vapor d'água. Quando há o contato do vapor d'água com a crosta, há um aumento da transferência de calor por meio da adição do calor latente da água, levando a massa ao estado vítreo após o resfriamento, representado pela crocância característica, como pode ser visto na Figura 5C (CAUVAIN; YOUNG, 2007; PYLER; GORTON, 2009; RAHMAN, 2012). Com a formação da crosta, tem-se a estruturação do pão, e com isso, além de se criar um impedimento físico à continuação da expansão da massa, tem-se uma barreira para retenção da umidade do miolo (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

Além da desidratação, por volta de 115 °C, ocorrem as reações de *Maillard* na crosta. Essas reações são responsáveis pela coloração e pelo *flavor* da crosta, que corresponde à aproximadamente 80 % do *flavor* total do pão (CAUVAIN; YOUNG, 2007; PYLER; GORTON, 2009). As reações de *Maillard* são um conjunto de reações que ocorrem em um complexo mecanismo no qual açúcares redutores, como por exemplo a glicose, reagem com aminoácidos e influenciam a coloração, *flavor* e as propriedades nutricionais dos pães (HEITMANN; ZANNINI; ARENDT, 2018; O'BRIEN; MORRISSEY; AMES, 1989).

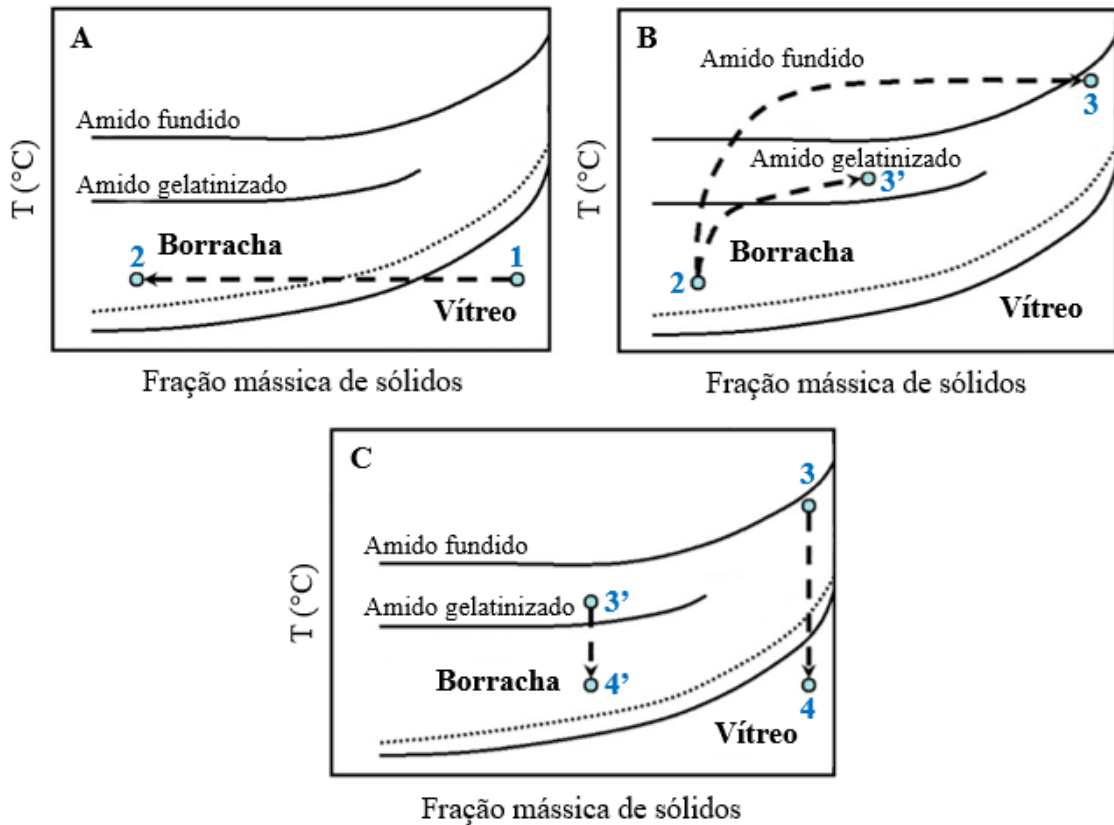
3.3.5.2. *Centro da massa (Miolo)*

O centro da massa, por estar menos exposto, tem uma maior barreira para transferência de calor. Sendo assim, durante os primeiros minutos nos quais a massa está no forno, continua ocorrendo produção de gás até que seja atingida uma temperatura elevada o suficiente para a inativação das leveduras (55 °C). Apesar disso, a massa ainda tem um período de crescimento devido à expansão dos gases nela contidos (CALVEL, 1987; CAUVAIN; YOUNG, 2007). A temperatura no centro continua a se elevar até atingir 100 °C (se no nível do mar), correspondente à temperatura de ebulição da água, e permanece nessa temperatura devido à barreira formada pela crosta. Com isso, o miolo retém umidade suficiente para permanecer em seu estado borracha, conferindo a maciez desejada, como pode ser observado na Figura 5B (RAHMAN, 2012).

Devido à elevada temperatura, ocorre a vibração das moléculas dos polímeros de amido, causando a ruptura das ligações intermoleculares e permitindo a criação de ligações de hidrogênio, ou seja, a absorção de água pelos grânulos de amido. Com a penetração da água nas cadeias de amido, ocorre a diminuição das regiões cristalinas até a total perda de cristalinidade, correspondente à chamada gelatinização do amido (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

As mudanças que foram descritas com relação à crosta e ao miolo do pão, podem ser ilustradas pelo diagrama de estado apresentado inicialmente por Cuq (2003) e, posteriormente, por Rahman (2012), apresentado na Figura 5. Em A, é apresentado o processo de hidratação dos ingredientes secos, que se encontram inicialmente em estado vítreo, representado pelo ponto 1, e passam ao estado borracha, representado pelo ponto 2. Em B, é apresentado o processo de assamento, no qual a massa, no ponto 2, se encontra inicialmente no estado borracha. Com o aquecimento, a crosta atinge o ponto 3, com menor quantidade de água, e o miolo atinge o ponto 3'. Por fim, em C, é apresentado o resfriamento do pão, com o miolo passando de 3' para 4', permanecendo no estado borracha e a crosta, passando de 3 para 4, entra no estado vítreo, caracterizado pela crocância.

Figura 5 – Diagrama de estado para o processo de panificação. (A) Ingredientes secos, passando do estado vítreo para o estado borracha após hidratação. (B) Durante a etapa de assamento. (C) Após o assamento



Fonte: Adaptado de Rahman (2012)

3.4 Congelamento

Uma das maneiras de se aumentar o tempo de prateleira dos alimentos e sua conservação é por meio do congelamento, uma técnica que surgiu por volta dos anos 1970 e tem sido aperfeiçoada até os dias atuais (OMEDI et al., 2019). Em panificação, vários estudos relacionados ao congelamento e como melhorá-lo foram realizados, quanto a formulação do produto (YI; JOHNSON; KERR, 2009), seleção e estabilidade de leveduras (CODÓN et al., 2003; IZAWA et al., 2004; RIBOTTA; LEÓN; AÑÓN, 2003b; SHIMA et al., 2000; TANGHE et al., 2000; TEUNISSEN et al., 2002), adição de aditivos (ALTUNA; RIBOTTA; TADINI, 2016; JIANG; BAIL; WU, 2008; MATUDA, 2004; SANCHEZ et al., 2014), além de características do próprio processo (BHATTACHARYA; LANGSTAFF; BERZONSKY, 2003; CARR et al., 2006; ESSELINK et al., 2003; IZADI NAJAFABADI et al., 2014; MATUDA; PESSÔA FILHO; TADINI, 2011; RIBOTTA; LEÓN; AÑÓN, 2003a; RONDA et al., 2011).

As diversas pesquisas existentes na área refletem o desenvolvimento do mercado de produtos congelados. O mercado global do setor de congelados relacionados a padaria foi estimado em US\$ 23 bilhões em 2021 e estima-se que possa atingir US\$ 49 bilhões em 2032. Dentre os produtos comercializados, os pães congelados compreendem a maior parcela desse mercado (FMI, 2022). No mercado brasileiro, existem 300 fábricas de pães congelados, sendo os supermercados os maiores consumidores, visto que as padarias ainda apresentam resistência ao pão congelado. No caso específico do pão francês, estima-se que 15,59 % do volume produzido no país é pão congelado (MENDONÇA, 2019).

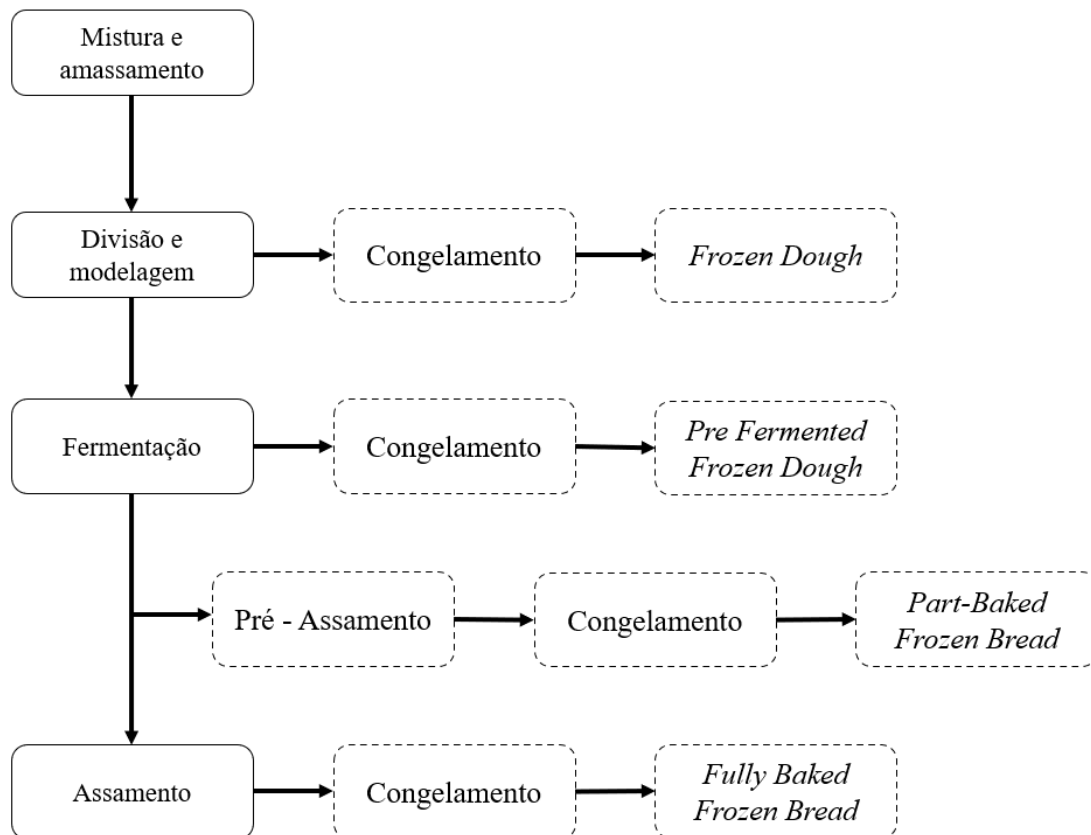
O congelamento consiste na diminuição da temperatura até que as moléculas de água, no estado líquido, transformem-se em cristais de gelo. Nos alimentos, as moléculas de água podem estar livres, adsorvidas ou ligadas. Ao se realizar qualquer procedimento com a função de retirar essas moléculas de água, consegue-se remover as moléculas que estão livres e as adsorvidas (RAHMAN, 2009). As moléculas que se encontram ligadas, de maneira geral, integram a matriz do alimento e, em termos de congelamento, são chamadas de “água não congelável”, ou seja, independentemente do quanto se abaixe a temperatura, parte da água não será congelada (CHEN, 1987).

Ao se realizar o processo de congelamento, tem-se a redução da atividade de água dos alimentos, resultando na diminuição significativa da velocidade de movimento das moléculas. Ao restringir a mobilidade das moléculas, tem-se um impacto na taxa das reações químicas relacionadas ao envelhecimento e oxidação dos alimentos, tornando esses fenômenos mais lentos e aumentando a estabilidade do alimento (RAHMAN, 2009, 2010). Com isso, é possível conservá-los por mais tempo, auxiliando tanto no tempo de prateleira, quanto no transporte dos alimentos, permitindo uma rápida resposta às tendências de consumo (LUO et al., 2018; OMEDI et al., 2019). No caso da panificação, congelar a massa traz uma série de vantagens em relação ao congelamento do pão, levando em consideração que este pode ser feito no estabelecimento comercial e ofertado “fresco” (LUO et al., 2018; RASHIDI et al., 2016).

3.4.1. *Variedades de massa congelada*

O congelamento pode ocorrer em diversos momentos da produção. Ele pode ser feito após a produção, ou seja, o produto final é congelado (FB-FB – *Fully Baked Frozen Bread*); pode ser realizado após um pré-assamento, ou seja, tem-se uma massa que foi congelada após um assamento parcial (PB-FB – *Part-Baked Frozen Bread*); após a fermentação, porém antes do assamento (P-FD – *Pre fermented Frozen Dough*); ou, por fim, antes de ser fermentado (FD – *Frozen Dough*). Um esquema das opções previamente apresentadas encontra-se na Figura 6.

Figura 6 – Esquema das possibilidades de congelamento no processo de produção do pão-francês. Os quadrados com linha contínua representam o processo padrão sem congelamento



Fonte: Adaptado de Omedi et al. (2019)

Quando se opta pela *Frozen Dough* (FD), obtida a partir do congelamento dos pães antes da fermentação, tem-se um produto com menor volume final e maior tempo de processo pois, devido à formação dos cristais de gelo, a levedura perde parte da sua capacidade fermentativa devido aos danos causados em sua membrana, enquanto a massa tem uma menor retenção de gás por sofrer danos na rede de glúten. Porém estes problemas podem ser contornados pela adição de uma maior quantidade de levedura ou de melhoradores. Ao optar pela FD, tem-se uma vantagem econômica quanto ao custo de transporte, pois as massas congeladas antes da fermentação ocupam um menor espaço de armazenamento e necessitam de um controle de temperatura menos rigoroso (OMEDI et al., 2019). No entanto, quando se opta por congelar a massa sem fermentar, a levedura apresenta uma maior resistência ao congelamento em comparação à levedura pós processo fermentativo. Isso ocorre pois, com a fermentação, tem-se a liberação de etanol no meio, causando um aumento no estresse sofrido pela levedura e podem ocorrer mudanças nas concentrações de compostos crio protetores, como a trealose. Ambas as situações reduzem a resistência da levedura ao congelamento (AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017).

O *Pre fermented Frozen Dough* (P-FD) surgiu para trazer um preparo mais rápido que o da FD, visto que a massa é fermentada antes do congelamento e no ponto de venda pode ser transferida diretamente do freezer para o forno, com um período de descongelamento sendo recomendado. Apesar dos custos de transporte serem relativamente baixos, porém mais altos em relação aos da FD, flutuações na temperatura durante o transporte e o armazenamento podem causar o colapso da estrutura da P-FD (OMEDI et al., 2019).

Para contornar o problema da perda da estrutura, desenvolveu-se o *Part-Baked Frozen Bread* (PB-FB), que apresenta a crosta já formada pelo pré-assamento realizado, e com isso, mantém a estrutura do pão. Porém, após 2 dias de armazenamento, tem-se uma diminuição significativa do peso do pão, ocorrendo uma redução significativa no volume específico após 4 dias de armazenamento, provavelmente devido aos danos causados na estrutura do pão pela formação dos cristais de gelo (CARR et al., 2006; CARR; TADINI, 2003). Essa tecnologia trouxe uma alta conveniência, não exigindo no ponto de venda, mão de obra qualificada para o manuseio ou um forno equipado com liberação de vapor, visto que a casca já é formada antes do congelamento. Porém, além de se ter um tempo de prateleira reduzido após o assamento final, tem-se um transporte com custo mais elevado devido à necessidade de baixíssimas temperaturas sem flutuações (OMEDI et al., 2019).

3.4.2. Taxa de congelamento e armazenamento

Além das questões relacionadas ao momento no qual a massa será congelada, é necessário levar em consideração o processo de congelamento em si e o seu armazenamento (LUO et al., 2018; OMEDI et al., 2019; ROSELL; GÓMEZ, 2007). Vários estudos a respeito da velocidade de congelamento (ACKER; MCGANN, 2003; AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017; BAIER-SCHENK; HANDSCHIN; CONDE-PETIT, 2005; BAN et al., 2016; BENEY et al., 2000; CHEN et al., 2012; HAVET; MANKAI; LE BAIL, 2000; MEZIANI et al., 2012) e da forma de armazenamento (BAIL et al., 1999; CHEN et al., 2013; RASHIDI et al., 2016; SELOMULYO; ZHOU, 2007; WANG et al., 2014; YI; KERR, 2009a, 2009b; ZOUNIS et al., 2002) já foram conduzidos.

A qualidade da massa dependerá majoritariamente da capacidade fermentativa da levedura e da retenção de CO₂ pela massa após o congelamento. Caso haja uma perda dessas duas características, tem-se impactos negativos na qualidade do produto final. Ambos os fatores são afetados pela formação dos cristais de gelo durante o processo de congelamento e o comportamento desses cristais no decorrer do armazenamento (CAUVAIN; YOUNG, 2007;

LUO et al., 2018; OMEDI et al., 2019; ROSELL; GÓMEZ, 2007). Existem diversas formas pelas quais os cristais de gelo interferem na qualidade do produto.

Quando há formação dos cristais no interior das células das leveduras, estes podem causar a ruptura da membrana e, com isso, a morte celular (ACKER; MCGANN, 2003). Já quando são cristais extracelulares, esses podem aumentar a pressão osmótica intracelular, visto que há uma concentração do meio, causando a movimentação das moléculas de água intracelular em direção ao meio externo, levando à desidratação da célula da levedura e, conseqüentemente, um impacto negativo em sua viabilidade (AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017; BENEY et al., 2000; MAZUR, 1970). Por fim, a ação mecânica dos cristais pode ter efeito na estrutura e nas propriedades da massa (BAIER-SCHENK et al., 2005; BAIER-SCHENK; HANDSCHIN; CONDE-PETIT, 2005). Sendo assim, um controle da formação dos cristais de gelo pode auxiliar numa melhor qualidade do produto. Uma das maneiras para tal é o controle da velocidade de congelamento (YI; KERR, 2009b, 2009a).

Dependendo da velocidade de congelamento, tem-se a formação de cristais de gelo de diferentes tamanhos e distribuídos de formas variadas no meio. Com altas taxas de congelamento, tem-se a formação de pequenos cristais distribuídos pelo meio, enquanto baixas taxas favorecem a formação de grandes cristais menos distribuídos (AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017; BAIER-SCHENK et al., 2005; BAN et al., 2016; CAUVAIN; YOUNG, 2007; ČUKELJ; NOVOTNI, 2019). A baixas taxas de congelamento, a água intracelular, movida por osmose, tem tempo para migrar para o meio extracelular causando a desidratação e, eventualmente, levando a morte celular (AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017; BENEY et al., 2000; DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; MAZUR, 1970; QUEROL; FLEET, 2006). Por outro lado, com altas taxas de congelamento tem-se a criação de pequenos cristais que, quando intracelulares, impedem a desidratação da célula e podem apresentar um efeito crio protetor. Quando extracelulares, causam menores danos à estrutura da massa em comparação aos de maior tamanho (ACKER; MCGANN, 2003; AYATI; HAMDAMI; LE-BAIL, 2017). Por fim, com altas taxas de congelamento, tem-se uma maior frequência de nucleação dos cristais de gelo, causando um efeito significativo na temperatura de transição para o estado vítreo. Com isso, atinge-se o estado vítreo em temperaturas mais altas, o que melhora a estabilidade do produto durante o armazenamento (CAUVAIN; YOUNG, 2007).

Já para o armazenamento, é importante que não haja flutuações de temperatura, que podem acelerar o processo de mudança do tamanho e na distribuição dos cristais. Durante o armazenamento, ocorre a migração da água do centro da massa para a superfície, deixando o miolo com uma distribuição heterogênea da água congelável e, com isso, surgindo cristais com

tamanhos maiores, causando danos às paredes celulares e consequentes danos na estrutura da massa (CAUVAIN; YOUNG, 2007; CHEN et al., 2013). Também ocorre a exposição das partes hidrofóbicas das proteínas de glúten, causando uma diminuição na sua capacidade de absorção de água, e, com isso, tem-se um aumento da mobilidade da água (WANG et al., 2014). Além disso, com longos períodos de armazenamento, tem-se a necessidade de um maior tempo de fermentação, e a ocorrência de um menor volume específico e maior dureza no pão (RASHIDI et al., 2016; SELOMULYO; ZHOU, 2007; YI; KERR, 2009b).

Porém, existem estudos que relatam que, com longos períodos de armazenamento, ocorrem maiores danos à estrutura da massa e à levedura quando altas taxas de congelamento são aplicadas. No caso da estrutura da massa, tem-se uma separação mais rápida entre os grânulos do amido e a matriz de glúten quando o congelamento é realizado a altas taxas, o que pode indicar redistribuição de água no meio e mudanças nas proteínas presentes (SILVAS-GARCÍA et al., 2016). Já no caso das leveduras, com altas taxas, ocorrem quebras mecânicas nas paredes celulares pela aglomeração de pequenos cristais de gelo (GERARDO-RODRÍGUEZ et al., 2017).

3.5 Leveduras

Como apresentado anteriormente na seção 3.2.4, para a produção do pão francês, é necessária a utilização de um fermento, que consiste na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. É a levedura predominantemente usada na produção de produtos fermentados, como cervejas, vinhos e pães (LEGRAS et al., 2007), pois possui características desejáveis para essas aplicações, como a fermentação completa e eficiente de açúcares, a produção de *flavors* desejáveis, ausência de produção de toxinas, alta produção e tolerância a etanol (PIŠKUR et al., 2006; PIŠKUR; LANGKJÆR, 2004). O emprego dessa levedura pelo homem data do início da produção de produtos fermentados. Devido a sua grande utilização, é uma levedura muito bem conhecida, que foi domesticada pelo homem e tem todo seu genoma caracterizado, sendo assim, é considerada uma levedura segura (FELDMANN, 2012; LEGRAS et al., 2007).

A levedura, por ser um organismo unicelular, tem a parede e a membrana plasmática como barreiras contra mudanças do ambiente. Alterações de temperatura e de atividade de água causam modificações na permeabilidade da membrana plasmática, o que influencia tanto a entrada de nutrientes quanto a saída do que deve ser descartado (TULHA et al., 2012). No processo de congelamento, a *S. cerevisiae* tem uma redução em sua capacidade fermentativa devido à desidratação sofrida e aos danos causados em sua membrana pela formação de cristais de gelo (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; QUEROL; FLEET, 2006; TULHA et al., 2012).

Quando a levedura é submetida a baixas temperaturas e ao congelamento, tem-se uma resposta genética dependente do tempo. No estágio final, tem-se a expressão de genes relacionados à síntese e ao acúmulo de glicerol e trealose na célula, indicando uma possível relação entre esses compostos e ações crio protetoras (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; TULHA et al., 2012). Tanto a trealose quanto o glicerol também conferem resistência ao estresse osmótico (TULHA et al., 2012).

A viabilidade da célula em situações de estresse, como o congelamento, está associada ao acúmulo de certos componentes intracelulares. Além de glicerol e trealose, também há relação com o acúmulo de prolina, arginina e ácido glutâmico (LUO et al., 2018; SHI et al., 2014). Dentre todos esses componentes, tem-se que os de maior influência são a trealose e a prolina, sendo a trealose a de maior impacto (DONG et al., 2016). Consideradas protetores, ambas auxiliam a célula em diversos estresses causados pelo meio, como por exemplo, desidratação, aquecimento ou oxidação. A atuação crio protetora da trealose é associada à sua interação com a água e com membranas lipídicas, além do abaixamento do ponto de congelamento (GIANNOU; TZIA, 2008; SHIMA; TAKAGI, 2009). Já no caso da prolina, esta tem a capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água livre intracelular, reduzindo a nucleação do gelo e, conseqüentemente, a desidratação celular (LUO et al., 2018).

Tendo em vista as propriedades crio protetoras da trealose, foram realizados estudos nos quais o aumento da resistência ao congelamento foi avaliado baseado no aumento da sua concentração intracelular por meio de mutações genéticas induzidas na levedura (CODÓN et al., 2003; DONG et al., 2016; SASANO et al., 2012; SUN et al., 2016; TAN et al., 2014). Em todos os casos, foi encontrada uma relação entre o acúmulo de trealose intracelular e o aumento da resistência ao congelamento. Porém, deve-se levar em consideração que, ao modificar o material genético da levedura, tem-se a criação de um organismo geneticamente modificado (OGM).

A utilização de OGMs na indústria de alimentos é controversa, e existe uma grande preocupação com possíveis problemas para o ambiente e para a saúde humana, apesar de não haver nenhum estudo que apresente efeitos negativos comprovados. Sendo assim, a regulamentação para utilização de OGMs, além de não ser igual em todos os países, costuma ser bastante complexa. No caso da Europa, por exemplo, a legislação é considerada a mais rigorosa do mundo, o que acaba dificultando a sua utilização. Já nos Estados Unidos, apesar de existirem três órgãos para lidar com a questão dos OGMs e cuja utilização em alimentos deve seguir uma combinação de regulamentações dos três diferentes órgãos, tem-se uma grande

quantidade de produtos no mercado que contém OGMs ou algum derivado (NKONYAM; RIEDEL; SEMTANSK, 2013).

No caso do Brasil, a regulamentação e a fiscalização do desenvolvimento de OGMs é feita pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a utilização em alimentos é permitida, sendo exigido que a embalagem do alimento contenha rotulagem adequada (BRASIL, 2005). Porém, a utilização de OGMs não é bem aceita pelos consumidores, o que pode causar a rejeição do produto apenas por apresentar a indicação de OGM no rótulo.

3.5.1. Hibridização

Levando-se em consideração que a utilização de uma levedura que seja considerada OGM não é atrativa para o mercado e pode causar rejeição por parte dos consumidores, a resistência ao congelamento pode ser atingida por meio da utilização da técnica de hibridização (KROGERUS et al., 2017). A hibridização de leveduras é uma técnica bem consolidada (FOWELL, 1955), que consiste na obtenção de um híbrido provindo de duas cepas com características desejáveis. Pode-se obter um híbrido com características melhoradas em relação às cepas parentais, como por exemplo, uma maior taxa de crescimento ou maior capacidade fermentativa (ODA; OUCHI, 1990), assim como pode-se ter uma característica que nenhuma das cepas parentais possuía, sendo assim, chamado de híbrido *de novo* (KROGERUS et al., 2017).

O desenvolvimento de leveduras híbridas encontra-se em ascensão devido ao seu potencial promissor para adaptação em condições de maior estresse, possibilitando uma melhoria no rendimento de processos industriais (BENDIXSEN; FRAZÃO; STELKENS, 2022). Além disso, com o avanço das técnicas de biologia molecular, constatou-se que a maioria das leveduras industrialmente utilizadas são híbridos naturalmente formados entre as cepas presentes no meio de produção, aumentando sua complexidade e resistência às condições do processo (LOPANDIC, 2018). A utilização de híbridos vem sendo muito utilizada para o melhoramento de cervejas e vinhos, inclusive na obtenção de novos sabores e aromas (BELLON et al., 2011, 2013, 2015; HART; JOLLY; NDIMBA, 2019; HEBLY et al., 2015; KANTER et al., 2020; KROGERUS et al., 2015; MERTENS et al., 2015; RESTUCCIA et al., 2011; WINANS, 2022). Na panificação, apenas dois trabalhos com a utilização de leveduras híbridas estão reportados na literatura. O primeiro consistiu no desenvolvimento de um híbrido entre as espécies *S. mikatae* e *S. cerevisiae* para utilização em massa fresca, porém o produto apresentou aroma e sabor diferente do pão convencional (ODA et al., 2020). O segundo consistiu no desenvolvimento de um híbrido entre *S. cerevisiae* e outras espécies, como *S.*

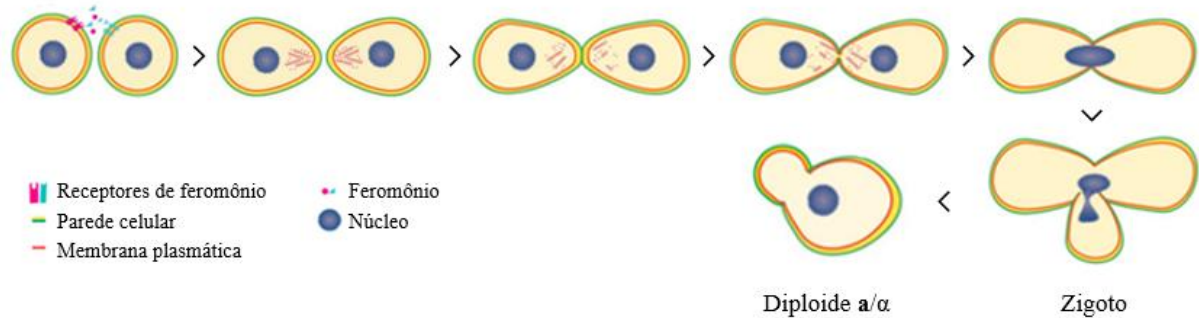
eubayanus, *S. jurei* e *S. arborícola* para utilização em massa congelada (MAGALHÃES et al., 2021). Apesar do produto apresentar aroma e sabor similar ao convencional, por serem híbridos entre espécies que não são utilizadas industrialmente, pode haver complicações do ponto de vista do processo, como a incapacidade de propagação nos meios utilizados industrialmente.

Para a obtenção de leveduras híbridas, pode-se utilizar vários métodos diferentes, sendo eles: cruzamento esporo-esporo (*spore-to-spore mating*), cruzamento em massa (*mass mating*), cruzamento raro (*rare mating*) e fusão de protoplasma (KROGERUS et al., 2017; ROSE; HARRISON, 1993). Os dois primeiros métodos dependem da levedura ter a habilidade de gerar esporos viáveis. Quando possuem essa habilidade, as leveduras esporulam quando estão em situações de estresse e, por meiose celular, formam quatro esporos haploides. Esses esporos são mais resistentes que a própria levedura e sobrevivem em estado vegetativo no meio até terem condições ideais para germinarem e se desenvolverem (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; FELDMANN, 2012). Quando a levedura tem essa habilidade, é possível colocar dois esporos específicos para a criação do híbrido (cruzamento esporo-esporo) ou misturar diversos esporos em meio sólido ou líquido (cruzamento em massa). Em ambos os métodos, tem-se uma alta frequência de hibridização e grande estabilidade genética dos híbridos formados, porém, algumas características podem ser perdidas durante o processo meiótico na formação do esporo (KROGERUS et al., 2017; PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012; ROSE; HARRISON, 1993).

No caso do cruzamento esporo-esporo, é necessário identificar o tipo sexual³ do esporo, que pode ser MAT α ou MAT a , para que o híbrido possa ser formado através do cruzamento entre esporos de tipos sexuais opostos. Através de receptores de feromônio, os esporos percebem a presença de um esporo de tipo sexual oposto e, com isso, ocorre o cruzamento e a formação de um zigoto diploide a/α , como apresentado na Figura 7 (JOHNSTON, 1994; MERLINI; DUDIN; MARTIN, 2013; ROSE; HARRISON, 1993). Em comparação ao cruzamento em massa, o cruzamento esporo-esporo possui a vantagem do controle entre quais esporos estão sendo utilizados para a geração do híbrido.

³ Tradução livre do termo *mating type*

Figura 7 – Cruzamento entre haploides de tipos sexuais diferentes para formação do zigoto e, na sequência, o diploide a/α .



Fonte: Adaptado de Merlini, Dudin e Martin (2013)

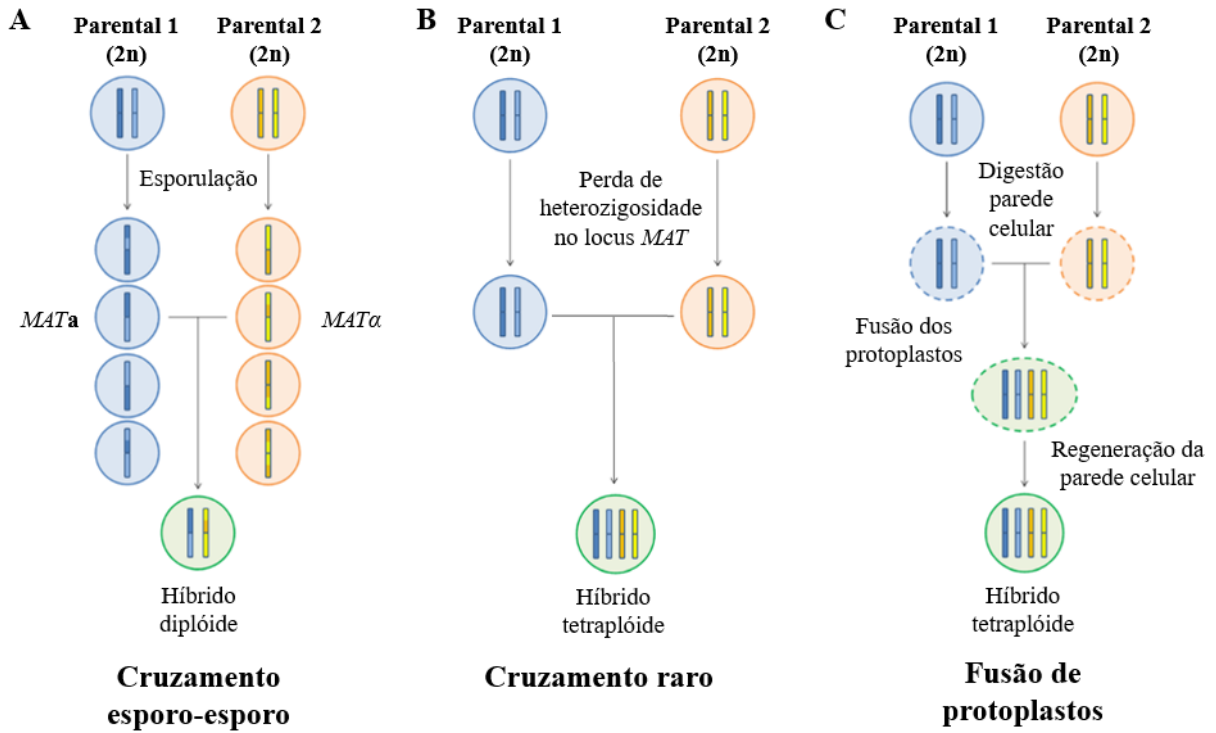
Caso a levedura não consiga formar um esporo viável, é possível utilizar o método de cruzamento raro. Leveduras diploides, ou com maior ploidia, possuem tipo sexual a/α , sendo, portanto, heterozigotos. Porém, pode ocorrer a perda espontânea dessa heterozigosidade, mesmo que em baixa frequência (10^{-4}), resultando na formação de uma célula diploide do tipo a ou α . Com isso, essas células podem se juntar e formar um híbrido tetraploide, por exemplo. Nesse tipo de hibridização, os híbridos podem apresentar a totalidade de ambos os genomas das cepas parentais utilizadas, diferentemente do esporo-esporo, onde uma parte do genoma é perdida. Apesar disso, são híbridos que geralmente são instáveis, precisando passar por processos de estabilização e a frequência da hibridização não é elevada (KROGERUS et al., 2017; PÉREZ-TRAVÉS et al., 2012). Para aumentar a frequência de hibridização, é possível fazer uma transformação por meio da inserção de um plasmídeo, que induz a troca do tipo sexual e permite a formação do híbrido. Porém, esse plasmídeo precisa conter um gene de resistência a algum antibiótico para permitir a seleção da cepa na qual a inserção do plasmídeo for realizada e, mesmo que o plasmídeo seja eliminado após uma sucessão de novas gerações, o híbrido é considerado OGM (ALEXANDER et al., 2016; KROGERUS et al., 2017).

Por fim, o último método citado para a criação de um híbrido é por meio da fusão de protoplasto. O protoplasto compreende a parte interna da célula, ou seja, o citoplasma e o núcleo. Sendo assim, para realizar a fusão, tem-se a digestão da parede celular das cepas parentais e a união dos protoplastos das duas células, seguido da regeneração da parede celular. Com isso, tem-se um híbrido com todo o material de ambas as células parentais. Esse método, além de ser uma opção para leveduras que não produzem esporos viáveis, também permite a criação de um híbrido entre espécies que, naturalmente, não acasalariam. Porém, os híbridos formados apresentam instabilidade no genoma, além de baixa frequência de hibridização e são

considerados OGMs (KROGERUS et al., 2017). A Figura 8 apresenta um resumo dos métodos aqui apresentados.

Figura 8 – Métodos de hibridização. (A) Cruzamento esporo-esporo. (B) Cruzamento raro.

(C) Fusão de protoplasto.

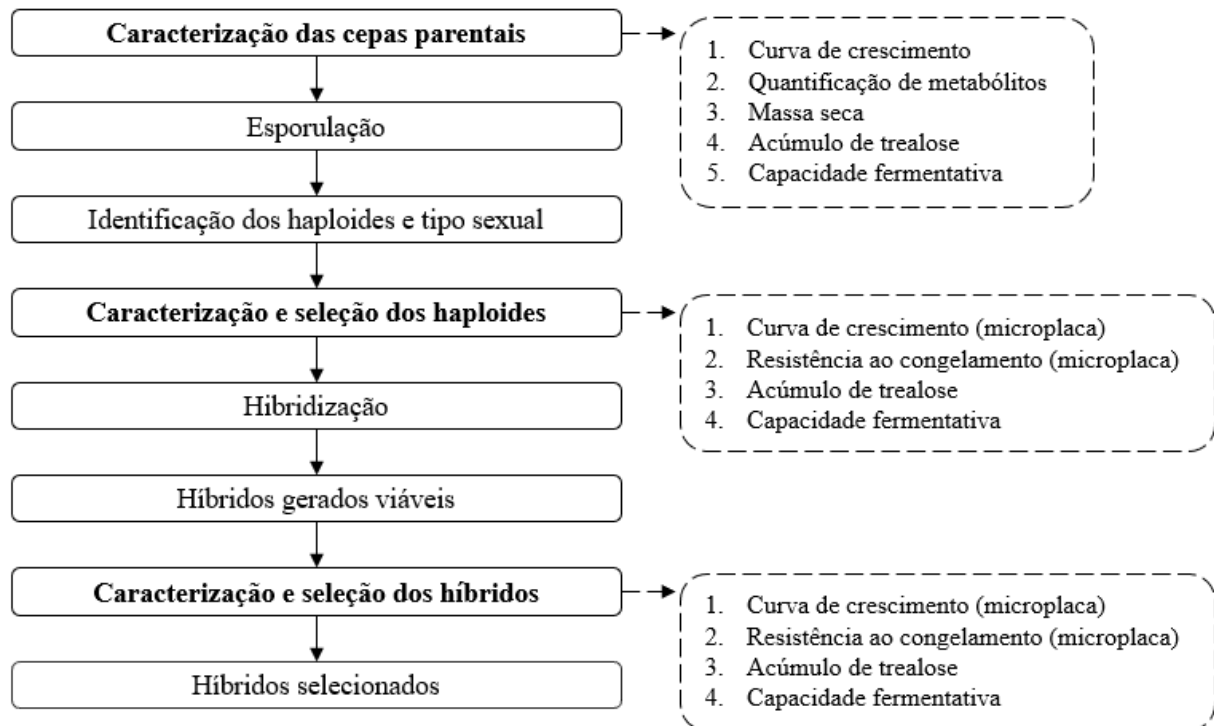


Fonte: Adaptado de Krogerus et al. (2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos serão apresentados de forma integrada visando a melhor compreensão das metodologias utilizadas. Um esquema contendo todas as etapas desenvolvidas é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema das etapas realizadas nesse trabalho



Fonte: o autor (2022)

4.1 Cepas utilizadas

Para o desenvolvimento dos híbridos foram utilizadas duas cepas parentais, ambas *S. cerevisiae*, uma oriunda do processo de produção de etanol (PE-2), e outra da indústria de panificação (FLE), ambas fornecidas pelo Prof. Luiz Carlos Basso (ESALQ-USP, Brasil). Optou-se pela escolha da cepa de panificação pelas características desejadas relacionadas ao aroma e à capacidade fermentativa. Enquanto a cepa utilizada no processo de produção de etanol apresenta resistência à diversas condições de estresse, visto que foi uma cepa selvagem isolada do próprio processo e possui maior acúmulo tanto de glicerol, quanto trealose, metabólitos associados à resistência ao estresse (BASSO et al., 2008).

Para todas as leveduras, ou seja, para as cepas parentais, os haploides obtidos por meio da esporulação e os híbridos gerados, os mesmos meios para crescimento, propagação, manutenção e estoque foram utilizados. Todos os meios preparados e os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min.

4.1.1. Meios de cultivo

Foram utilizados quatro meios de cultura distintos, compostos por extrato de levedo (INLAB), peptona bacteriológica (INLAB), dextrose DifcoTM (BD), maltose monohidratada (Sigma-Aldrich) e Ágar (Sigma-Aldrich), variando o tipo ou a concentração de açúcar utilizado. Suas composições encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados

Meios	Extrato de levedura (g·L ⁻¹)	Peptona (g·L ⁻¹)	Dextrose (g·L ⁻¹)	Maltose (g·L ⁻¹)	Ágar (g·L ⁻¹)
YPD10	10,0	20,0	10,0	-	-
YPD20	10,0	20,0	20,0	-	-
YPD20-sólido	10,0	20,0	20,0	-	20,0
YPD50	10,0	20,0	50,0	-	-
YPM10	10,0	20,0	-	10,0	-

Fonte: o autor (2022)

A sigla YPD vêm dos termos em inglês *Yeast extract*, *Peptone* e *Dextrose*, sendo comum sua utilização ao se apresentar meios de cultura. As concentrações de cada reagente, em % ou em g·L⁻¹, normalmente são apresentadas entre parênteses na sequência da sigla. Neste trabalho, como todos os meios para crescimento possuem a mesma concentração de extrato de levedo e peptona, para facilitar a identificação, o número na sequência da sigla representa a concentração em g·L⁻¹ do açúcar presente, sendo ele dextrose (D) ou maltose (M). Os meios YPD10 e YPM10 (CODÓN et al., 2003) foram utilizados para construção das curvas de crescimento das leveduras. Esses meios foram escolhidos visando a não limitação do crescimento e os açúcares utilizados, maltose e dextrose, foram escolhidos por serem os mesmos presentes na massa de pão após a quebra do amido presente na farinha de trigo. Já para os demais crescimentos, como, por exemplo, para replaqueamento ou crescimento em microplaca, utilizou-se YPD20. Em todos os casos, uma colônia isolada previamente crescida em uma placa de Petri contendo YPD20-sólido foi adicionada ao meio escolhido e incubado *overnight*⁴ em *orbital shaker* (C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, EUA) a 180 rpm e 30 °C.

⁴ Procedimento no qual o inóculo é deixado em crescimento durante a noite, totalizando pelo menos 12 h de crescimento.

4.1.2. Preparação do inóculo

O preparo do inóculo foi o procedimento utilizado para a obtenção de biomassa microbiana para a realização do teste de resistência ao congelamento e capacidade fermentativa.

Para tanto, uma colônia retirada da placa de Petri contendo YPD20-sólido foi inoculada em 100 mL de YPD50, sendo mantida em *orbital shaker* a 180 rpm e 30 °C para crescimento *overnight*. Na sequência, o conteúdo foi centrifugado (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, EUA) a 4000 rpm (1699 g) por 15 min e lavado quatro vezes com água Milli-Q. Essa lavagem consistiu em dissolver o *pellet* em água Milli-Q, centrifugar por 5 min a 4000 rpm (1699 g) e descartar o sobrenadante. O precipitado celular obtido foi utilizado logo após a centrifugação.

4.1.3. Manutenção das cepas e geração do estoque

Para manutenção das cepas e verificação de possível contaminação, após crescimento *overnight* em YPD20, as cepas foram estriadas com o auxílio de alça estéril em placas de Petri contendo YPD20-sólido e foram incubadas por 48 h à 30 °C em estufa (N480, Nova Ética, Brasil). Após esse período, foram mantidas em refrigeração à 4 °C. A necessidade de replicação das placas foi avaliada de acordo com a espessura e a umidade do meio.

Para o preparo das soluções estoque, primeiramente, um inóculo foi obtido a partir da adição de uma colônia isolada, coletada de uma placa de Petri previamente crescida, em um *erlenmeyer* contendo 50 mL de YPD20. Esse inóculo foi incubado *overnight* em *orbital shaker* (C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, EUA) a 180 rpm e 30 °C. Após o crescimento, adicionou-se asépticamente 10 mL de glicerol (20 g/100 g). A solução foi homogeneizada e 1,5 mL foram transferidos para criotubos que foram armazenados a – 80 °C (CryoCube F570, Eppendorf, Alemanha).

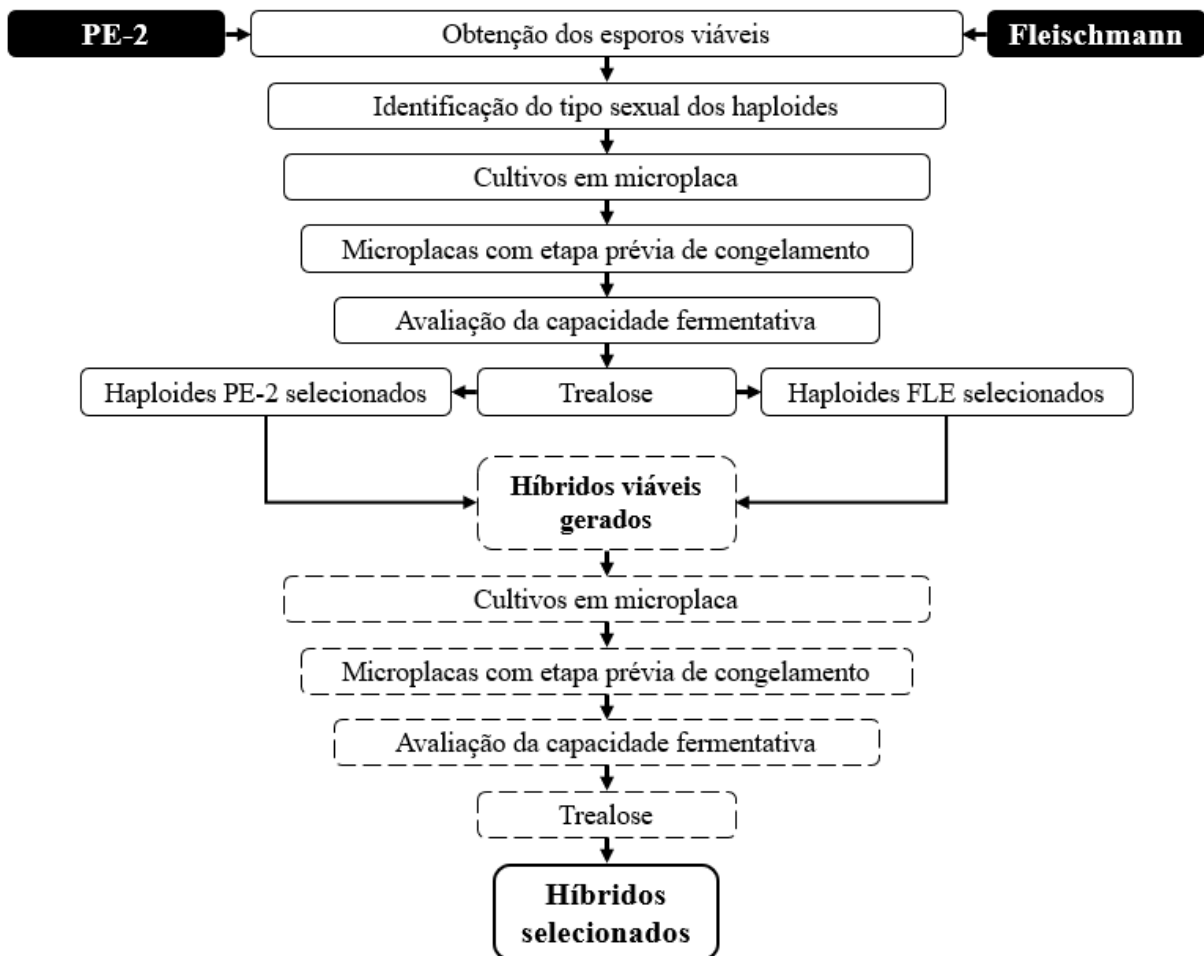
4.2 Caracterização fisiológica das cepas

Para a caracterização fisiológica das cepas parentais, foram feitas curvas de crescimento em YPD10 e YPM10, quantificação dos metabólitos, curvas de crescimento em YPD20 em microplaca, quantificação de trealose e glicerol, assim como um teste de resistência ao congelamento e avaliação da capacidade fermentativa após o congelamento. Essa caracterização é necessária a comparação dos parâmetros fisiológicos entre as cepas parentais, os haploides obtidos e os híbridos gerados.

Para os haploides, foi necessária a realização de uma triagem para a seleção das melhores cepas. Para isso, foram construídas curvas de crescimento em YPD20 e YPM10 em microplacas; curvas de crescimento em YPD20 em microplacas congeladas e descongeladas antes da construção da curva; teste de resistência ao congelamento e avaliação da capacidade

fermentativa e quantificação de trealose. Por fim, a caracterização dos híbridos obtidos ocorreu pela repetição dos mesmos testes utilizados para os haploides, a fim de garantir que as características escolhidas nos haploides utilizados permaneceram nos híbridos formados. Um esquema contendo as etapas de seleção dos haploides e da caracterização dos híbridos encontra-se na Figura 10.

Figura 10 – Esquema das etapas de seleção dos haploides e da caracterização dos híbridos



Fonte: o autor (2022)

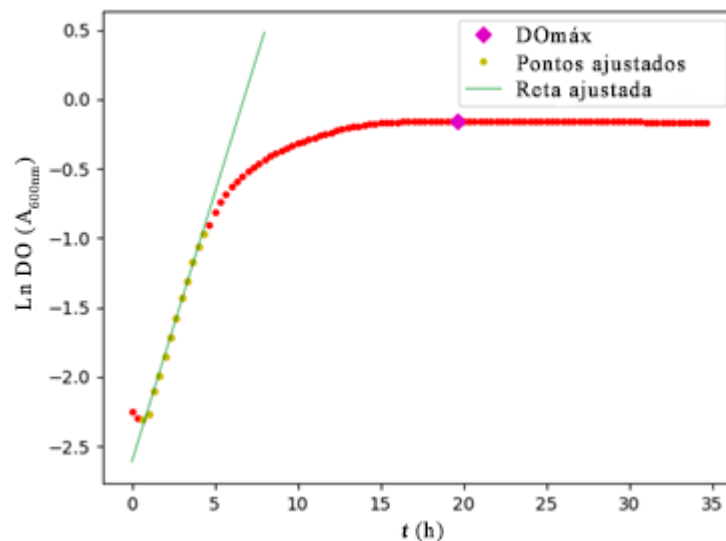
4.2.1. Curvas de crescimento

Para a avaliação das cinéticas (curvas) de crescimento das cepas parentais, pré-inóculos foram feitos a partir da adição de uma colônia isolada em 50 mL de YPD10 e YPM10 acondicionados em *erlenmeyers* de 250 mL para crescimento *overnight* em *orbital shaker* (C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, EUA) a 30 °C e 180 rpm. Mediu-se a densidade ótica (*DO*) dos pré-inóculos em um espectrofotômetro UV-Vis (Q898U2M5, Quimis, Brasil) utilizando-se 600 nm de comprimento de onda (A_{600}). A partir desse dado, calculou-se o volume necessário de pré-inóculo para iniciar a curva de crescimento com um inóculo de *DO* aproximadamente 1 (CODÓN et al., 2003).

Para a avaliação das curvas de crescimento dos haploides e dos híbridos gerados, foram utilizadas microplacas de 96 poços e as A_{600} foram lidas utilizando um leitor de microplacas (Infinite M200PRO, TECAN, Suíça) a cada 20 min por 20 h. Para isso, algumas modificações foram feitas, como a DO inicial ser aproximadamente 0,1, a quantidade de meio utilizada passou a ser 200 μL por poço e foram utilizados YPD20 e YPM10. Essa metodologia também foi aplicada às cepas parentais para viabilizar a comparação e seleção dos haploides.

A velocidade específica de crescimento, μ (h^{-1}) e o tempo da fase *lag*, λ (h) foram obtidos através da linearização dos dados experimentais de A_{600} . Para tornar a análise o mais objetiva possível, utilizou-se um programa em Python para plotar o logaritmo natural da $DO_{600\text{nm}}$ em função do tempo e ajustar um modelo linear à região na qual o maior coeficiente angular foi encontrado (Figura 11) (CUNHA, 2022).

Figura 11 – Exemplo de uma curva obtida no programa em Python onde é possível observar os pontos utilizados para o ajuste de um modelo linear



Fonte: o autor (2022)

O coeficiente angular da reta obtida na fase de crescimento exponencial é o μ (Equação 1), enquanto λ pode ser obtido pelo coeficiente linear. Enquanto a DO está relacionada à concentração celular existente no meio, a fase *lag* (λ) indica o tempo de adaptação da cepa no meio (ZWIETERING et al., 1990).

$$\ln DO = \mu t + \lambda \quad (1)$$

4.2.2. Quantificação dos metabólitos

Para a análise dos metabólitos, a cada hora uma alíquota de 1 mL foi retirada dos cultivos e centrifugada (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha) por 5 min a 4000 rpm (1500

g). O sobrenadante foi coletado, filtrado com a utilização de um filtro de seringa de 0,22 μm e analisado por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector de índice de refração (Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japão). Calibrações lineares foram feitas para realizar a quantificação de dextrose, maltose, etanol e glicerol injetados na corrida. A separação foi feita por meio da utilização da coluna Bio-Rad HPX-87H, a 60 °C, com H_2SO_4 0,5 M como fase móvel, 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de velocidade de eluição e 10 μL de volume de injeção. Essa quantificação apenas foi feita para os cultivos das cepas parentais realizadas em *erlenmeyers*.

4.2.3. *Massa seca*

Para a determinação de massa seca de leveduras, mediu-se a *DO* de uma cultura previamente crescida *overnight* a 30 °C e 180 rpm e alíquotas de 10 mL foram retiradas e filtradas a vácuo com utilização de uma membrana de 0,2 μm de tamanho de poro, previamente seca em estufa (Orion 515, FANEM, Brasil) à 80 °C por 24 h e pesada em balança analítica (JK-200, Chyo, Japão). Após a filtração, a membrana contendo a amostra foi seca em estufa à 80 °C por 24 h e pesada novamente (SILVA, 1994). A massa seca obtida foi relacionada com a *DO* medida.

4.2.4. *Trealose*

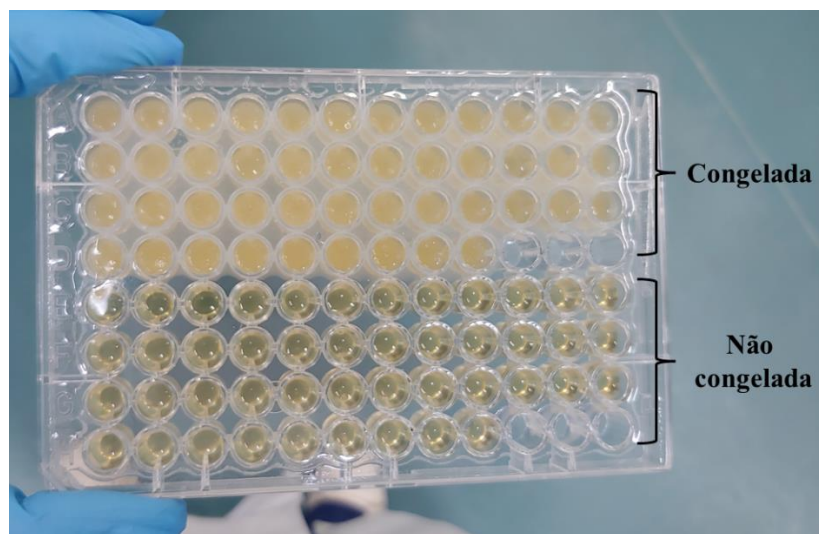
Para a quantificação do conteúdo de trealose intracelular, 200 mg de levedura foram obtidos após crescimento em YPD50 *overnight* em *shaker* (C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, EUA) a 180 rpm e 30 °C. Essa suspensão foi transferida para um tubo de fundo cônico no qual foram adicionados 5 mL de água Milli-Q a 2 °C. Após agitação do tubo em vórtex (MixMate, Eppendorf, Alemanha), ele foi centrifugado (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha) a 4000 rpm (1699 g) por 6 min, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi seco internamente. O *pellet* foi ressuspensão com 2 mL de ácido tricloroacético P.A (Synth) 0,5 M em vórtex e a solução foi deixada em repouso por 20 min. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 6 min a 4000 rpm (1699 g). O sobrenadante foi coletado, filtrado com a utilização de um filtro de seringa de 0,22 μm e analisado por HPLC com detector de índice de refração (Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japão) da mesma forma que os metabólitos do processo fermentativo.

4.2.5. *Resistência ao congelamento em cultivo em microplaca*

O teste de resistência ao congelamento procedeu-se através da avaliação das cinéticas de crescimento em microplacas, da mesma forma como apresentado no item 4.1.1, porém

acrescidos de uma etapa prévia de congelamento da microplaca em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CVU26, Consul, Brasil) por 1 h e de descongelamento por 10 min, antes da inserção da microplaca no leitor (Infinite M200PRO, TECAN, Suíça). Para que a comparação entre a condição com etapa prévia de congelamento e a condição sem essa etapa pudesse ser realizada de forma mais precisa, a microplaca foi montada de forma a conter ambas as condições, ou seja, metade da placa foi preparada primeiro e congelada e, na sequência, descongelada e a outra metade montada (Figura 12).

Figura 12 – Foto de uma microplaca montada para o experimento de resistência ao congelamento com microplaca com etapa prévia de congelamento

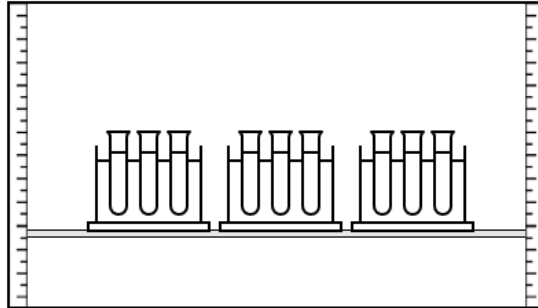


Fonte: o autor (2022)

4.2.6. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo

A avaliação da capacidade fermentativa após o congelamento foi realizada em tubos de vidro de 20 mL com diâmetro de $(1,58 \pm 0,01)$ cm, nos quais foram adicionados 3,3 mL de água destilada, 2 g de farinha de trigo e 0,2 g de precipitado celular. Essa solução foi homogeneizada com a utilização de um agitador mecânico (Modelo 715, Fisatom, Brasil), obtendo-se uma suspensão aquosa de farinha de trigo. Os tubos foram então congelados em freezer horizontal à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (H500, Electrolux, Suécia) por 24 h, descongelados e colocados em estufa (N480, Nova Ética, Brasil) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O crescimento foi registrado a cada 10 min durante 3 h, com a utilização de uma câmera Nikon D60 – Objetiva 18-55 mm posicionada na frente da estufa. A análise foi feita baseado na graduação de duas régua fixadas nas laterais estufa (Figura 13). Essa metodologia foi adaptada de Codón et al. (2003).

Figura 13 – Esquema do arranjo experimental para o teste de capacidade fermentativa após o congelamento. O esquema representa uma visão da estufa, com as duas régua fixadas nas laterais e os tubos contendo as suspensões



Fonte: o autor (2022)

Para esse experimento, utilizou-se a diferença na altura da suspensão, $(H_t - H_0)$, onde H_t representa a altura (cm) no tempo t e H_0 a altura inicial, e foram avaliadas as porcentagens de crescimento, obtidas de acordo com a Equação 2.

$$\text{Porcentagem de crescimento} = \frac{(H_t - H_0)}{H_0} \times 100 \quad (2)$$

4.3 Esporulação e hibridização

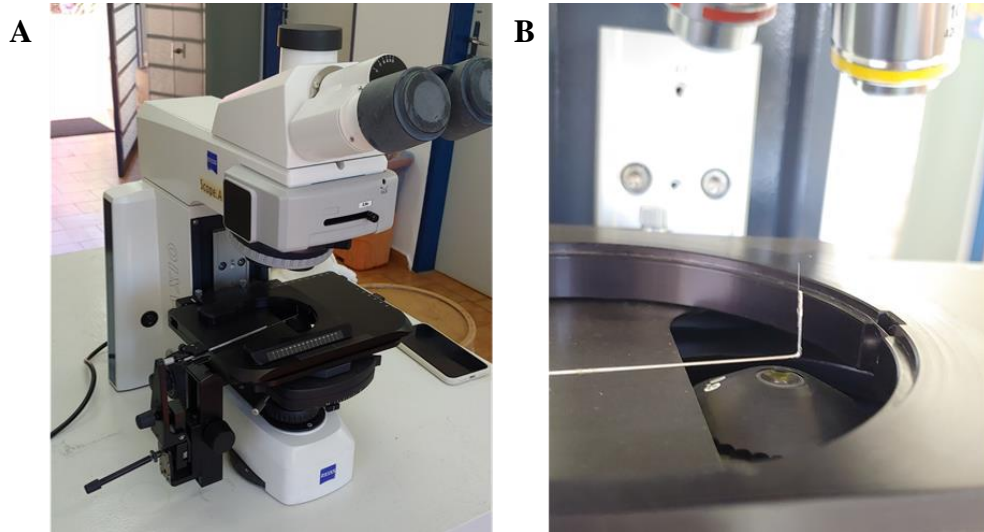
Para a obtenção dos esporos oriundos das cepas de *S. cerevisiae* PE-2 e FLE, adicionou-se uma colônia isolada previamente crescida em YPD20-sólido em meio para esporulação, composto por 0,02 g/100 g D-Rafinose (Êxodo Científica) e 0,3 g/100 g de acetato de potássio P.A (Synth), que foi incubado em *orbital shaker* a 220 rpm e 30 °C (BASSO, 2015; SPENCER; SPENCER; BRUCE, 1989). A formação das tétrades foi verificada por microscópio ótico (CH-2, Olympus, Japão) utilizando-se lente objetiva de 100x.

4.3.1. Dissecação das tétrades

Após obtenção das tétrades, procedeu-se à etapa de dissecação para obtenção dos esporos. Para isso, 2 mL do meio contendo as tétrades foram centrifugados (GS-15 Centrifuge, Beckman Coulter, EUA) a 4000 rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante e o ressuspendeu em 450 µL de água destilada estéril e 40 µL de solução contendo a enzima zymolase (ZymoResearch® 10 units/uL), mercaptoetanol 10 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5. Essa solução foi mantida em banho termostático (Banho Maria Modelo 102, FANEM, Brasil) a 37 °C por 15 min. Após esse tempo, 10 µL da solução foram escorridos na lateral de uma placa de Petri contendo meio específico para micromanipulação (5 g·L⁻¹ de extrato de levedo, 5 g·L⁻¹ de peptona, 20 g·L⁻¹ de dextrose e 20 g·L⁻¹ de ágar) e a separação dos esporos foi feita utilizando-se um micromanipulador (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha),

apresentado na Figura 14. Ao final da separação, as placas foram incubadas (Câmara Incubadora B.O.D Mod. 347 CD, FANEM, Brasil) a 28 °C por 72h (BASSO, 2015).

Figura 14 – Microscópio Scope A1 AXIO da Carl Zeiss com micromanipulador acoplado. (A) Microscópio completo. (B) Agulha de fibra de carbono utilizada para fazer as separações



Fonte: o autor (2022)

4.3.2. Identificação do tipo sexual dos haploides

A identificação do tipo sexual dos haploides foi realizada pela formação de halo empregando-se cepas *testers* com tipo sexual conhecido. Para isso, primeiramente, *testers* com tipo sexual conhecido, KFY138 para MAT α e KFY139 para MAT α , foram estriadas em YPD20-sólido. Na sequência, os haploides foram suspensos em água e, então, 5 μ L foram gotejados nas placas contendo uma camada da *tester* α ou α . As placas foram incubadas a 30 °C até que a formação dos halos fosse observada. A formação de halo é um indicativo de que o haploide possui o mesmo tipo sexual da *tester* estriada na placa (BASSO, 2015; MORTIMER; HAWTHORNE, 1696; PROCÓPIO, 2021).

4.3.3. Formação dos híbridos

Após a definição dos tipos sexuais dos haploides, os híbridos foram gerados pela junção de haploides com tipos sexuais distintos. Para isso, misturou-se biomassa celular fresca de cada um dos haploides, cultivada previamente por 48 h em placa de Petri contendo YPD20-sólido, em outra placa de Petri com o mesmo meio e aguardou-se cerca de 3 h até a formação dos zigotos. Após esse período, com a utilização de um microscópio (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha) com lente objetiva de 100x, observou-se a formação dos zigotos. Uma quantidade de biomassa foi, então, riscada em uma placa de Petri contendo meio específico para

micromanipulação ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedo, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de dextrose e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ágar) e a separação dos zigotos foi feita utilizando-se um microscópio (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha) com micromanipulador acoplado. Ao final da separação, as placas foram incubadas (Câmara Incubadora B.O.D Mod. 347 CD, FANEM, Brasil) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h (BASSO, 2015).

Para verificar se as colônias existentes na placa eram híbridos diploides, foi realizado o teste de identificação do tipo sexual, no qual a não formação dos halos indicava uma célula diploide, além da esporulação das colônias, com a formação de tétrades como mais um indício de célula diploide.

4.4 Análise estatística

Os dados de velocidade específica de crescimento (μ), densidade ótica máxima ($DO_{\text{máx}}$) e tempo da fase lag (λ) foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se os softwares Statgraphics Centurion XVI v.16.1.15 e Minitab 2021 v.20.4. Para detectar diferenças significativas entre os valores, foi realizada a análise de variância (ANOVA) Two-Way para análises de comparação com dois meios de crescimento distintos e One-Way onde o meio permaneceu constante. Em ambos os casos, foi utilizado intervalo de confiança de 95 %. Com exceção da quantificação do acúmulo de trealose intracelular, realizado em duplicata, todos os ensaios realizados nesse trabalho foram feitos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa seção apresentará os resultados e encontra-se dividida de forma a avaliar primeiramente as cepas parentais, seguindo para os haploides obtidos e, por fim, apresentando os resultados para os híbridos gerados.

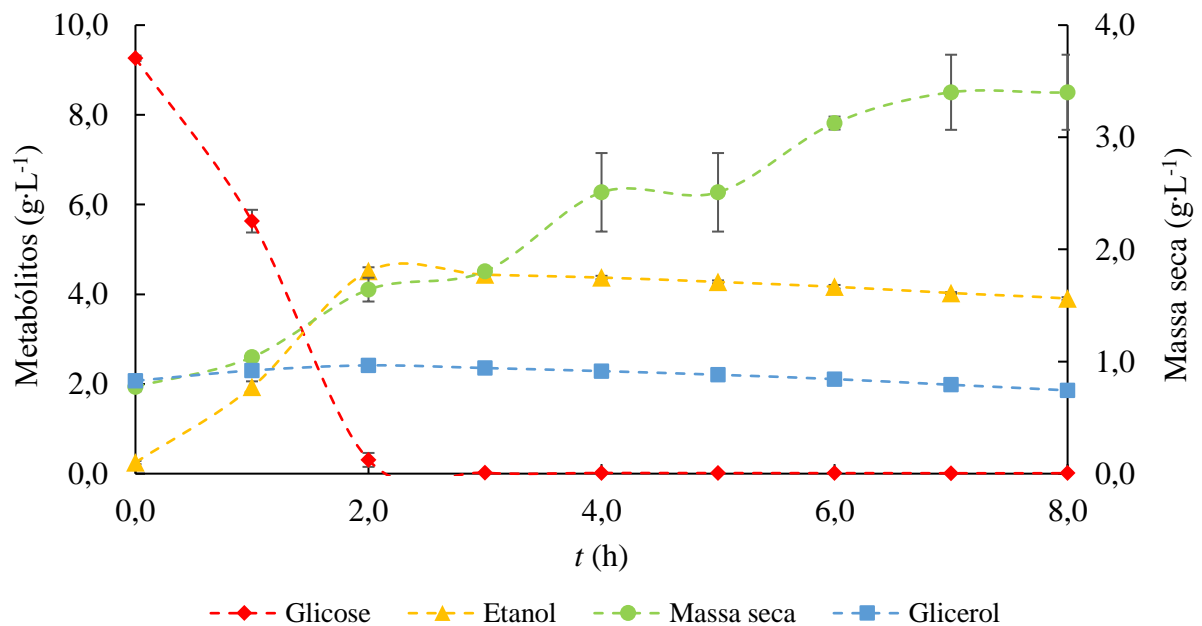
5.1 Cepas parentais

Uma caracterização das cepas parentais foi realizada para que, posteriormente, uma comparação entre elas pudesse ser feita. Além disso, comparações entre as características dos haploides, híbridos e as cepas parentais foram realizadas.

5.1.1. Curva de crescimento e quantificação de metabólitos

A curva de crescimento da cepa parental FLE em YPD10, assim como o consumo e a produção de metabólitos são apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Curva de crescimento da cepa parental FLE em meio YPD10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de glicose



Fonte: o autor (2022)

É possível observar que após 2 h a glicose ($9,262 \pm 0,059$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi totalmente consumida pela levedura e foram produzidos ($4,515 \pm 0,087$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol. Porém, apesar do consumo total da glicose presente no meio, a cepa continuou crescendo, atingindo após 8 h de experimento a produção de ($3,428 \pm 0,038$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de massa seca. A concentração de glicerol no meio foi a que menos variou durante as 8 h de experimento, oscilando entre ($0,966 \pm 0,018$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e ($0,743 \pm 0,015$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por fim, ajustando-se o modelo apresentado na Equação 1 à fase

exponencial, tem-se os valores de μ de $(0,272 \pm 0,035) \text{ h}^{-1}$ e de λ de $(1,303 \pm 0,056) \text{ h}$ com um r^2 de $(0,934 \pm 0,033)$.

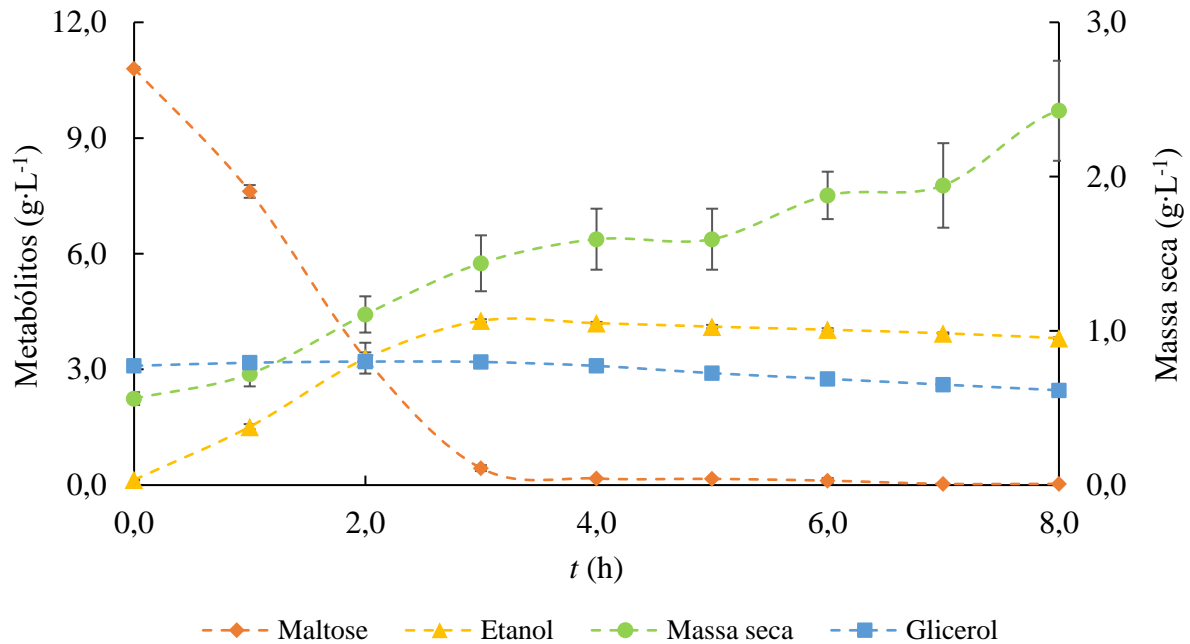
Na panificação, ao se avaliar o desempenho de uma cepa, o foco é a capacidade fermentativa da levedura, visto que a liberação de CO_2 é responsável pelo crescimento da massa. Portanto, é importante avaliar a produção de etanol, visto que está diretamente ligada à produção de CO_2 através da reação química da fermentação apresentada a seguir:



Sabe-se que a conversão máxima teórica de glicose em etanol, quando não há reciclo e uma alta densidade de células (17 % em massa), é em torno de 51 % (SANTOS et al., 2017). Portanto, levando-se em consideração que a quantidade inicial de glicose no meio foi de $(9,262 \pm 0,059) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a produção de etanol foi de $(4,515 \pm 0,087) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, tem-se uma conversão de $(48,744 \pm 1,248) \%$, próxima ao máximo teórico. Além disso, baseado na estequiometria da Equação 3, é possível calcular a quantidade de CO_2 produzida, chegando em $(4,313 \pm 0,083) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os valores de produção e conversão de etanol são inferiores aos encontrados na literatura, em que as condições de cultivo são diferentes, com maiores quantidades de açúcar, em meios mais complexos e com vários reciclos da levedura, visando a maior produção de etanol para sua utilização como combustível (BASSO et al., 2008; CARVALHO et al., 2020).

Além do crescimento em YPD10, foi realizado o crescimento em YPM10. Na Figura 16, a curva de crescimento da FLE em meio YPM10, assim como a produção de metabólitos e o consumo da maltose são apresentados. Comparando a maltose com a glicose, a maltose é um dissacarídeo, portanto um açúcar mais complexo, o qual a levedura apenas consome quando não há glicose presente no meio. Diferentemente da glicose, que tem rápida entrada na via metabólica glicolítica, a maltose necessita de um sistema ativo para transportá-la pela membrana celular e, portanto, espera-se que o consumo da maltose seja mais dificultado em relação ao da glicose (HEITMANN; ZANNINI; ARENDT, 2018). Isso é observado ao se comparar a Figura 15 com a Figura 16. Enquanto a glicose foi totalmente consumida nas primeiras 2 h de ensaio, foram necessárias 3 h e com relação aos metabólitos, foram produzidos $(4,261 \pm 0,040) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol.

Figura 16 – Curva de crescimento da cepa parental FLE em meio YPM10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de maltose



Da mesma maneira que em YPD10, a cepa continuou crescendo, atingindo após 8 h de experimento a produção de $(2,817 \pm 0,096)$ g·L⁻¹ de massa seca. Por fim, a concentração de glicerol no meio, durante as 8 h de experimento, variou entre $(0,801 \pm 0,011)$ g·L⁻¹ e $(0,615 \pm 0,002)$ g·L⁻¹. Além disso, ajustando-se o modelo da Equação 1, tem-se os valores de μ de $(0,345 \pm 0,041)$ h⁻¹ e de λ de $(0,992 \pm 0,076)$ h com um r^2 de $(0,953 \pm 0,081)$.

Seguindo para a mesma análise de conversão de etanol realizada para YPD10 e levando-se em consideração que a quantidade inicial de maltose no meio foi de $(10,801 \pm 0,042)$ g·L⁻¹, houve uma conversão de $(39,452 \pm 0,518)$ %. Considerando o que já foi apresentado anteriormente sobre a dificuldade do consumo da maltose, a menor conversão em etanol era esperada, o que também impacta na menor produção de CO₂, sendo, neste caso, $(4,071 \pm 0,038)$ g·L⁻¹.

Ao analisar a curva de crescimento da outra cepa parental *S. cerevisiae* PE-2 em YPD10 (Figura 17), assim como o consumo e a produção de metabólitos durante o processo de fermentação, é possível observar um perfil diferente nas curvas de consumo de glicose, assim como de produção de massa seca. Enquanto para a FLE o consumo da glicose ocorre nas primeiras 2 h de ensaio, para a PE-2 foi mais lento, de 6 h. Consequentemente, o crescimento e a produção de etanol também apresentam o pico mais tardio. Ao final das 8 h de cultivo, foram produzidos $(4,229 \pm 0,265)$ g·L⁻¹ de etanol e $(2,514 \pm 0,015)$ g·L⁻¹ de massa seca, assim como

($0,323 \pm 0,003$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol. Além disso, ajustando-se os dados à Equação 1, foram obtidos os valores de μ de ($0,507 \pm 0,006$) h^{-1} e de λ de ($0,329 \pm 0,010$) h com um r^2 de ($0,996 \pm 0,002$).

Figura 17 – Curva de crescimento da cepa parental PE-2 em meio YPD10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de glicose



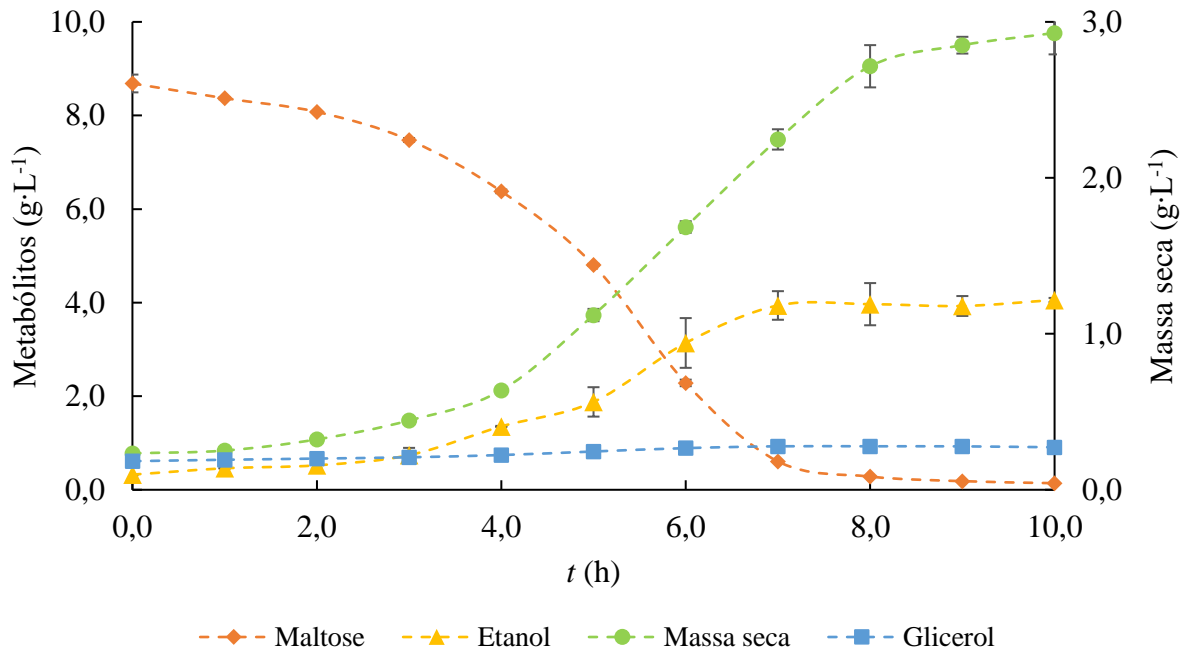
Fonte: o autor (2022)

Levando-se em consideração que a quantidade inicial de glicose no meio foi de ($9,035 \pm 0,017$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a produção de etanol foi de ($4,229 \pm 0,265$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, tem-se uma conversão de ($46,811 \pm 3,021$) %, próxima ao máximo teórico (LINO; BASSO; SOMMER, 2018; SANTOS et al., 2017). Para comparação da produção de etanol com a literatura, tem-se o mesmo problema que o apresentado para a FLE, onde os trabalhos apresentam condições muito diferentes das empregadas neste experimento, visando o aumento da produção de etanol para utilização como combustível (BASSO et al., 2008; CARVALHO et al., 2020). Por fim, baseado na estequiometria da Equação 3, calculou-se a quantidade de CO_2 produzido, chegando em ($4,040 \pm 0,253$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Já para o crescimento da PE-2 em YPM10 (Figura 18), da mesma forma que o apresentado para a FLE, foram necessárias 2 h a mais para que o açúcar fosse totalmente consumido, influenciando também o tempo necessário para atingir a fase estacionária, passando de 8 h para 10 h. Com relação às concentrações de metabólitos, observou-se uma produção de ($4,056 \pm 0,044$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol, ($3,007 \pm 0,030$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de massa seca e ($0,272 \pm 0,001$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de

glicerol. Por fim, ao utilizar a Equação 1 na fase exponencial linearizada foram obtidos os parâmetros μ de $(0,407 \pm 0,005) \text{ h}^{-1}$ e λ de $(0,446 \pm 0,039) \text{ h}$, com um r^2 de $(0,991 \pm 0,001)$.

Figura 18 – Curva de crescimento da cepa parental PE-2 em meio YPM10, representada pela produção de massa seca, glicerol e etanol, assim como pelo consumo de maltose



Fonte: o autor (2022)

Seguindo para a mesma análise de conversão de etanol e levando-se em consideração que a quantidade inicial de maltose no meio foi de $(8,684 \pm 0,190) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, houve uma conversão de $(46,712 \pm 1,533) \%$, também próxima do máximo teórico, enquanto a produção de CO_2 foi de $(3,875 \pm 0,042) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Avaliando a conversão de etanol da PE-2 nos dois meios, é possível inferir que essa cepa metaboliza a maltose mais facilmente que a FLE, e que, os valores das conversões em YPD10 e YPM10 foram similares. A facilidade para fermentar a maltose é uma característica interessante no cenário de panificação, visto que existe a presença de grande quantidade de maltose na massa após a quebra da amilose e da amilopectina presentes na farinha de trigo pela enzima α -amilase.

Da análise de variância (ANOVA Two-Way) aplicada nos resultados obtidos de etanol para as duas cepas nos meios YPD10 e YPM10 (Tabela 2), foi verificado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na quantidade de etanol produzido pelas duas cepas em meio YPD10, porém, ao comparar as produções da PE-2 e da FLE em YPM10 e entre as mesmas cepas nos diferentes meios, existe uma diferença significativa, sendo as maiores produções em YPD10.

Tabela 2 – Valores da produção e porcentagem de conversão de etanol das cepas parentais PE-2 e FLE cultivadas em meio YPD10 e YPM10

Cepas	YPD10		YPM10	
	Etanol (g·L ⁻¹)	Conversão (%)	Etanol (g·L ⁻¹)	Conversão (%)
PE-2	4,229 ± 0,265 ^{a, B}	46,811 ± 3,021	4,056 ± 0,044 ^{a, A}	46,712 ± 1,533
FLE	4,515 ± 0,087 ^{a, B}	48,744 ± 1,248	4,261 ± 0,040 ^{b, A}	46,811 ± 3,021

*Médias com letras minúsculas iguais, nas colunas, e letras maiúsculas, nas linhas, não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Na Tabela 3 são apresentados os valores da produção de massa seca das duas cepas nos diferentes meios. Pela análise de estatística (ANOVA Two-Way), não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os valores de massa seca entre as cepas em YPM10, enquanto houve diferença entre as cepas tanto em YPD10, quanto entre as mesmas cepas nos meios diferentes.

Tabela 3 – Valores da produção de massa secas das cepas parentais PE-2 e FLE em meio YPD10 e YPM10

Cepas	YPD10	YPM10
	Massa seca (g·L ⁻¹)	Massa seca (g·L ⁻¹)
PE-2	2,514 ± 0,015 ^{a, A}	3,007 ± 0,030 ^{a, B}
FLE	3,428 ± 0,038 ^{b, B}	2,817 ± 0,096 ^{a, A}

*Médias com letras minúsculas iguais, nas colunas, e letras maiúsculas, nas linhas, não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

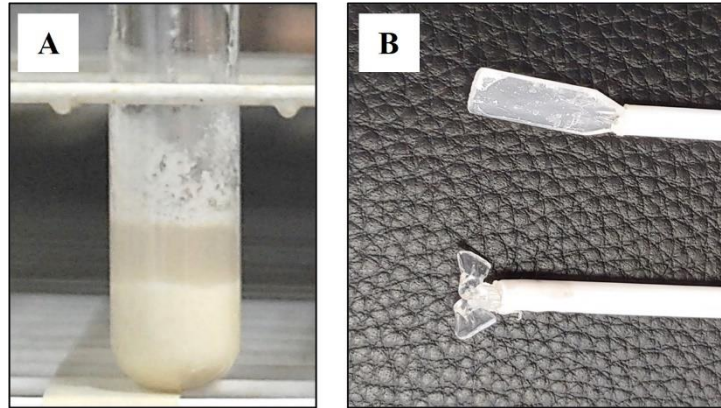
Fonte: o autor (2022)

5.1.2. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo

A capacidade fermentativa das cepas parentais foi avaliada visualmente pela formação das bolhas na massa, oriundas da produção de CO₂ na fermentação, assim como pela diferença entre as alturas ($H_t - H_0$) medidas ao longo do experimento, expressa como porcentagem em relação à altura inicial, como explicado no item 4.2.6.

Para discutir os dados obtidos desse experimento, alguns pontos devem ser levados em consideração. Primeiramente, várias tentativas precisaram ser realizadas para encontrar a melhor forma de homogeneizar a massa dentro do tubo para evitar a decantação da farinha (Figura 19A). Para isso, foi necessária a construção de uma “hélice”, de modo que a farinha pudesse ser hidratada de maneira adequada sob agitação mecânica (Figura 19B). Entretanto, em alguns casos o experimento precisou ser repetido, pois não houve uma hidratação adequada da farinha de trigo e a mesma decantou.

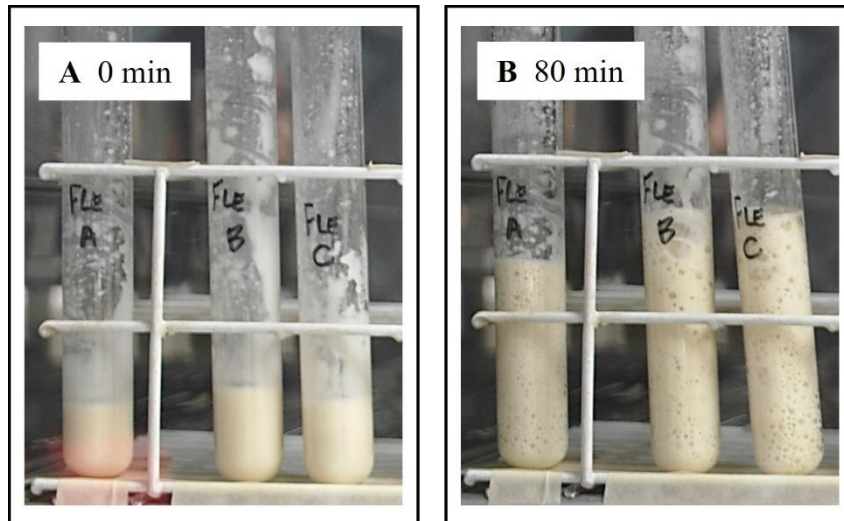
Figura 19 – (A) Exemplo de decantação da farinha, inviabilizando a realização do experimento. (B) Duas configurações de hélices construídas para homogeneizar a suspensão dentro dos tubos



Fonte: o autor (2022)

Na Figura 20, apresentada a seguir, é possível ver o crescimento e as bolhas formadas pela liberação de CO_2 pela levedura durante a fermentação. Esse experimento, realizado com a FLE sem congelamento, serviu de parâmetro para comparação com todas as cepas estudadas após o congelamento.

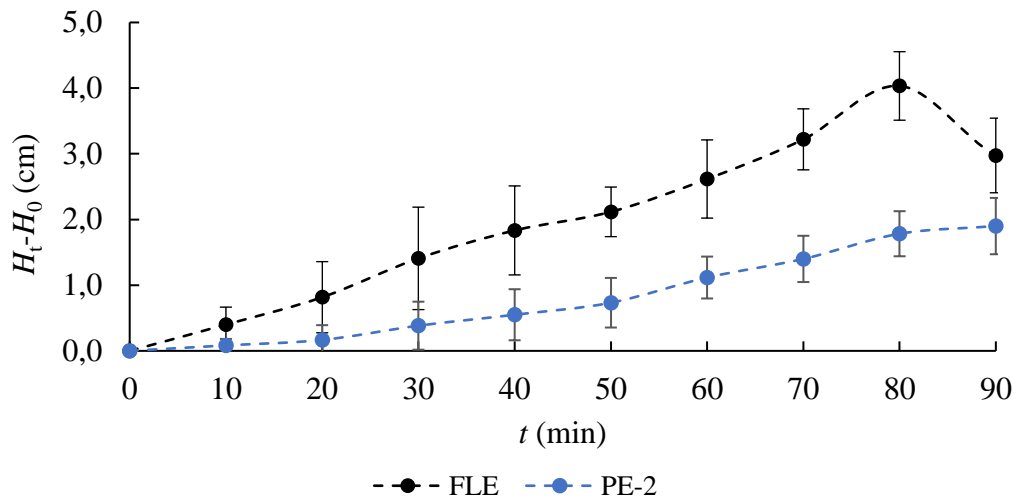
Figura 20 – Experimento de capacidade fermentativa da FLE, sem congelamento. (A) Início do experimento. (B) Após 80 min de fermentação



Fonte: o autor (2022)

Apesar do experimento ter 3 h de duração, na Figura 21 as curvas mostram a evolução da altura da massa até 90 min, para a FLE, sem congelamento, e a PE-2, após o congelamento, usualmente considerado o tempo de fermentação do pão francês, dependendo das condições empregadas (CARR et al., 2006; ROUILLE et al., 2010; SOMMIER et al., 2005).

Figura 21 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo para a FLE, sem congelamento, e a PE-2, medida durante o experimento de capacidade fermentativa



Fonte: o autor (2022)

Se observa na curva da PE-2, que o crescimento só ocorreu após os primeiros 20 min, enquanto a FLE já apresenta crescimento acentuado desde os primeiros 10 min. A altura máxima atingida nos 90 min da FLE foi superior à da PE-2. Nesse período, a FLE foi responsável pelo aumento de $(131,2 \pm 12,7)$ % na altura da massa, enquanto a PE-2 $(54,2 \pm 17,3)$ %. Esse resultado já era esperado levando-se em consideração que a FLE é uma cepa de panificação, portanto, apresenta um desempenho melhor nesse ambiente.

5.1.3. Acúmulo de trealose

Foi obtido o acúmulo de $(2,3886 \pm 0,0504)$ mg trealose intracelular/g massa seca para a FLE e $(1,2832 \pm 0,2650)$ mg trealose intracelular/g massa seca para a PE-2. Como a trealose é um crioprotetor, esse resultado infere que a FLE provavelmente apresenta maior resistência a estresses relacionados ao congelamento. Porém, como o acúmulo da trealose é diretamente influenciado pelas condições às quais a célula está exposta, pode-se dizer que a FLE sofreu maior estresse em um meio com $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcar, o que pode causar o acúmulo maior de trealose. Isso é uma hipótese viável, visto que a PE-2 é uma cepa oriunda do processo de produção de etanol que, de maneira geral, é feito em meios com mais de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcar.

5.2 Haploides

Para a obtenção dos haploides, as cepas parentais foram submetidas ao procedimento de esporulação a fim de se obter as tétrades com os esporos. A formação das tétrades (Figura 22) foi observada após 3 dias em meio de esporulação para a PE-2 e 5 dias para a FLE.

Figura 22 – Foto tirada no microscópio (CH-2, Olympus, Japão), com a lente objetiva 100x, onde é possível ver a formação das tétrades.



Fonte: o autor (2022)

No micromanipulador, foram separados 90 esporos da PE-2 e 90 da FLE. Após a incubação, 76 esporos da PE-2 e 20 da FLE apresentaram crescimento, sendo considerados viáveis. Na Figura 23, é possível ver a diferença no crescimento dos esporos, assim como a ausência de colônia nos locais onde um esporo foi alocado, visto que foram feitas 10 linhas com 3 esporos por linha.

Figura 23 – Placa contendo esporos da PE-2 após 72 h de crescimento



Fonte: o autor (2022)

Por meio do teste para identificação do tipo sexual dos esporos, também foi verificada a ploidia das cepas, nesse caso, se eram haploides ou diploides. Para melhor visualização dos halos formados, na Figura 24 é mostrada uma das placas em que foi estriada a *tester* MAT α e 24 esporos da PE-2 foram gotejados.

Figura 24 – Placa para realização do teste de identificação sexual contendo *tester* MAT α e esporos da PE-2



Fonte: o autor (2022)

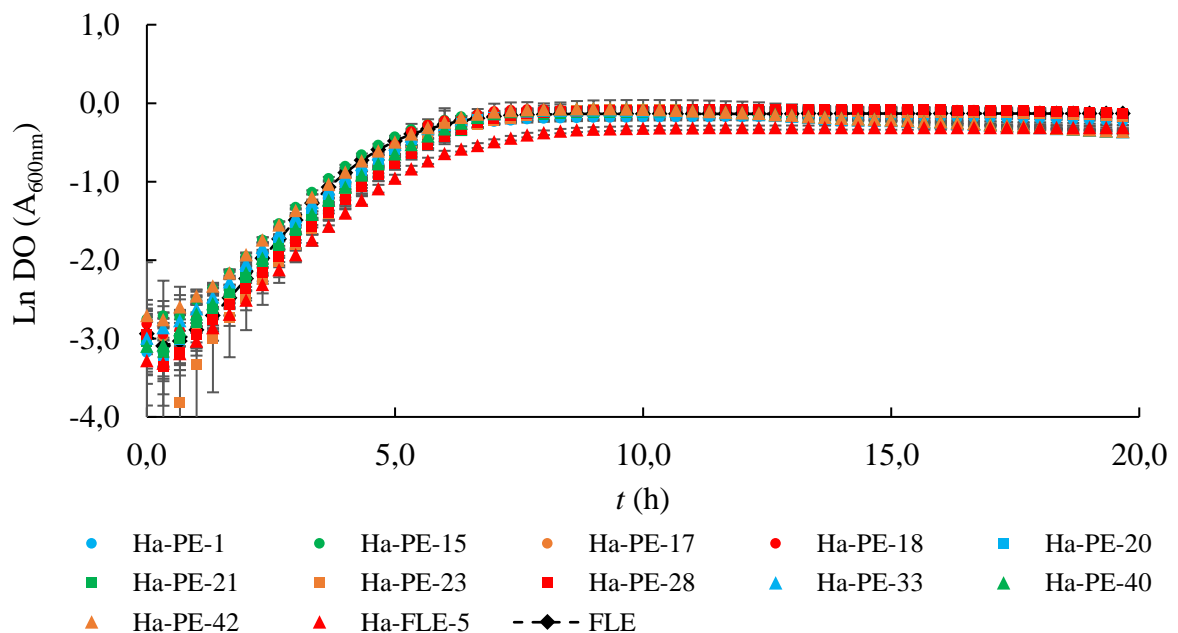
É possível observar a formação dos halos em 3, 7, 11, 12, 14, 20, 21, 23 e 24, indicando que todos esses esporos são haploides do tipo sexual MAT α . O restante dos esporos, onde não houve formação do halo, podem ser haploides do tipo sexual MAT α ou diploides. Para isso, foi necessária a conferência da placa contendo *tester* do tipo sexual MAT α , na qual foi verificada a formação de halo nos esporos 15, 16, 19 e 22. Portanto, esses esporos que não apresentaram halo na placa com *tester* MAT α e apresentaram na com *tester* MAT α , são haploides do tipo sexual MAT α . Os demais esporos, nos quais não houve formação de halo em ambas as placas, são diploides e, portanto, foram descartados. Esse procedimento foi repetido para todas as placas contendo os esporos da PE-2 e da FLE.

Dos 76 esporos da PE-2 estudados, 43 eram haploides, dos quais 29 do tipo sexual MAT α e 14 do tipo sexual MAT α . Dos 20 da FLE, 10 eram haploides, sendo 9 do tipo sexual MAT α e 1 do tipo sexual MAT α . A partir da identificação do tipo sexual e eliminação dos diploides, os haploides da PE-2 foram nomeados como Ha-PE-1 até Ha-PE-43 e os da FLE, Ha-FLE-1 até Ha-FLE-10. No Apêndice A, Tabela A1, todos os dados obtidos nessa etapa do experimento são apresentados.

5.2.1. Curva de crescimento em microplaca

As curvas de crescimento obtidas em YPD20 e YPM10, da PE-2 e da FLE, assim como de todos os seus haploides, encontram-se no Apêndice B, Figuras B1 e B2, respectivamente. Levando-se em consideração que a FLE é a levedura com características desejáveis para panificação, selecionou-se os haploides que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre seus valores de velocidade específica de crescimento (μ) e da densidade ótima máxima ($DO_{\text{máx}}$). Em YPD20, foram identificados 16 haploides da PE-2, dos quais 5 são MATa e 11 MAT α . Em relação aos haploides da FLE, apenas o Ha-FLE-5 apresentou valores significativamente iguais ($p>0,05$). Uma vez que este haploide é MATa, para que o cruzamento e a formação do híbrido fosse possível, foi necessário a utilização de um haploide do tipo sexual MAT α . Portanto, os haploides MATa da PE-2 foram descartados. Com isso, foram selecionados 12 haploides nessa primeira etapa, cujas curvas de crescimento, juntamente com a curva da FLE, encontram-se na Figura 25.

Figura 25 – Curvas de crescimento em YPD20 dos haploides selecionados após a primeira triagem por microplaca



Fonte: o autor (2022)

Na Figura 25 é possível observar que as curvas possuem o mesmo perfil, além de apresentarem a inclinação da fase exponencial (μ) estatisticamente igual ($p>0,05$), cujos valores estão apresentados na Tabela 4, assim como os valores das $DO_{\text{máx}}$ de todas as cepas selecionadas. Os valores de μ e de $DO_{\text{máx}}$ de todas as cepas estudadas encontram-se no Apêndice A, Tabela A2.

Tabela 4 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ em YPD20 das cepas selecionadas na primeira triagem por microplaca

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
FLE	$0,5507 \pm 0,0163^a$	$0,8761 \pm 0,0038^{a,b,c,d,e,f}$
Ha-PE-1	$0,5764 \pm 0,0861^a$	$0,8376 \pm 0,0324^{a,b,c,d,e,f}$
Ha-PE-15	$0,5667 \pm 0,0198^a$	$0,9140 \pm 0,0092^{c,d,e,f}$
Ha-PE-17	$0,5342 \pm 0,0653^a$	$0,9211 \pm 0,0225^{d,e,f}$
Ha-PE-18	$0,5884 \pm 0,0341^a$	$0,9501 \pm 0,0762^f$
Ha-PE-20	$0,5697 \pm 0,0655^a$	$0,8895 \pm 0,0573^{b,c,d,e}$
Ha-PE-21	$0,5490 \pm 0,0534^a$	$0,8958 \pm 0,0310^{b,c,d,e}$
Ha-PE-23	$0,5478 \pm 0,0239^a$	$0,9316 \pm 0,1109^f$
Ha-PE-28	$0,5740 \pm 0,0217^a$	$0,9193 \pm 0,0364^{d,e,f}$
Ha-PE-33	$0,5545 \pm 0,0286^a$	$0,9224 \pm 0,0117^{e,f}$
Ha-PE-40	$0,5546 \pm 0,0594^a$	$0,9324 \pm 0,0244^f$
Ha-PE-42	$0,5361 \pm 0,0040^a$	$0,9313 \pm 0,0115^f$
Ha-FLE-5	$0,5482 \pm 0,0395^a$	$0,7333 \pm 0,0197^{a,b}$

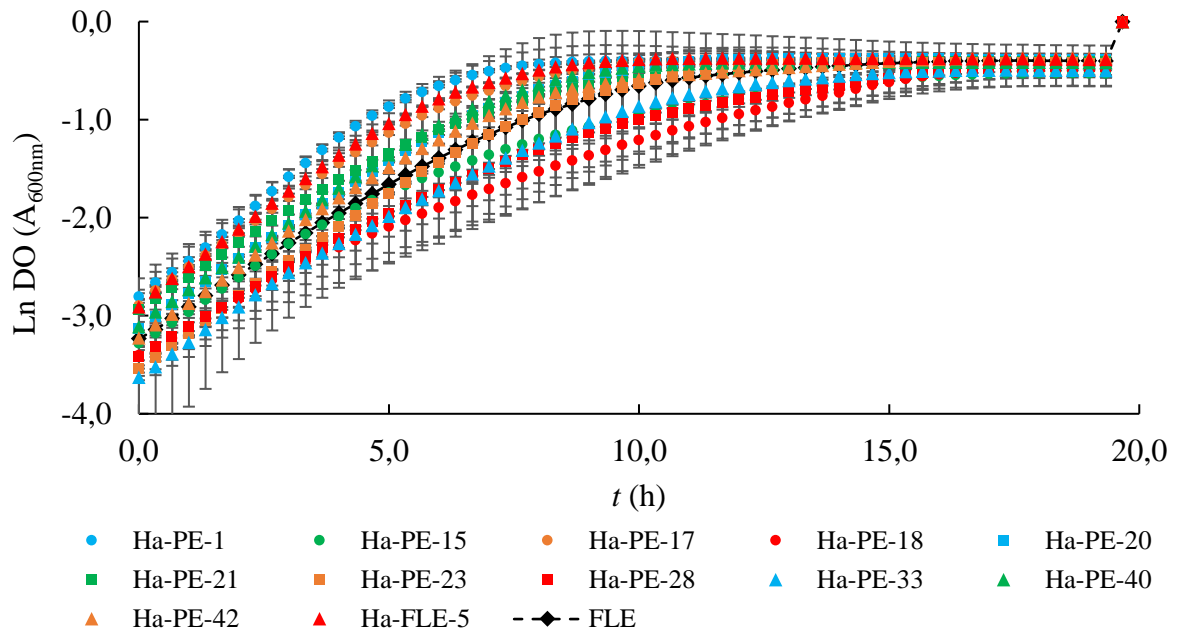
* Médias com letras iguais nas colunas não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Das curvas de crescimento em YPM10, todas as cepas apresentaram valores de μ estatisticamente diferentes da FLE ($p \leq 0,05$). Porém, todas as cepas selecionadas na etapa em YPD20 foram as que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a $DO_{\text{máx}}$ e, portanto, foram mantidas como as selecionadas pela etapa de crescimento em microplaca.

A seguir, são apresentadas as curvas de crescimento dessas cepas em YPM10 (Figura 26) e os respectivos valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ (Tabela 5). Os valores desses parâmetros de todas as cepas estudadas encontram-se no Apêndice A, Tabela A3.

Figura 26 – Curvas de crescimento em YPM10 dos haploides selecionados após a primeira triagem por microplaca em YPD20



Fonte: o autor (2022)

Tabela 5 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ em YPM10 das cepas selecionadas na primeira triagem por microplaca em YPD20

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
FLE	$0,5726 \pm 0,0314^a$	$0,6710 \pm 0,0179^{a,b,c,d,e,f}$
Ha-PE-1	$0,4111 \pm 0,0045^{b,c,d}$	$0,6856 \pm 0,0022^{b,c,d,e,f,g,h}$
Ha-PE-15	$0,3462 \pm 0,0182^{d,e}$	$0,6634 \pm 0,0111^{a,b,c,d,e,f}$
Ha-PE-17	$0,3926 \pm 0,0057^{c,d,e}$	$0,7477 \pm 0,0050^{g,h}$
Ha-PE-18	$0,3387 \pm 0,0123^e$	$0,6742 \pm 0,0118^{a,b,c,d,e,f,g}$
Ha-PE-20	$0,3847 \pm 0,0165^{c,d,e}$	$0,6886 \pm 0,0046^{c,d,e,f,g,h}$
Ha-PE-21	$0,3844 \pm 0,0054^{c,d,e}$	$0,7075 \pm 0,0053^{d,e,f,g,h}$
Ha-PE-23	$0,4047 \pm 0,0084^{c,d,e}$	$0,6917 \pm 0,0214^{c,d,e,f,g,h}$
Ha-PE-28	$0,3831 \pm 0,0162^{c,d,e}$	$0,7364 \pm 0,0160^{f,g,h}$
Ha-PE-33	$0,3652 \pm 0,0040^{c,d,e}$	$0,7197 \pm 0,0145^{e,f,g,h}$
Ha-PE-40	$0,3383 \pm 0,0034^e$	$0,7520 \pm 0,0098^h$
Ha-PE-42	$0,3925 \pm 0,0096^{b,c,d,e}$	$0,7211 \pm 0,0095^{e,f,g,h}$
Ha-FLE-5	$0,4506 \pm 0,0103^b$	$0,6144 \pm 0,0092^{a,b,c}$

* Médias com letras iguais nas colunas não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Ao comparar os valores de μ dos haploides selecionados em YPD20 e YPM10, os valores para o meio YPM10 foram inferiores aos obtidos em YPD20, sendo que os haploides

Ha-PE-15, Ha-PE-18 e Ha-PE-40 apresentaram os menores valores. Da mesma forma, houve redução nos valores de $DO_{\text{máx}}$ em YPM10 para todos os haploides.

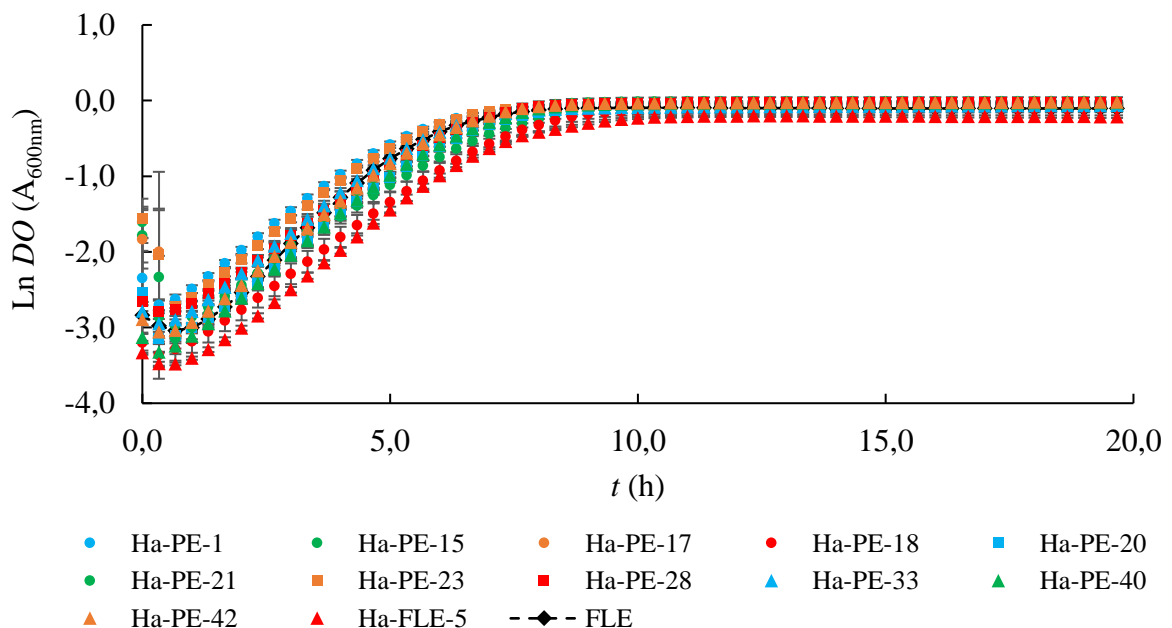
5.2.2. Resistência ao congelamento e capacidade fermentativa

Selecionadas as cepas na primeira triagem em microplacas, a próxima etapa consistiu em realizar novamente o crescimento em microplacas em meio YPD20, porém com o congelamento e descongelamento da microplaca. Como o meio YPD20 é um meio ideal para o crescimento da levedura, as cepas que não apresentaram um desempenho satisfatório nesse meio após o congelamento não foram selecionadas, visto que, o meio composto por água e farinha de trigo é mais estressante para a cepa e possui menos açúcar disponível para o crescimento e a fermentação.

5.2.2.1. Resistência ao congelamento em cultivo em microplaca

Para essa etapa, o critério de seleção foi o tempo da fase *lag* (λ). Em panificação, especificamente no caso do pão francês, a fermentação ocorre, em geral, após 20 min de descanso da massa e sua modelagem. O tempo de fermentação varia entre 45 e 90 min, dependendo da temperatura e da umidade relativa da fermentadora. Portanto, uma cepa que apresentar o tempo λ superior a 1 h, não será interessante para o processo. Na Figura 27 encontram-se as curvas de crescimento dos haploides em microplacas com etapa prévia de congelamento e descongelamento, em comparação com a da FLE, sem congelamento.

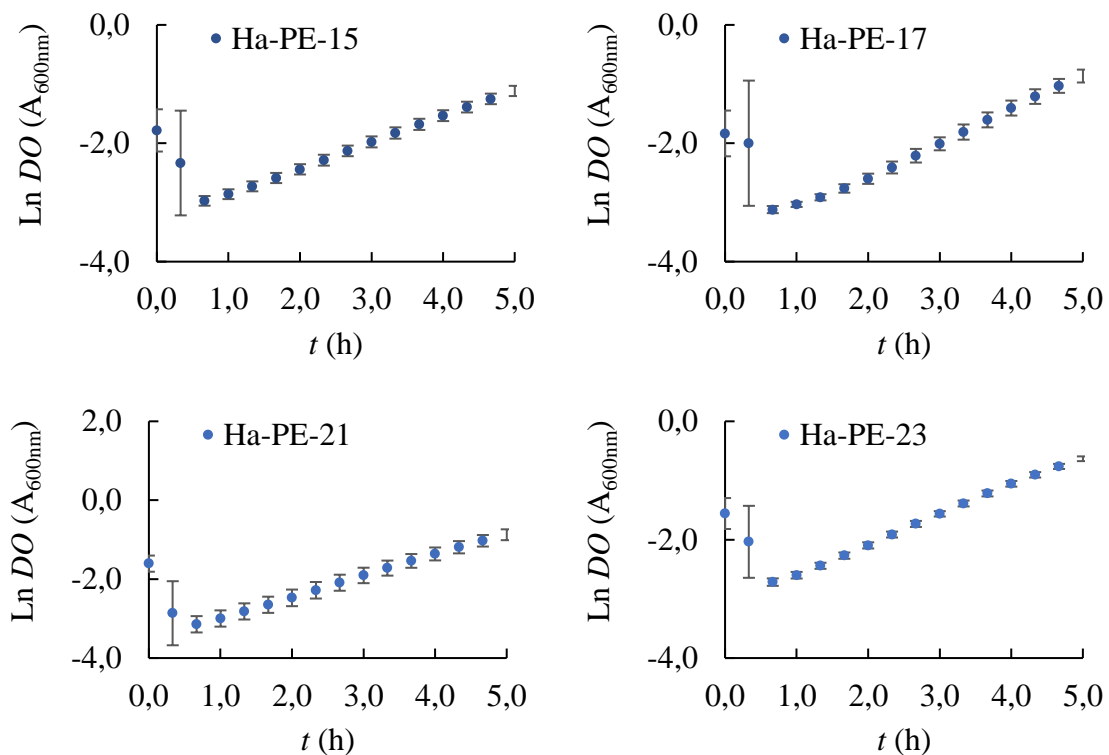
Figura 27 – Curvas de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplaca com etapa prévia de congelamento e descongelamento



Fonte: o autor (2022)

Para facilitar a visualização, as curvas foram plotadas individualmente e o eixo x foi reduzido para 5 h. Com isso, foi possível verificar a fase *lag* de cada uma das cepas. Os haploides que apresentaram os primeiros pontos visivelmente fora da curva, indicando uma maior fase *lag*, não foram selecionados para a próxima etapa (Figura 28). Assim, de acordo com esse critério de seleção, foram descartados os haploides Ha-PE-15, Ha-PE-17, Ha-PE-21 e Ha-PE-23.

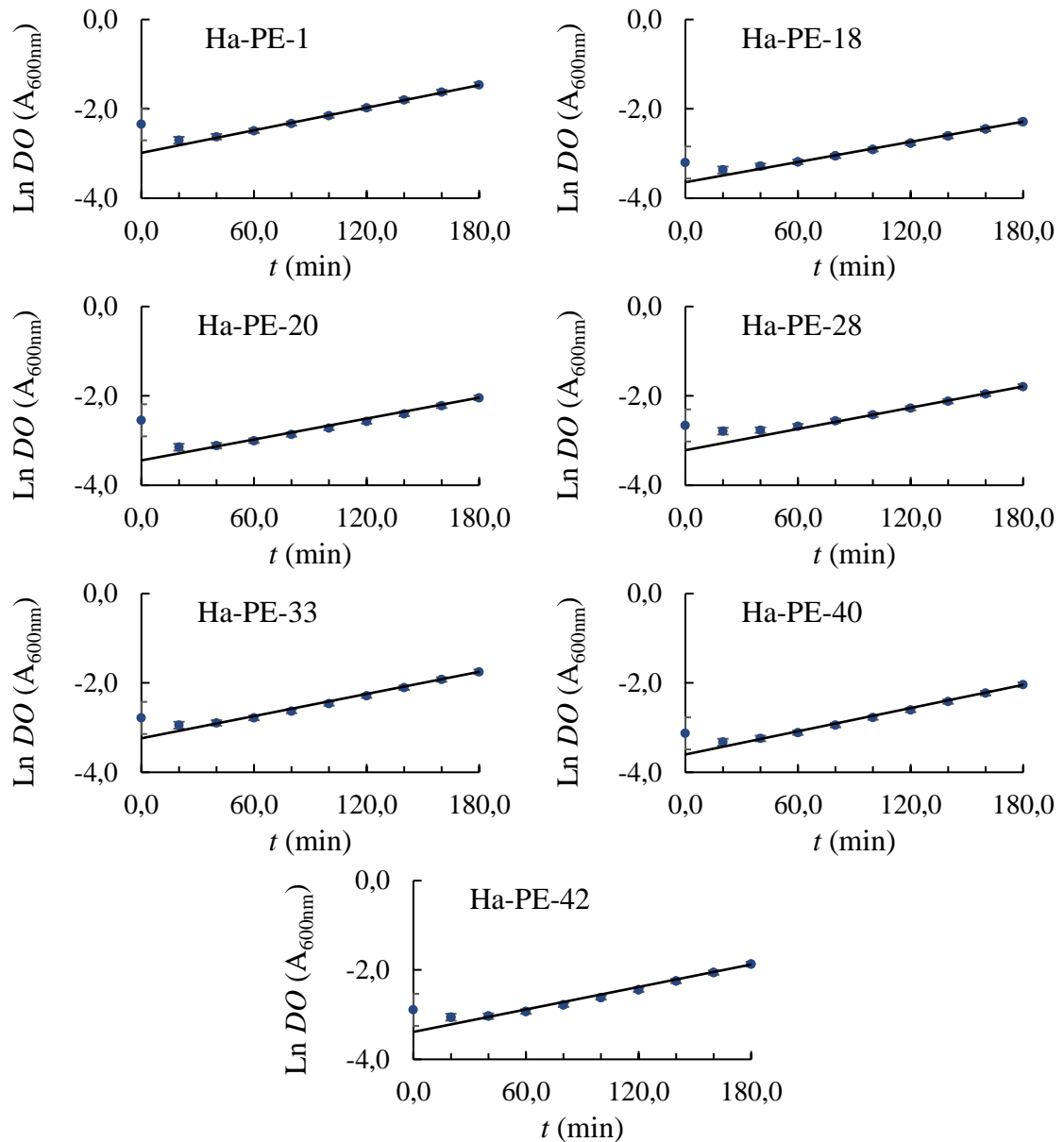
Figura 28 – Curva de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplacas com etapa prévia de congelamento, e posterior descongelamento, ao longo de 5 h



Fonte: o autor (2022)

Para avaliar com maior objetividade o início da fase *lag*, os dados da fase exponencial foram linearizados, como descrito anteriormente, com a utilização do programa em Python (Figura 29). Em todos os casos, com exceção do Ha-PE-28, a fase exponencial iniciou após os primeiros 20 min de experimento. Para o Ha-PE-28, esta fase teve início apenas após 1 h de experimento e, portanto, não foi selecionado.

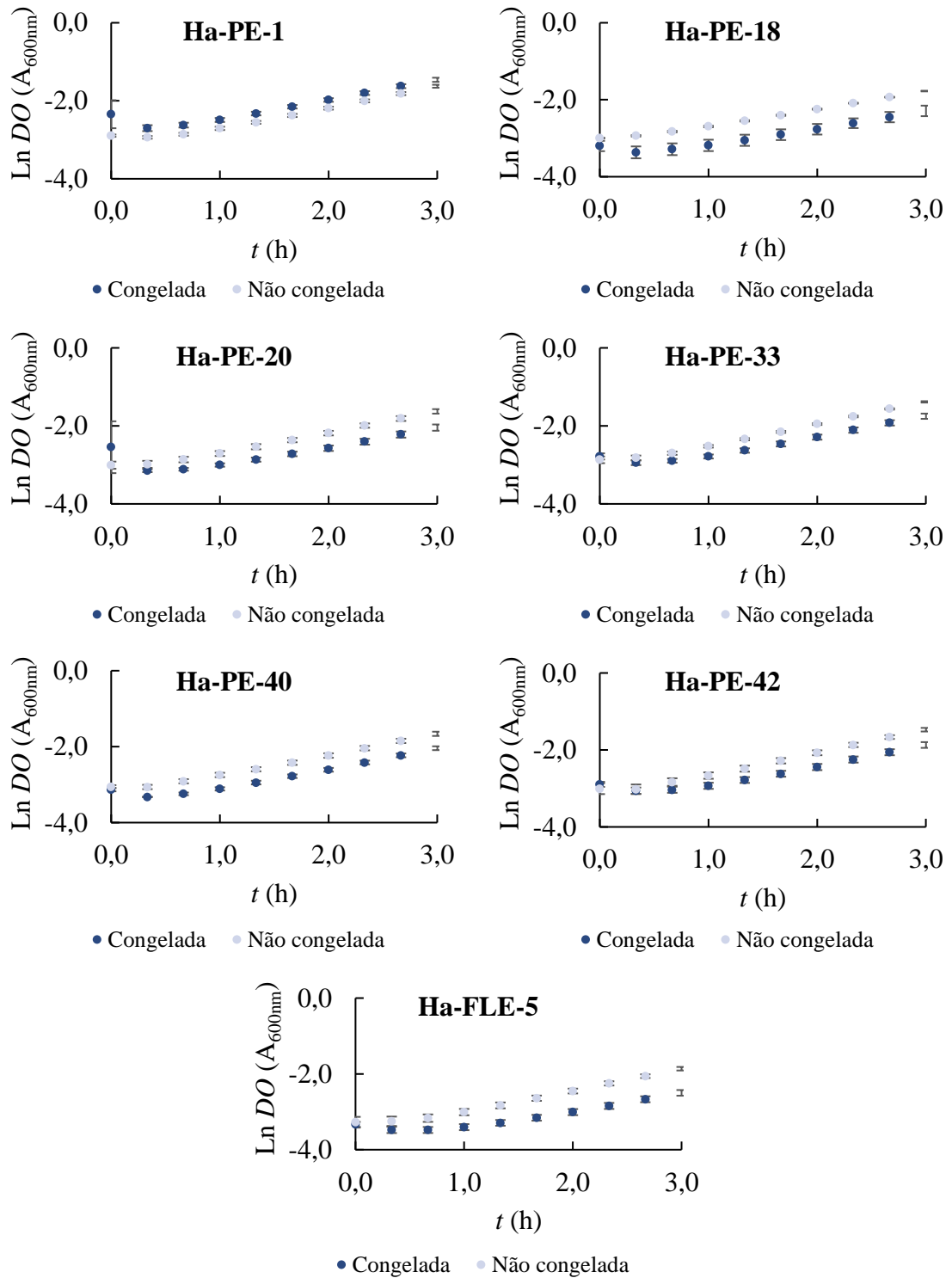
Figura 29 – Curva de crescimento dos haploides cultivados em YPD20 em microplaca, linearizada na fase exponencial



Fonte: o autor (2022)

Também foram comparadas as cinéticas de crescimento dos haploides com e sem o congelamento (Figura 30), em que é possível observar que, com exceção do Ha-PE-1, todas as cepas apresentaram um decréscimo no valor da *DO*, após o congelamento, provavelmente devido à morte celular. Com o congelamento, é esperado o aumento de λ , devido à exposição ao estresse à que as células são submetidas. Esse aumento em λ pode ser observado nos haploides Ha-PE-18, Ha-PE-33 e Ha-PE-42, sendo de 20 min, e 40 min para o Ha-PE-20 e o Ha-FLE-5. Os haploides Ha-PE-1 e o Ha-PE-40 não apresentaram essa alteração, o que pode indicar uma maior tolerância ao congelamento.

Figura 30 – Cinéticas de crescimento dos haploides em microplaca em YPD20, com presença ou ausência da etapa prévia de congelamento

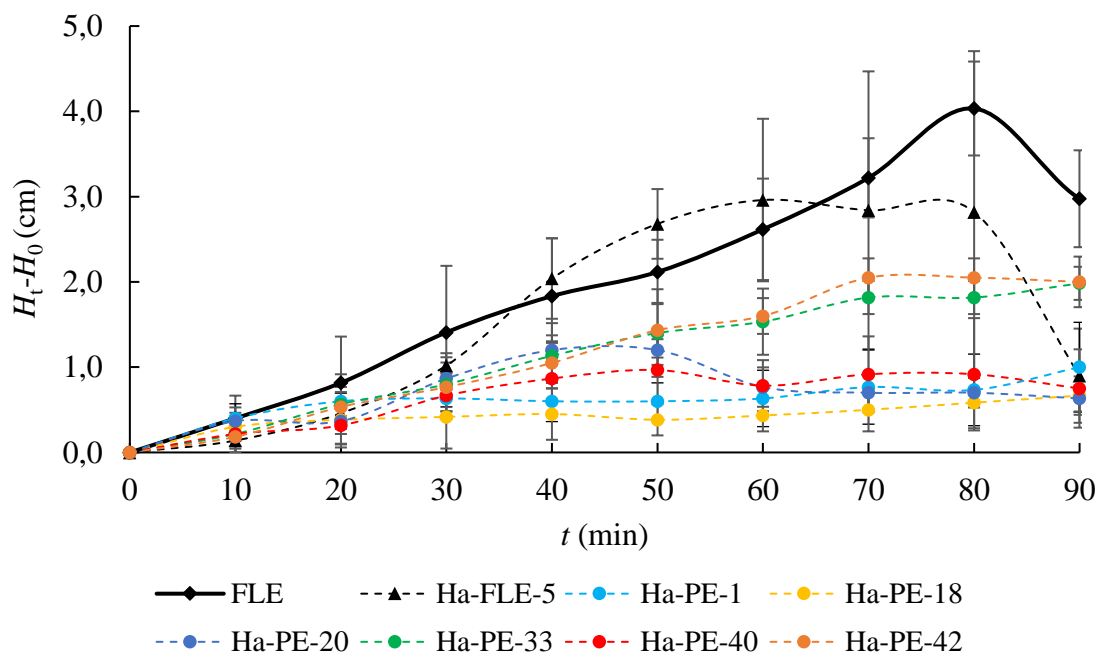


Fonte: o autor (2022)

5.2.2.1. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo

Dos haploides submetidos ao congelamento em microplacas, foram selecionados para o teste de resistência ao congelamento e capacidade fermentativa o Ha-FLE-5 e seis haploides da PE-2: Ha-PE-1, Ha-PE-18, Ha-PE-20, Ha-PE-33, Ha-PE-40 e Ha-PE-42. Na Figura 31 é apresentada a evolução de diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo da FLE, sem congelamento, e dos haploides, após o congelamento e descongelamento.

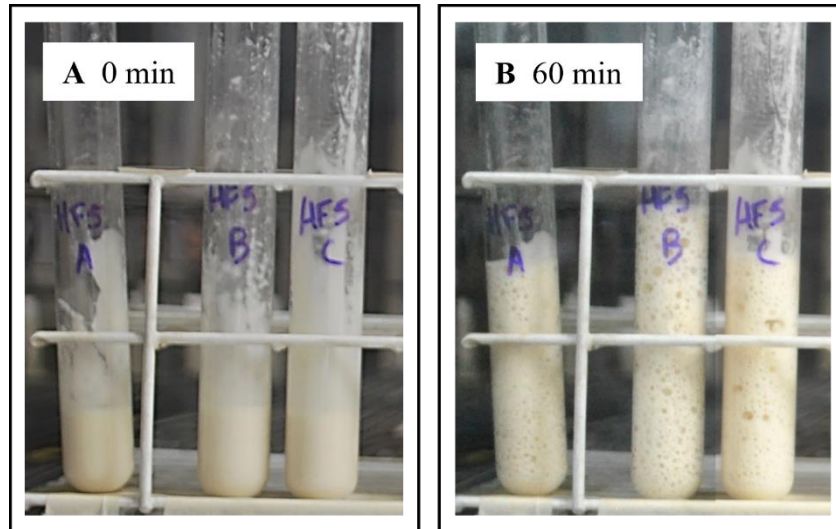
Figura 31 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, adicionada da FLE e dos haploides após submetidos ao congelamento e descongelamento



Fonte: o autor (2022)

Das curvas obtidas, se observa que apenas o Ha-FLE-5 apresentou um pico de altura próximo ao pico da própria FLE, no intervalo de tempo estudado. Enquanto a FLE atinge seu máximo em 80 min, com um crescimento de $(131,2 \pm 12,7) \%$, o Ha-FLE-5 atinge esse máximo aos 60 min, com $(96,8 \pm 21,5) \%$ de crescimento na altura da suspensão aquosa de farinha de trigo. Esse aumento causado pela fermentação do Ha-FLE-5, que corresponde a aproximadamente a altura atingir o dobro, é uma característica desejável para a panificação, que se encontra na FLE e foi herdada quase que integralmente por esse haploide. Apesar do erro da medida ter uma ordem de grandeza grande, pelas imagens do experimento é possível confirmar essa grande diferença na altura entre o início do experimento e os 60 min (Figura 32).

Figura 32 – Experimento de capacidade fermentativa do Ha-FLE-5, após congelamento. (A) Início do experimento, com a suspensão lisa e homogênea. (B) Após 60 min de experimento, com um aumento significativo da altura



Fonte: o autor (2022)

Na Figura 31, se observa para os haploides da PE-2, que o pico da altura foi inferior, sendo que os maiores valores atingidos dentro desse intervalo de 90 min foram de $(52,1 \pm 14,7)$ % para o Ha-PE-33 aos 90 min e $(56,4 \pm 13,9)$ % para o Ha-PE-42 aos 70 min. Para esses dois haploides, essas foram as máximas atingidas em todo o experimento. Os haploides Ha-PE-1, Ha-PE-18 e Ha-PE-20 também atingem crescimentos próximos a 50 %, porém após os 90 min. Na Tabela 6 são apresentadas as máximas porcentagens de crescimento de cada haploide, assim como o tempo no qual ela foi atingida.

Tabela 6 – Crescimentos máximos e seus respectivos tempos da FLE e dos haploides obtidos nos testes de capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo

Cepa	Crescimento (%)	t (min)
FLE	$131,2 \pm 12,6^c$	80
Ha-PE-1	$55,2 \pm 12,3^{a,b}$	150
Ha-PE-18	$58,4 \pm 18,6^b$	180
Ha-PE-20	$52,2 \pm 9,8^{a,b}$	150
Ha-PE-33	$52,1 \pm 14,7^{a,b}$	90
Ha-PE-40	$29,4 \pm 8,9^a$	50
Ha-PE-42	$56,4 \pm 13,9^{a,b}$	70
Ha-FLE-5	$96,8 \pm 21,5^c$	60

*Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Ao comparar os resultados desses testes com os obtidos em microplaca em meio YPD20, a $DO_{\text{máx}}$ do Ha-FLE-5 foi inferior aos demais haploides, enquanto seu λ foi maior. Porém, ao ser submetido à suspensão aquosa de farinha de trigo, apresentou um melhor desempenho em relação aos demais. Isso demonstra a importância da utilização de um haploide oriundo da cepa de panificação, trazendo a característica de uma boa fermentação na massa para o híbrido gerado, enquanto os haploides da PE-2 trazem um melhor desempenho de forma geral.

5.2.3. Acúmulo de trealose

A concentração de trealose dos haploides selecionados foi medida (Tabela 7), pois o seu acúmulo é frequentemente associado à resistência ao congelamento, ou seja, é esperado que as cepas com maiores acúmulos sejam aquelas com maior resistência, tanto nos testes em microplaca quanto nos conduzidos com a suspensão aquosa de farinhas de trigo.

Tabela 7 – Concentração de trealose intracelular medida dos haploides após cultivo em YPD50

Cepa	Trealose (mg/g massa seca)
Ha-PE-1	0,2941 ± 0,4159 ^a
Ha-PE-18	1,9741 ± 0,2826 ^b
Ha-PE-20	0,0000 ± 0,0010 ^a
Ha-PE-33	0,9952 ± 0,2089 ^{a, b}
Ha-PE-40	3,3865 ± 0,5677 ^c
Ha-PE-42	3,3632 ± 0,1021 ^c
Ha-FLE-5	0,0000 ± 0,0010 ^a

*Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Ao observar os valores apresentados na Tabela 7, os do grupo composto pelos haploides Ha-PE-1, Ha-PE-20 e Ha-FLE-5, não apresentaram diferenças significativas entre si, com valores muito próximos a zero. Os haploides Ha-PE-20 e Ha-FLE-5, após o congelamento em microplacas, apresentaram os maiores valores de λ , o que está de acordo com o menor acúmulo de trealose e, conseqüentemente, menor resistência ao congelamento. Já o haploide Ha-PE-40, o com maior acúmulo de trealose, no experimento de crescimento em microplaca não apresentou variações significativas entre suas curvas com e sem congelamento. Para esses três haploides, a relação entre acúmulo de trealose e resistência ao congelamento ocorreu como esperado.

Já para o teste realizado em suspensão aquosa de farinha de trigo, as concentrações de trealose não estão diretamente associadas às cepas que apresentaram maiores picos de altura (Figura 31). Isso pode ser explicado pelo fato de existirem diferentes fatores sendo avaliados, como a habilidade das cepas fermentarem em um meio composto apenas por água e farinha de trigo, e não apenas a resistência ao congelamento, como foi o caso do experimento em microplaca, no qual o meio não é um fator de estresse.

5.2.4. Hibridização

Após a realização das etapas de seleção, apresentadas de forma resumida na Tabela 8, 6 haploides da PE-2 e 1 haploide da FLE foram escolhidos para a geração dos híbridos e, portanto, a geração de 6 híbridos foi possível. As possíveis combinações de híbridos foram chamadas de F5P1, F5P18, F5P20, F5P33, F5P40 e F5P42, sendo que F5 indica o haploide Ha-FLE-5 e P1, P18, P20, P33, P40 e P42, os haploides Ha-PE-1, Ha-PE-18, Ha-PE-20, Ha-PE-33, Ha-PE-40 e Ha-PE-42, respectivamente.

Tabela 8 – Etapas de identificação e seleção dos haploides para utilização no processo de hibridização

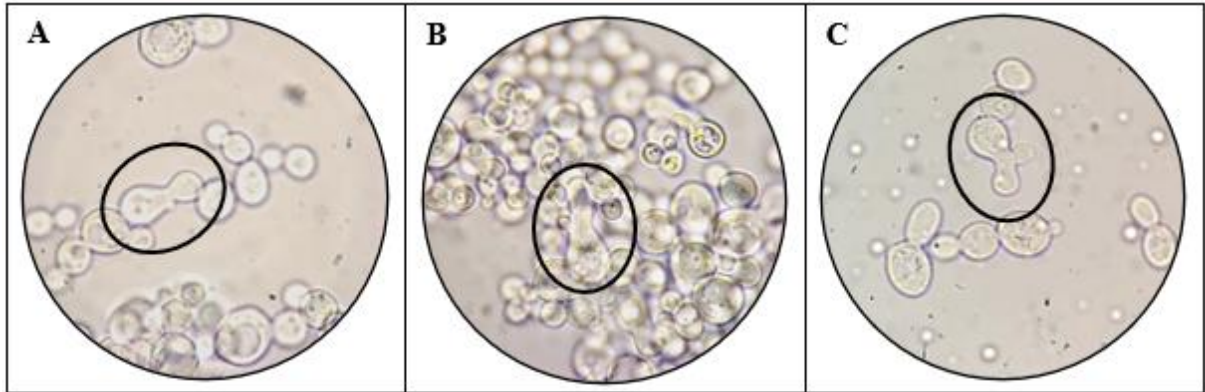
Etapas do processo	PE-2	FLE
Esporos separados	90	90
Esporos viáveis	76	20
Identificação do tipo sexual dos haploides	43	10
Cultivo em microplaca	11	1
Cultivo em microplaca com etapa prévia de congelamento	6	1
Capacidade fermentativa	6	1
Trealose	6	1

Fonte: o autor (2022)

Em todos os processos de cruzamento, foi verificada a formação do zigoto (Figura 33) com a utilização de um microscópio (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha) com lente objetiva de 100x.

Figura 33 – Fotos obtidas no microscópio (Scope A1 AXIO, Carl Zeiss, Alemanha) com lente objetiva de 100x dos zigotos formados. (A) Início da formação dos zigotos. (B) Após 15 min.

(C) Após 30 min



Fonte: o autor (2022)

5.3 Híbridos

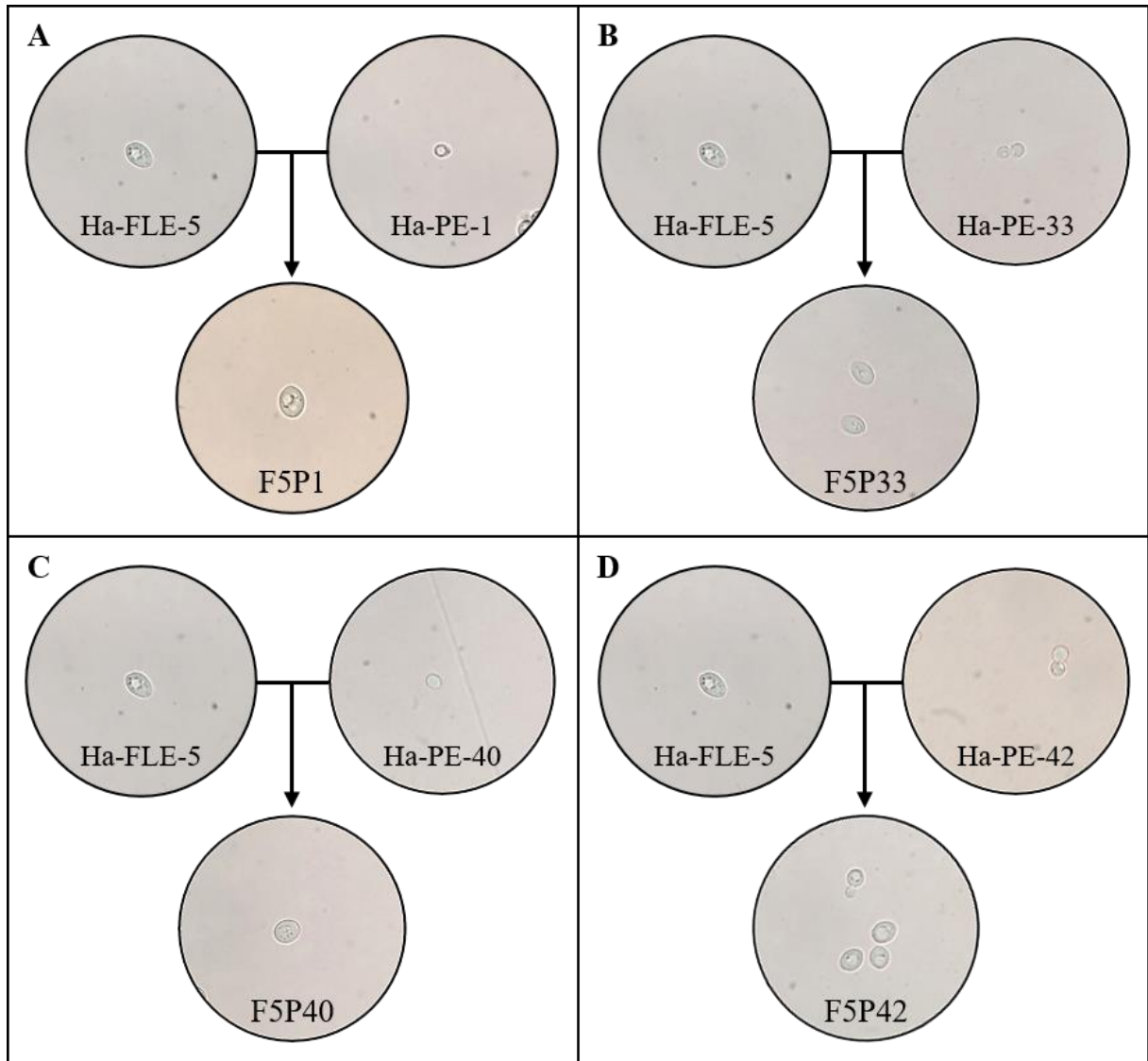
Das seis possibilidades de cruzamento para obtenção dos híbridos, F5P18 e F5P20 não apresentaram crescimento, sendo considerados não viáveis. As outras quatro foram submetidas ao teste de identificação do tipo sexual e à esporulação. Nesse caso, buscou-se pela não formação de halo em nenhuma das placas contendo as *tester*, indicando uma cepa diploide, e pela formação de tétrades no meio de esporulação, o que também é um indício de cepa diploide, visto que a haploide não é capaz de gerar tétrades.

Para os híbridos F5P33 e F5P42, a formação das tétrades foi observada após 5 dias em meio para esporulação, assim como não houve formação de halo em nenhuma das placas contendo *tester*. Sendo assim, os dois experimentos corroboram que ambos são cepas diploides. Já para os híbridos F5P1 e F5P40, não foi observada a formação das tétrades, porém também não houve formação dos halos. Com isso, tem-se a hipótese de que esses híbridos são diploides, pelo resultado do teste de identificação sexual, mas podem ser cepas que perderam a habilidade de esporular ou que esporulam em condições diferentes às utilizadas neste trabalho.

Outro indício de que essas quatro combinações são leveduras híbridas, é o tamanho de suas células em comparação às células haploides que as originaram, como pode ser visto na Figura 33. Essas diferenças de tamanhos das células também foram observadas nos híbridos estudados durante o estágio realizado em Salamanca, Espanha, o que corrobora a hipótese de formação dos híbridos.

Pelas imagens obtidas no microscópio, apresentadas na Figura 34, é possível observar que todos os haploides oriundos da PE-2 são de menor tamanho em relação ao haploide da FLE, enquanto todos os híbridos têm tamanho maior que as suas cepas de origem.

Figura 34 – Fotos obtidas em microscópio (CH-2, Olympus, Japão) com lente objetiva de 100x contendo células dos haploides e dos seus respectivos híbridos. (A) Híbrido F5P1 e seus haploides. (B) Híbrido F5P33 e seus haploides. (C) Híbrido F5P40 e seus haploides. (D) Híbrido F5P42 e seus haploides

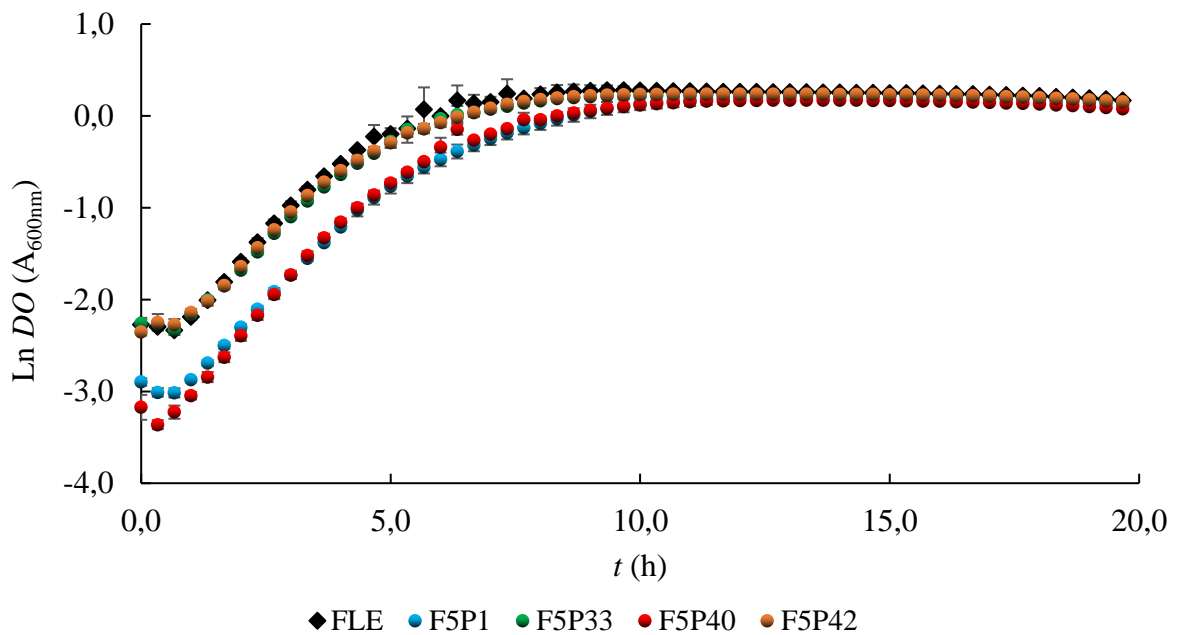


Fonte: o autor (2022)

5.3.1. Curva de crescimento em microplacas

Foram construídas curvas de crescimento de cultivos em microplacas para avaliar tanto o desempenho dos híbridos em comparação à FLE quanto em comparação aos haploides que foram utilizados para a sua geração. Na Figura 35 é apresentada a curva de crescimento dos híbridos e da FLE.

Figura 35 – Curva de crescimento da FLE e dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, cultivados em YPD20 em microplaca.



É possível observar que as curvas de F5P33 e F5P42 possuem perfis muito semelhantes ao da FLE e, com exceção do híbrido F5P40 que apresentou a fase *lag* (λ) de apenas 20 min, a fase de crescimento exponencial para as demais cepas iniciou após 40 min de experimento. Na Tabela 9 são apresentados os valores de μ e de $DO_{\text{máx}}$ para todas as cepas estudadas, em que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a $DO_{\text{máx}}$ da FLE em comparação aos híbridos, enquanto para a velocidade específica, o híbrido F5P40 teve o valor significativamente superior aos demais.

Tabela 9 – Valores de μ e de $DO_{\text{máx}}$ da FLE e dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, obtidos em cultivo em YPD20 em microplaca

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
FLE	$0,5507 \pm 0,0163^a$	$1,4078 \pm 0,1247^a$
F5P1	$0,5561 \pm 0,0186^a$	$1,2392 \pm 0,0630^b$
F5P33	$0,5066 \pm 0,0148^b$	$1,2535 \pm 0,0123^b$
F5P40	$0,6290 \pm 0,0049^c$	$1,1861 \pm 0,0067^b$
F5P42	$0,4959 \pm 0,0080^b$	$1,2690 \pm 0,0323^b$

*Médias com letras iguais nas colunas não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

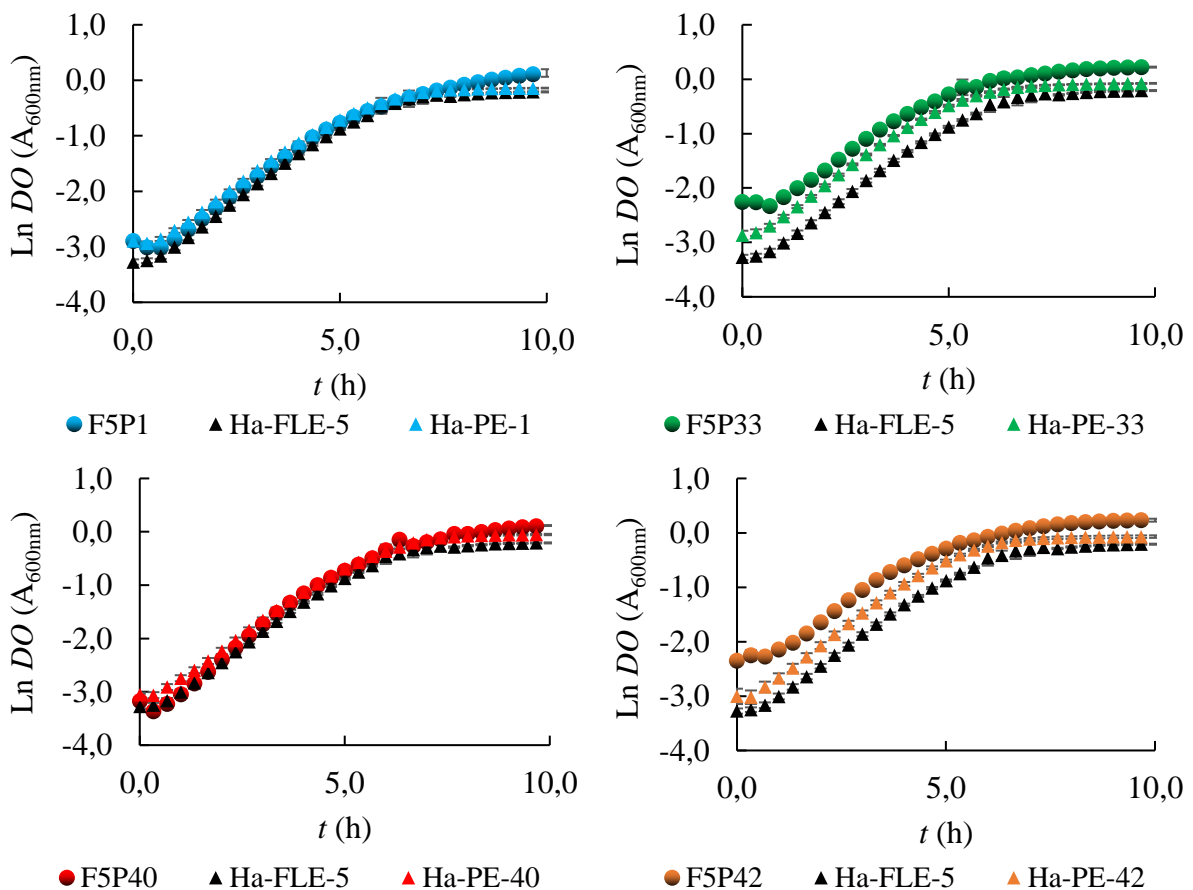
Fonte: o autor (2022)

As características dos híbridos gerados variam e não são previsíveis, e, como já mostrado na literatura, podem apresentar resultados que sobressaiam ambas as cepas utilizadas

para sua geração, resultados intermediários ou inferiores (BASSO, 2015; CODÓN et al., 2003; HEBLY et al., 2015; KROGERUS et al., 2017). Portanto, a avaliação entre os resultados dos híbridos e de seus respectivos haploides é necessária.

Na Figura 36, as curvas dos híbridos com seus respectivos haploides são apresentadas, na qual se observa perfis praticamente sobrepostos nas primeiras horas para os híbridos F5P1 e F5P40 e seus respectivos haploides, enquanto para os híbridos F5P33 e F5P42, as curvas estão deslocadas para cima no eixo y, indicando valores iniciais de DO s mais altos. A fase *lag* teve a mesma duração para F5P1 e F5P40 em relação a dos haploides, enquanto para F5P33 e F5P42, ocorreu um aumento de 20 min em relação a dos respectivos haploides. Em todos os casos, foram observados valores superiores de $DO_{máx}$.

Figura 36 – Curva de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os haploides utilizados para sua geração, cultivados em YPD20 em microplaca



Fonte: o autor (2022)

Na Tabela 10, a análise estatística indicou que apenas o híbrido F5P1 apresentou a velocidade específica de crescimento (μ) equivalente ao dos haploides, enquanto o F5P40 apresentou valor estatisticamente superior enquanto os híbridos F5P33 e F5P42 valores

inferiores. Para a $DO_{\text{máx}}$ atingida, como já observado nas curvas apresentadas na Figura 36, os valores dos híbridos estudados foram superiores aos haploides utilizados na sua geração.

Tabela 10 – Valores de μ e de $DO_{\text{máx}}$ da dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, e seus respectivos haploides, obtidos em crescimento em YPD20 em microplaca

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
Ha-FLE-5	$0,5482 \pm 0,0395^a$	$0,7333 \pm 0,0197^a$
Ha-PE-1	$0,5764 \pm 0,0861^a$	$0,8376 \pm 0,0324^{a,b}$
Ha-PE-33	$0,5545 \pm 0,0286^a$	$0,9224 \pm 0,0117^b$
Ha-PE-40	$0,5546 \pm 0,0594^a$	$0,9324 \pm 0,0244^b$
Ha-PE-42	$0,5361 \pm 0,0040^a$	$0,9313 \pm 0,0115^b$
F5P1	$0,5561 \pm 0,0186^a$	$1,2392 \pm 0,0630^c$
F5P33	$0,5066 \pm 0,0148^b$	$1,2535 \pm 0,0123^c$
F5P40	$0,6290 \pm 0,0049^c$	$1,1861 \pm 0,0067^c$
F5P42	$0,4959 \pm 0,0080^b$	$1,2690 \pm 0,0323^c$

*Médias com letras iguais nas colunas não a apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

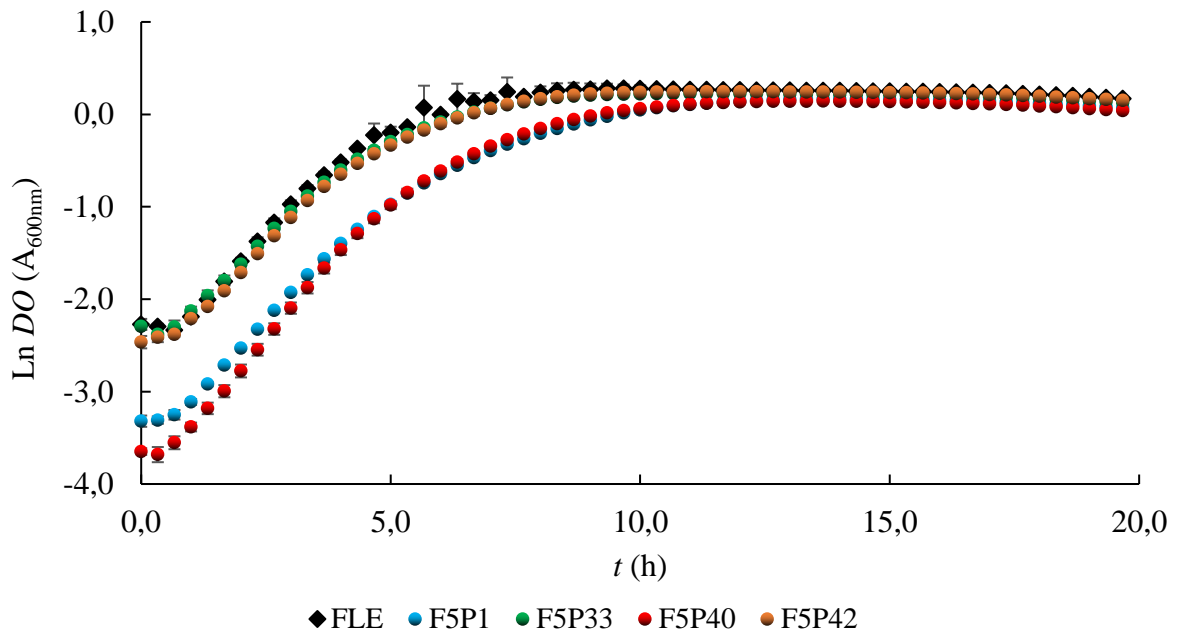
5.3.2. Resistência ao congelamento e capacidade fermentativa

Após a avaliação dos híbridos em meio YPD20 sem o congelamento, a resistência ao congelamento e sua capacidade fermentativa foram avaliadas.

5.3.2.1. Resistência ao congelamento em cultivo em microplaca

O desempenho dos híbridos após o congelamento em relação ao da FLE (sem congelamento) foi avaliado pelas curvas de crescimento apresentadas na Figura 37.

Figura 37 – Curva de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42, após o congelamento, cultivados em YPD20 em microplaca, em comparação a curva da FLE, não submetida ao congelamento.



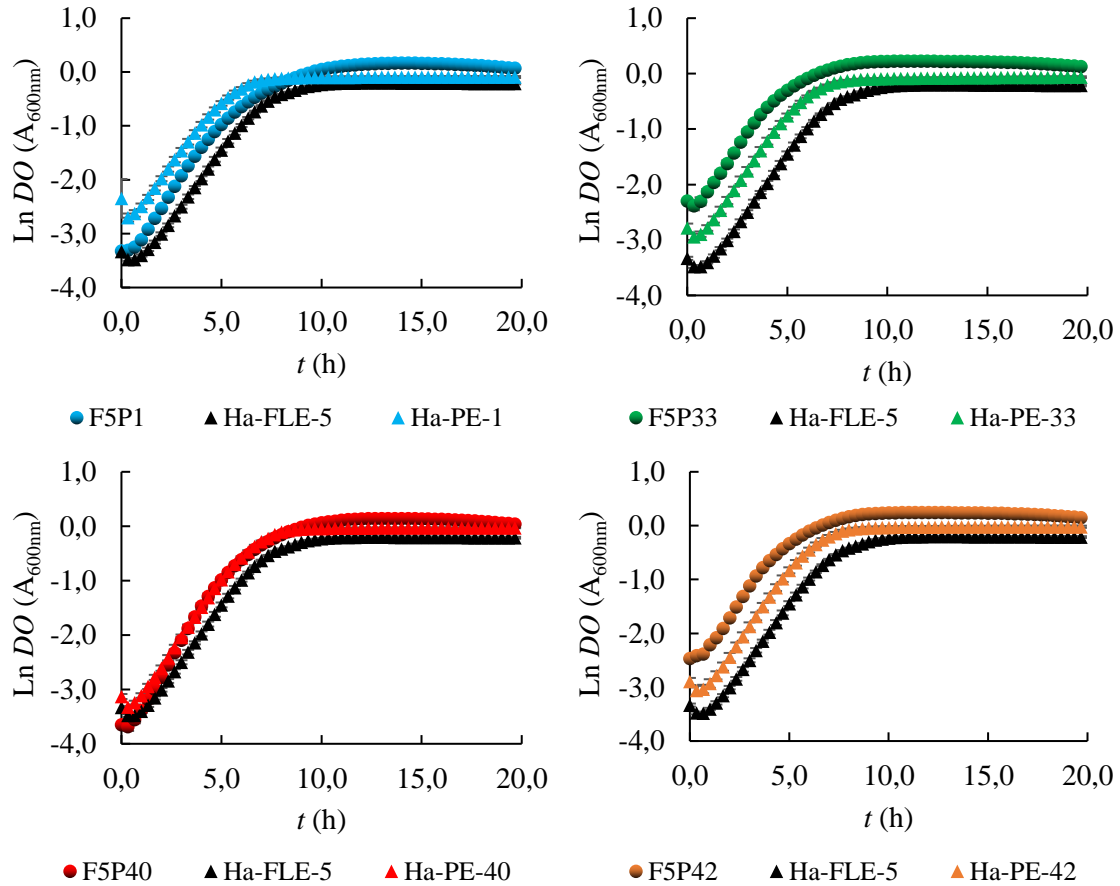
Fonte: o autor (2022)

O perfil das curvas de crescimento dos híbridos após o congelamento se apresenta de maneira semelhante à obtida da FLE, sem congelamento, notadamente as dos híbridos F5P33 e F5P42. A duração da fase *lag* foi igual a 40 min para todos os híbridos, com exceção do F5P40, em que o crescimento exponencial iniciou após os 20 min. Como esperado, a partir de análise estatística, os valores de μ e $DO_{\text{máx}}$, características fisiológicas da cepa, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) em relação aos obtidos sem a etapa prévia de congelamento. Portanto, após o congelamento, os valores de μ de F5P33 e F5P42 foram estatisticamente iguais, assim como os valores de $DO_{\text{máx}}$ de todos os híbridos também não apresentaram diferença estatística.

Na Figura 38, as curvas de crescimento dos haploides e seus respectivos híbridos gerados, cultivados em YPD20 em microplaca após o congelamento, são comparadas.

Figura 38 – Curvas de crescimento dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os respectivos haploides utilizados para o cruzamento em YPD20 em microplaca após

congelamento



Fonte: o autor (2022)

É possível observar para o híbrido F5P1, que durante a fase exponencial, a sua curva encontra-se entre as obtidas dos respectivos haploides utilizados para o cruzamento, porém os valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ foram superiores aos dos haploides. Para o híbrido F5P40, apesar da DO_{inicial} ser menor que a dos respectivos haploides, durante a fase exponencial a sua curva se mantém sobreposta à do haploide Ha-PE-40. Os valores de $DO_{\text{máx}}$ e de μ foram superiores aos dos haploides utilizados para sua geração. No caso dos híbridos F5P33 e F5P42, as suas curvas estão acima das obtidas dos haploides, com valores de DO s iniciais superiores, menor tempo da fase *lag* e maiores valores de $DO_{\text{máx}}$. A análise estatística (Tabela 11) indicou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de μ dos híbridos F5P33 e F5P42 e do Ha-FLE-5, porém, ao comparar esse valor com os haploides da PE-2 que os originaram, tem-se que o valor de μ do Ha-PE-33 é superior ao do F5P33 e o do Ha-PE-42 é superior ao do F5P42. Para os valores de $DO_{\text{máx}}$, todos os híbridos apresentam valores superiores aos respectivos

haploides, e não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre F5P1 e F5P40, assim como entre F5P33 e F5P42.

Tabela 11 – Valores de μ e de $DO_{\text{máx}}$ dos híbridos F5P1, F5P33, F5P40 e F5P42 e os respectivos haploides utilizados para o cruzamento obtidos em cultivo em microplaca com etapa prévia de congelamento

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
F5P1	$0,5686 \pm 0,0079^e$	$1,1805 \pm 0,0102^e$
F5P33	$0,5087 \pm 0,0066^a$	$1,2523 \pm 0,0050^f$
F5P40	$0,6428 \pm 0,0017^f$	$1,1533 \pm 0,0091^e$
F5P42	$0,5238 \pm 0,0054^{a,b}$	$1,2768 \pm 0,0192^f$
Ha-FLE-5	$0,5139 \pm 0,0046^{a,b}$	$0,8165 \pm 0,0106^a$
Ha-PE-1	$0,5036 \pm 0,0155^{a,b}$	$0,9122 \pm 0,0154^b$
Ha-PE-33	$0,5269 \pm 0,0059^{b,c}$	$0,9384 \pm 0,0145^{b,c}$
Ha-PE-40	$0,5463 \pm 0,0026^d$	$0,9717 \pm 0,0068^{c,d}$
Ha-PE-42	$0,5440 \pm 0,0090^{c,d}$	$0,9802 \pm 0,0197^d$

*Médias com letras iguais nas colunas não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

5.3.2.2. Capacidade fermentativa em suspensão aquosa de farinha de trigo

Na Tabela 12 são apresentados os valores máximos de crescimento da altura da suspensão aquosa de farinha de trigo nos primeiros 90 min do teste de capacidade fermentativa dos híbridos em comparação aos haploides que os originaram.

Tabela 12 – Valores máximos de crescimento após congelamento e seus respectivos tempos medidos dos haploides e seus respectivos híbridos

Cepa	Crescimento (%)	t (min)
Ha-FLE-5	$96,8 \pm 21,5^f$	60
Ha-PE-1	$28,0 \pm 5,2^{a,b,c}$	90
Ha-PE-33	$52,1 \pm 14,7^{b,c,d,e}$	90
Ha-PE-40	$29,4 \pm 8,9^{a,b}$	50
Ha-PE-42	$56,4 \pm 13,9^{c,d,e}$	70
F5P1	$64,9 \pm 3,1^{d,e,f}$	90
F5P33	$27,5 \pm 14,8^{a,b,c}$	60
F5P40	$85,0 \pm 2,4^{e,f}$	90
F5P42	$26,0 \pm 8,6^{a,b}$	90

*Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

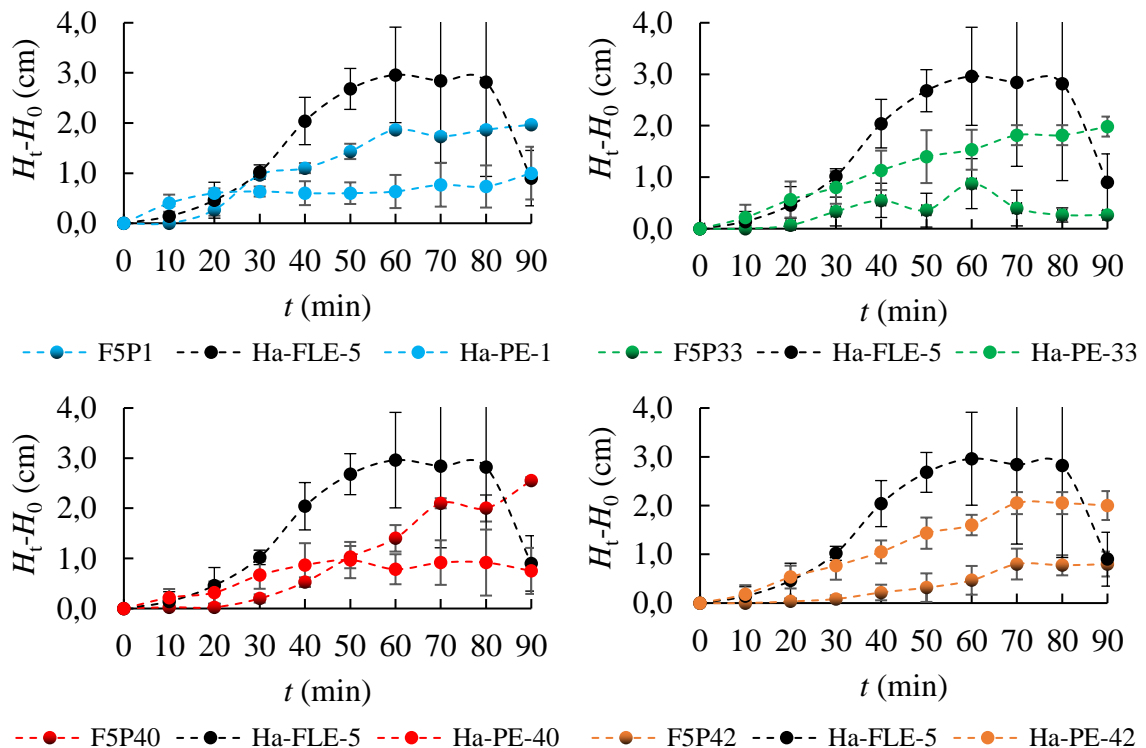
A análise estatística indicou que os híbridos F5P1 e F5P40 não apresentaram diferenças significativas no crescimento máximo em comparação ao do Ha-FLE-5, e foram superiores ao

dos haploides da PE-2 que os originaram, Ha-PE-1 e Ha-PE-40, respectivamente. Com isso, tem-se um indício de uma prevalência das características do Ha-FLE-5 nesse aspecto. Os híbridos F5P33 e F5P42, apresentaram valores de crescimento máximo inferiores aos dois haploides que os originaram, indicando um indício de que a capacidade fermentativa foi reduzida na geração do híbrido.

Ao comparar esses resultados com os encontrados no cultivo em microplaca com etapa prévia de congelamento, os híbridos que apresentaram maiores crescimentos na suspensão aquosa de farinha de trigo, F5P1 e F5P40, também foram os que apresentaram maior valor de μ nas microplacas. Os híbridos F5P33 e F5P42, por possuírem μ estatisticamente iguais ao da Ha-FLE-5, esperava-se também um crescimento equivalente. Isso indica que o valor de μ , apesar de ser um fator fisiológico importante, não está diretamente relacionado ao crescimento máximo que será atingido no teste de capacidade fermentativa. Neste caso, avaliar a produção de etanol e do consumo de maltose, como descrito na seção 4.2.2, pelos haploides e pelos híbridos pode indicar uma relação mais próxima entre um fator fisiológico da cepa e sua habilidade para fermentar a massa.

Por fim, são apresentadas as curvas de evolução do crescimento das suspensões aquosas de farinha de trigo dos híbridos e seus respectivos haploides (Figura 39).

Figura 39 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, dos híbridos e seus respectivos haploides

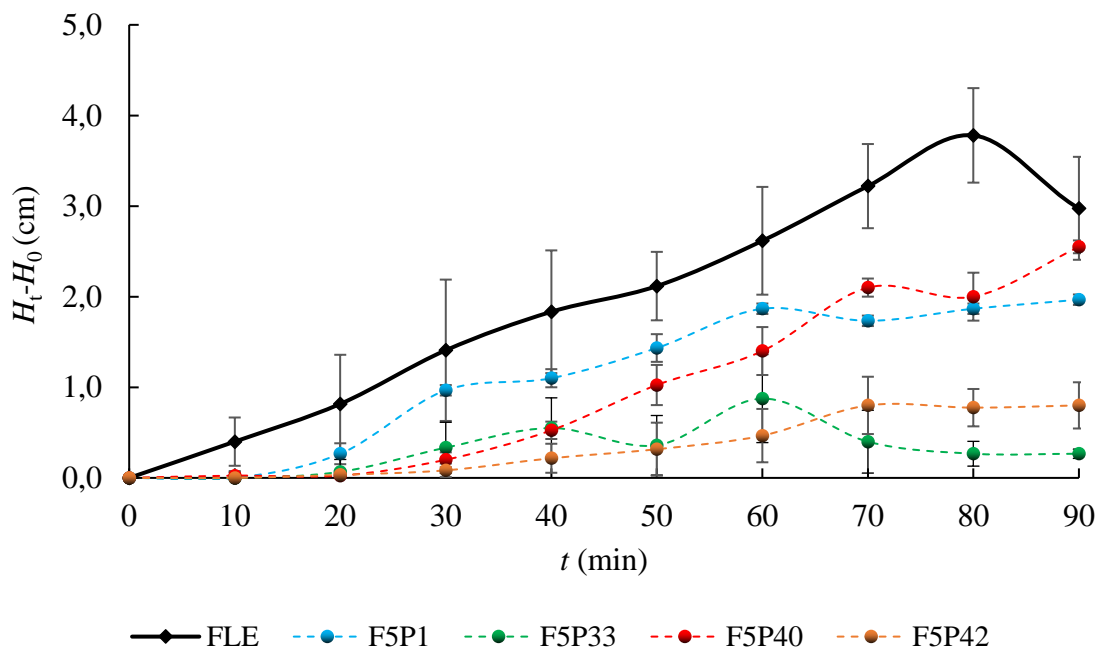


Fonte: o autor (2022)

Os híbridos com melhor desempenho, F5P1 e F5P40, apresentam suas curvas mais próximas a do Ha-FLE-5 e superiores às dos haploides da PE-2, após 30 min para F5P1 e 50 min para F5P40, indicando que, a partir desses tempos, seus crescimentos foram superiores aos haploides da PE-2 que os originaram. Os híbridos F5P33 e F5P42 apresentam menores crescimentos durante os 90 min, portanto, suas curvas estão abaixo da dos haploides que os geraram, tanto do oriundo da FLE quanto da PE-2.

Na Figura 40 podem ser observados os desempenhos dos híbridos, após congelamento, em relação à FLE, sem congelamento, em que todas as alturas máximas obtidas, durante os 90 min de experimento, foram inferiores à da FLE.

Figura 40 – Evolução da diferença de altura da suspensão aquosa de farinha de trigo em função do tempo, da FLE (sem congelamento) e dos híbridos, após congelamento, utilizados como fermento



Fonte: o autor (2022)

Enquanto o máximo de crescimento da suspensão aquosa de farinha de trigo atingido pela FLE foi de $(131,2 \pm 12,7) \%$, os maiores valores alcançados para os híbridos foram de $(64,9 \pm 3,1) \%$ para F5P1 e $(85,0 \pm 2,4) \%$. Na Tabela 13 são apresentados os valores máximos de crescimento utilizando a FLE (sem congelamento) e os híbridos, após o congelamento, como fermento. A análise estatística indicou que os híbridos F5P1 e F5P40 apresentaram crescimentos estatisticamente iguais ($p > 0,05$) entre si e com o Ha-FLE-5, porém nenhum dos híbridos, após o congelamento, apresentou crescimento comparável ao da FLE, sem o congelamento.

Tabela 13 – Crescimentos máximos e seus respectivos tempos da FLE, sem congelamento, e dos híbridos, após o congelamento

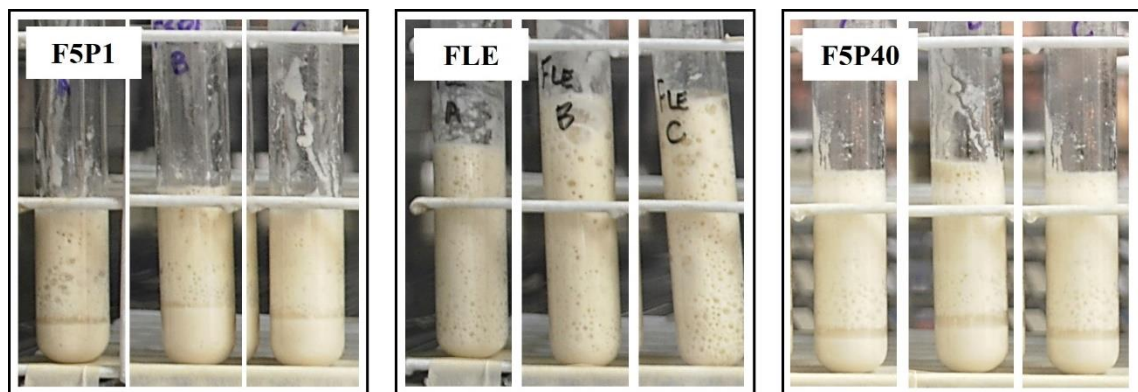
Cepa	Crescimento (%)	t (min)
FLE	131,3 ± 12,7 ^c	80
F5P1	64,9 ± 3,1 ^b	90
F5P33	27,5 ± 14,8 ^a	60
F5P40	85,0 ± 2,4 ^b	90
F5P42	26,0 ± 8,6 ^a	90

*Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Os híbridos que apresentaram indício de prevalência das características do Ha-FLE-5 para fermentar a massa, foram os mais próximos à FLE. Na Figura 41, os crescimentos máximos atingidos pelos híbridos F5P1 e F5P40 são mostrados.

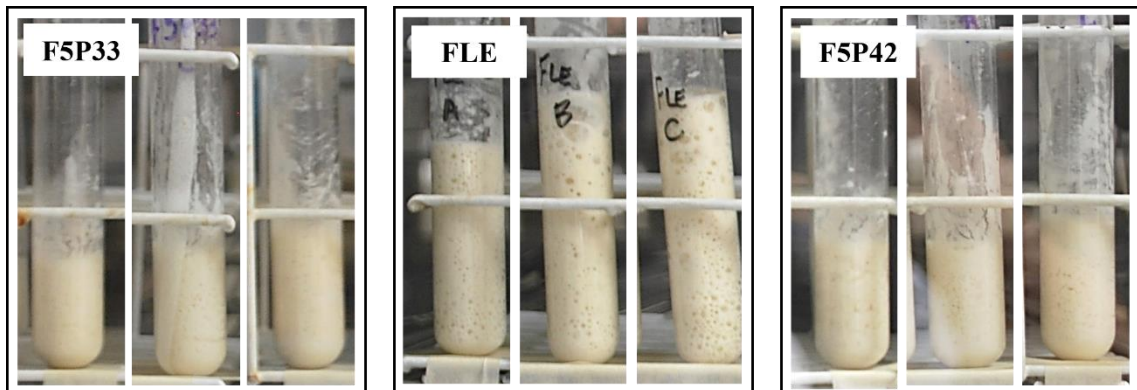
Figura 41 – Crescimentos máximos da FLE, após 80 min de fermentação, e dos híbridos F5P1 e F5P40, após 90 min de fermentação



Fonte: o autor (2022)

Ao avaliar as imagens, nota-se a diferença nas alturas da triplicata da FLE, o que explica a ordem do erro da medida. Também é possível avaliar que o crescimento das suspensões aquosas de farinha de trigo para F5P1 e F5P40, apesar de não serem equivalentes ao da FLE, são crescimentos consideráveis, principalmente o da F5P40, que corresponde à altura da suspensão atingir quase o dobro de sua altura inicial. Ao comparar a FLE com os híbridos F5P33 e F5P42 (Figura 42), tem-se a confirmação de que seus crescimentos máximos foram inferiores aos dos F5P1 e F5P40.

Figura 42 – Crescimentos máximos da FLE, após 80 min de fermentação, e dos híbridos F5P33 e F5P42, após 60 e 90 min de fermentação, respectivamente



Fonte: o autor (2022)

Ao comparar os resultados entre os híbridos e seus respectivos haploides quanto a resistência ao congelamento em cultivo em microplacas com o da capacidade fermentativa, os híbridos F5P1 e F5P40, apresentaram os maiores valores, tanto de crescimento da suspensão quanto de μ . O F5P1 apresentou valor estatisticamente igual ($p>0,05$) à FLE superior ao do F5P42. Para os valores das $DO_{m\acute{a}x}$, os híbridos F5P33 e F5P42 apresentaram valores superiores e estatisticamente iguais ($p>0,05$) ao da FLE. Assim como sugerido anteriormente, uma análise de produção de etanol e consumo de maltose pode relacionar melhor as características fisiológicas da cepa e sua habilidade de fermentar a massa.

5.3.3. Acúmulo de trealose

A seguir, na Tabela 14, são mostrados os valores de trealose para os híbridos, assim como os dos haploides utilizados para sua geração.

Tabela 14 – Concentração de acúmulo de trealose intracelular dos haploides e seus respectivos híbridos, medidos após crescimento em YPD50

Cepa	Trealose (mg/g massa seca)
F5P1	0,0000 \pm 0,0010 ^a
F5P33	1,5173 \pm 0,0148 ^{c,d}
F5P40	1,3739 \pm 0,4141 ^{c,d}
F5P42	1,1352 \pm 0,0585 ^{b,c}
Ha-FLE-5	0,0000 \pm 0,0010 ^a
Ha-PE-1	0,2941 \pm 0,4159 ^{a,b}
Ha-PE-33	0,9952 \pm 0,2089 ^{a,b,c}
Ha-PE-40	3,3865 \pm 0,5677 ^e
Ha-PE-42	3,6315 \pm 0,1021 ^e

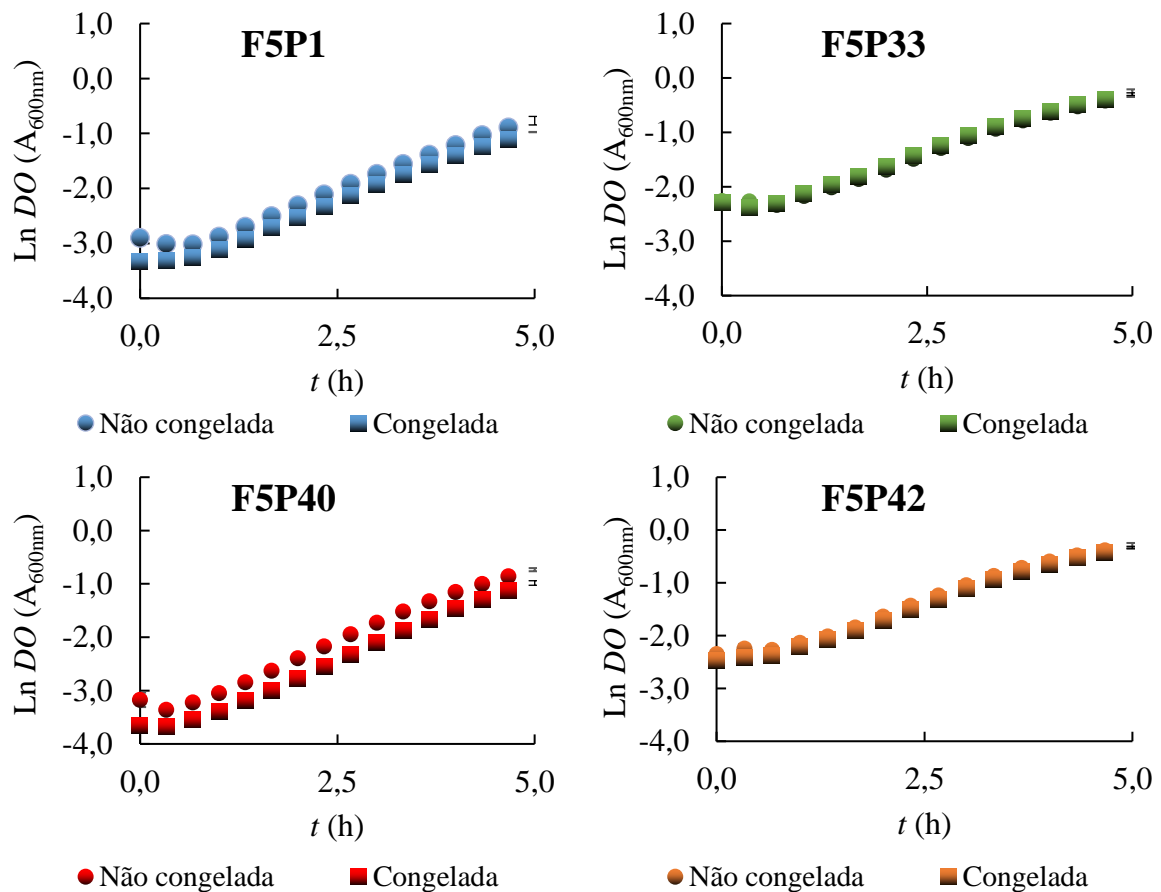
*Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$)

Fonte: o autor (2022)

Dentre todos os híbridos, o F5P33 foi o único que apresentou maior concentração de trealose em comparação aos seus haploides, Ha-FLE-5 e Ha-PE-33. Os híbridos F5P40 e F5P42 apresentaram valores intermediários, estatisticamente iguais entre si ($p>0,05$), assim como os haploides Ha-PE-40 e Ha-PE-42.

Ao comparar os valores de acúmulo de trealose e os obtidos nas microplacas com etapa prévia de congelamento (Figura 43), não há uma relação direta entre os valores de μ ou $DO_{m\acute{a}x}$, como esperado, visto que o congelamento não influenciou essas características. Ao avaliar λ , não houve diferença em nenhum dos híbridos em relação ao não congelado, mesmo para o F5P1 que apresentou o menor acúmulo de trealose.

Figura 43 – Curvas de crescimento dos híbridos em microplaca com e sem etapa prévia de congelamento



Os híbridos F5P1 e F5P40 apresentaram os menores valores de $DO_{inicial}$, indicando uma possível menor resistência ao congelamento em comparação aos híbridos F5P33 e F5P42, que não apresentaram diferenças entre suas curvas de crescimento submetidos ou não ao congelamento. Para F5P1, esse resultado é esperado, visto que é o híbrido com menor acúmulo de trealose, podendo ser feita a associação entre seu menor acúmulo e a perda de sua $DO_{inicial}$

após o processo de congelamento. Isso não se aplica para F5P40, que apresentou um acúmulo estatisticamente igual ($p > 0,05$) aos híbridos F5P33 e F5P42, o que pode ser um indício do acúmulo de outro crioprotetor nessa cepa, como o glicerol.

Ao comparar esses dados com os obtidos no teste de capacidade fermentativa após congelamento, os híbridos com os melhores desempenhos, F5P1 e F5P40, foram os que também apresentaram uma redução na $DO_{inicial}$ nos cultivos em microplacas com etapa prévia de congelamento e não são os com maiores acúmulos de trealose, sendo o F5P1 o com menor acúmulo dentre todos os híbridos. Esse resultado apresenta mais um indício de que outro crioprotetor pode estar presente nessa cepa, sugerindo a realização de quantificação de glicerol, por exemplo, para esses híbridos.

De acordo com a literatura, uma concentração de 4 % de trealose, ou seja, 40 mg de trealose/g massa seca, é necessária para prevenir danos na levedura, assim como é sugerida a adição de (0,4 a 0,8) mg trealose/g de farinha para melhorar a viscoelasticidade e as propriedades fermentativas da massa após o descongelamento (GERARDO-RODRÍGUEZ et al., 2017; MERIC et al., 1995; ROSELL, 2019; ROSELL; ALTAMIRANO-FORTOUL, 2016; ROSELL; GÓMEZ, 2007). Os dois híbridos com maiores crescimentos no teste de capacidade fermentativa, apresentaram acúmulos de trealose muito inferiores a esses valores, sendo o F5P40, o de maior acúmulo entre eles, com apenas $(1,3739 \pm 0,4141)$ mg de trealose/g massa seca. Apesar de apresentar esse acúmulo quase 30 vezes inferior, foi responsável por um crescimento de $(85,0 \pm 2,4)$ % na altura da suspensão aquosa e apresentou uma redução de apenas $(34,0 \pm 2,2)$ % na $DO_{inicial}$ após o congelamento. A redução na $DO_{inicial}$, relacionada à morte celular, é um fator importante para a panificação, pois com isso, há a liberação de compostos redutores que podem quebrar ligações dissulfídicas e, com isso, enfraquecer a rede de glúten (INOUE et al., 1994; RIBOTTA; LEÓN; AÑÓN, 2001; ROSELL; ALTAMIRANO-FORTOUL, 2016). Sendo assim, há indícios de que, considerando apenas os dados de trealose, esse híbrido necessita da adição de menor quantidade de trealose para atingir resultados próximos ao da FLE na capacidade fermentativa, assim como reduzir sua morte celular após o processo de congelamento e descongelamento.

6 CONCLUSÕES

Por meio da esporulação da PE-2 e da FLE, seleção dos haploides obtidos e hibridização, foi possível a obtenção de quatro híbridos com características distintas das cepas parentais diploides e dos haploides que os originaram. Avaliando o crescimento em cultivo em YPD20 em microplaca com etapa prévia de congelamento, os híbridos F5P1 e F5P40 apresentaram valores de μ superiores aos seus haploides, sendo para o F5P40, μ de $(0,6428 \pm 0,0017) \text{ h}^{-1}$, valor superior ao da própria FLE, $(0,5507 \pm 0,0163) \text{ h}^{-1}$, e ao da PE-2, de $(0,5911 \pm 0,0056) \text{ h}^{-1}$. Os valores de $DO_{\text{máx}}$ obtidos de cada híbrido foram superiores aos seus haploides e a PE-2, enquanto os híbridos F5P33 e F5P42 tiveram suas $DO_{\text{máx}}$ estatisticamente iguais aos da FLE ($p > 0,05$). Comparando o cultivo em microplaca com e sem a etapa prévia de congelamento, observou-se que não houve alteração nas fases *lag* dos híbridos, o que representa um indício de que podem apresentar resistência ao congelamento.

Ao submeter os híbridos ao crescimento em farinha de trigo e água, todos apresentaram desempenho inferior ao da FLE ($131,2 \pm 12,7$ %), sem congelamento. Os híbridos responsáveis pelos maiores crescimentos das suspensões aquosas de farinha de trigo durante os 90 min selecionados como tempo alvo do experimento, foram F5P1 e F5P40, com $(64,9 \pm 3,1)$ % e $(85,0 \pm 2,4)$ %, respectivamente. Apesar de não serem crescimentos equivalentes ao da FLE, foram crescimentos muito superiores ao haploides da PE-2 que os originaram, mostrando uma prevalência das características do Ha-FLE-5 nesse aspecto.

Com relação ao acúmulo de trealose, os híbridos com os melhores desempenhos nas suspensões aquosas de farinha de trigo submetidas ao congelamento não são, necessariamente, os com maiores acúmulos. Enquanto F5P40 apresentou o segundo maior acúmulo, F5P1 apresenta o menor entre todos. Com isso, há a hipótese de F5P1 possuir outro crioprotetor, o que explicaria seu bom desempenho nos dois experimentos de congelamento. Já o híbrido com maior acúmulo de trealose, F5P33, foi responsável pelo menor crescimento na suspensão aquosa de farinha de trigo, indicando que a cepa precisa, além da resistência ao congelamento, ter uma boa capacidade fermentativa em meio contendo água e farinha de trigo. Portanto, para uma caracterização fisiológica mais robusta dos híbridos, a quantificação de outro crioprotetor, como o glicerol, pode complementar a análise da trealose. Da mesma forma, a quantificação do etanol produzido e o consumo de maltose podem trazer informações complementares aos resultados obtidos no teste de capacidade fermentativa.

Dentre os híbridos obtidos nesse trabalho, F5P1 e F5P40 apresentaram indícios de prevalências das características da Ha-FLE-5 para a capacidade fermentativa. Já para os outros

aspectos, apresentaram prevalência das características dos haploides da PE-2, sendo que, nos cultivos em microplaca, os valores de μ e $DO_{m\acute{a}x}$ dos híbridos foram superiores ao dos dois haploides de origem. Além disso, apesar do F5P40 apresentar acúmulo de trealose quase 30 vezes inferior ao indicado como necessário para resistência ao congelamento, ele foi responsável por um crescimento de $(85,0 \pm 2,4)$ % na altura da suspensão aquosa. Portanto, esses dois híbridos, principalmente o F5P40, se apresentam como uma possibilidade para utilização, ou para aplicação de engenharia evolutiva, focando na melhora da capacidade fermentativa em massas.

De maneira geral, a hibridização permitiu a obtenção de cepas com características diferentes às das cepas parentais diploides, assim como as dos haploides utilizados para sua geração. Esse método se apresenta como uma possibilidade para a obtenção de cepas com novas características, tanto para a panificação quanto para outros setores que utilizem leveduras. Além disso, por não trabalhar com inserção ou deleção de genes, essa metodologia permitiu a obtenção de quatro híbridos não geneticamente modificados.

REFERÊNCIAS⁵

ABIP. **Indicadores da Panificação e Confeitaria Brasileira em 2019, 2020**. Disponível em: <<https://www.abip.org.br/site/indicadores-da-panificacao-e-confeitaria-em-2019-2/>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

ABIP. **Indicadores da Panificação e Confeitaria 2020, 2021**. Disponível em: <<https://www.abip.org.br/site/wp-content/uploads/2021/01/Indicadores2020-abip.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

ABIP; ITPC; SEBRAE. **Painel De Mercado Da Panificação E Confeitaria**. Brasília: Sebrae, 2017

ABNT; SEBRAE. **Guia de implementação pão tipo francês: Diretrizes para avaliação da qualidade e classificação**. Rio de Janeiro: ABNT; Sebrae, 2015.

ACKER, J. P.; MCGANN, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology**, v. 46, n. 2, p. 197–202, abr. 2003.

ALEXANDER, W. G. et al. Efficient engineering of marker-free synthetic allotetraploids of *Saccharomyces*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 89, p. 10-17, abri. 2016.

ALTUNA, L.; RIBOTTA, P. D.; TADINI, C. C. Effect of a combination of enzymes on the fundamental rheological behavior of bread dough enriched with resistant starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 267–273, nov. 2016.

AYATI, S. V.; HAMDAMI, N.; LE-BAIL, A. Frozen Sangak dough and bread properties: Impact of pre-fermentation and freezing rate. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 4, p. 782–791, abr. 2017.

BAIER-SCHENK, A. et al. In situ observation of the freezing process in wheat dough by confocal laser scanning microscopy (CLSM): Formation of ice and changes in the gluten network. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 2, p. 255–260, set. 2005.

BAIER-SCHENK, A.; HANDSCHIN, S.; CONDE-PETIT, B. Ice in prefermented frozen bread dough - An investigation based on calorimetry and microscopy. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 251–255, mai. 2005.

BAIL, A. LE et al. Influence of storage conditions on frozen French bread dough. **Journal of Food Engineering**, v. 39, n. 3, p. 289–291, fev. 1999.

BAN, C. et al. Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 219–225, nov. 2016.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.

⁵ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BASSO, Thalita Peixoto. **Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* by hybridization for increased tolerance towards inhibitors from second-generation ethanol substrate**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. doi:10.11606/T.11.2015.tde-29042015-132341. Acesso em: 2022-02-11.

BELLON, J. R. et al. Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 603–612, ago. 2011.

BELLON, J. R. et al. Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–14, abr. 2013.

BELLON, J. R. et al. Designing and creating *Saccharomyces* interspecific hybrids for improved, industry relevant, phenotypes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 20, p. 8597–8609, out. 2015.

BENDIXSEN, D. P.; FRAZÃO, J. G.; STELKENS, R. *Saccharomyces* yeast hybrids on the rise. **Yeast**, v. 39, n. 1–2, p. 40–54, 2022.

BENEY, L. et al. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1–3, p. 275–279, abr. 2000.

BHATTACHARYA, M.; LANGSTAFF, T. M.; BERZONSKY, W. A. Effect of frozen storage and freeze–thaw cycles on the rheological and baking properties of frozen doughs. **Food Research International**, v. 36, n. 4, p. 365–372, mar. 2003.

BLANSHARD, J. M. V et al. **Chemistry and physics of baking: materials, processes, and products**. Sutton Bonington: Royal Society of Chemistry, 1986. 284 p.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial - vol. 1: fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2001. 256 p.

BRASIL. Lei no 11.105, de 24 de Março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 Mar. 2005. Seção 1, p. 1–5.

BRASIL. Resolução RDC nº 60, de 05 de Setembro de 2007. Aprova o regulamento técnico “Atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos 6 – Cereais e produtos de ou a base de cereais”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 11 Set. 2007. Seção 1, p. 26-38.

CALVEL, R. **O Pão Francês e os Produtos Correlatos: Tecnologia e Prática da Panificação**. 1. ed. Fortaleza: J. Macedo S.A. - Comércio, Administração e Participações, 1987. 287 p.

CARR, L. G. et al. Physical, textural and sensory characteristics of 7-day frozen part-baked French bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 540–547, jun. 2006.

CARR, L. G.; TADINI, C. C. Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, p. 609–614, set. 2003.

CAUVAIN, S. **Technology of Breadmaking**. 3. ed. New York: Springer International Publishing, 2015. 408 p.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of Breadmaking**. 2. ed. New York: Springer Science+Business Media, 2007. 397 p.

CHEN, C. S. Relationship Between Water Activity and Freezing Point Depression of Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 433–435, mar. 1987.

CHEN, G. et al. Formation and distribution of ice upon freezing of different formulations of wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 3, p. 279–284, mai. 2012.

CHEN, G. et al. Impact of long-term frozen storage on the dynamics of water and ice in wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 1, p. 120–124, jan 2013.

CHIVA, R. A. et al. Nuevas levaduras para nuevos panes. **Alimentaria**, v. 456, p. 38–46, set. 2014.

CODÓN, A. C. et al. New *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 483–491, jan. 2003.

ČUKELJ, N.; NOVOTNI, D. Freezing of Bread. In: FERRANTI, P.; BERRY, E; M.; ANDERSON, J. R. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 498–502.

CUNHA, Gabriel Caetano de Gois. **Desenvolvimento de um meio de cultura sintético definido para imitar melaço de cana-de-açúcar em fermentação etanólica**. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022

CUQ, B.; ABECASSIS, J.; GUILBERT, S. State diagrams to help describe wheat bread processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 759–766, set. 2003.

DICKINSON, J. R.; SCHWEIZER, M. **The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces Cerevisiae***. 2. ed. London: Taylor & Francis, 2004. 459 p.

DON, C. et al. The effect of mixing on glutenin particle properties: Aggregation factors that affect gluten function in dough. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 69–83, jan. 2005.

DONG, J. et al. Improving freeze-tolerance of baker's yeast through seamless gene deletion of NTH1 and PUT1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 817–828, jun. 2016.

ESSELINK, E. F. J. et al. Long-Term Storage Effect in Frozen Dough by Spectroscopy and Microscopy. **Cereal Chemistry Journal**, v. 80, n. 4, p. 396–403, jul. 2003.

FELDMANN, H. **Yeast: Molecular and Cell Biology**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012. 444 p.

FMI. **Frozen Bakery Products Market**, 2022. Disponível em:

<<https://www.futuremarketinsights.com/reports/frozen-bakery-market>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

FOWELL, R. R. The hybridization of yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 18, n. 1, p. 149–160, abr. 1955.

FURLER, Sai; HERMANSEN, Tor Erik; ERIKSEN, Mikkel S. Try Everything. Intérprete: Shakira. In: **Zootopia (Original Motion Picture Soundtrack)**. Los Angeles: Walt Disney Records, 2016. Disponível em: < <https://open.spotify.com/track/3qrH2YFnbEiQeUe4wzgOuP> >. Acesso em: 11 fev. 22.

GERARDO-RODRÍGUEZ, J. E. et al. Management of freezing rate and trehalose concentration to improve frozen dough properties and bread quality. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, jan-mar. 2017.

GIANNOU, V.; TZIA, C. Cryoprotective role of exogenous trehalose in frozen dough products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 3, p. 276–284, set. 2008.

GOESAERT, H. et al. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12–30, jan-mar. 2005.

HART, R. S.; JOLLY, N. P.; NDIMBA, B. K. Characterisation of hybrid yeasts for the production of varietal Sauvignon blanc wine – A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 165, p. 105699, 2019.

HAVET, M.; MANKAI, M.; LE BAIL, A. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. **Journal of Food Engineering**, v. 45, n. 3, p. 139–145, ago. 2000.

HEBLY, M. et al. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 3, p. 1–14, mai. 2015.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 1152–1164, mai. 2018.

INOUE, Y. et al. Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. **Cereal chemistry.**, v. 71, n. 2, p. 118–121, abr. 1994.

IZADI NAJAFABADI, L. et al. Impact of baking conditions and storage temperature on staling of fully and part-baked Sangak bread. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 1, p. 151–156, jul. 2014.

IZAWA, S. et al. Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 108–114, nov. 2004.

JIANG, Z.; BAIL, A. LE; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 172–179, mar. 2008.

JOHNSTON, J. R. **Molecular Genetics of Yeast: A Practical Approach**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1994. 275 p.

KANTER, J.-P. et al. The impact of hybrid yeasts on the aroma profile of cool climate Riesling wines. **Food Chemistry: X**, v. 5, p. 100072, 2020.

KROGERUS, K. et al. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 769–778, mai. 2015.

KROGERUS, K. et al. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 65–78, jan. 2017.

LAAKSONEN, T. J. **Effects of Ingredients on Phase and State Transitions of Frozen Wheat Doughs**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki, 2001. Disponível em: <<http://urn.fi/URN:ISBN:952-10-0126-7>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

LEGRAS, J. L. et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2091–2102, mai. 2007.

LINO, F. S. D. O.; BASSO, T. O.; SOMMER, M. O. A. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, ago. 2018.

LOPANDIC, K. *Saccharomyces* interspecies hybrids as model organisms for studying yeast adaptation to stressful environments. **Yeast**, v. 35, n. 1, p. 21–38, jan. 2018.

LUO, W. et al. Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality - A review of effective methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 25–33, fev. 2018.

MAGALHÃES, F. et al. Frozen-dough baking potential of psychrotolerant *Saccharomyces* species and derived hybrids. **Food Microbiology**, v. 94, n. September 2020, 2021.

MATUDA, Tatiana Guinoza. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento: otimização do uso de aditivos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. doi:10.11606/D.3.2004.tde-20082004-145227. Acesso em: 11 fev. 2022.

MATUDA, T. G.; PESSÔA FILHO, P. A.; TADINI, C. C. Experimental data and modeling of the thermodynamic properties of bread dough at refrigeration and freezing temperatures. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 1, p. 126–132, jan. 2011.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v. 168, n. 3934, p. 939–949, mai. 1970.

MENDONÇA, G. **Mudanças no setor de panificação e confeitaria**. 26º Congresso Internacional da Indústria do Trigo. **Anais...**Campinas: 2019.

MERIC, L. et al. Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: Contribution of cellular trehalose. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 609–615, jun. 1995.

MERLINI, L.; DUDIN, O.; MARTIN, S. G. Mate and fuse: How yeast cells do it. **Open Biology**, v. 3, mar. 2013.

MERTENS, S. et al. A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202–8214, dez. 2015.

MEZIANI, S. et al. Effect of freezing treatments and yeast amount on sensory and physical properties of sweet bakery products. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 336–342, jul. 2012.

MORTIMER, R. K.; HAWTHORNE, D. C. Yeast genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. **The yeast**. 1st ed. New York: Academic Press, v. 1, p. 386–460, 1996.

NAKAMURA, M.; KURATA, T. Effect of L-ascorbic acid on the rheological properties of wheat flour-water dough. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 647–650, out. 1997.

NKONYAM, D.; RIEDEL, H.; SEMTANSK, I. Social and Economic Issues – Genetically Modified Food. In: **Food Industry**. London, United Kingdom: IntechOpen, p. 13, 2013.

O'BRIEN, J.; MORRISSEY, P. A.; AMES, J. M. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 211–248, mar. 1989.

ODA, Y.; OUCHI, K. Hybridization of Bakers' yeast by the rare-mating method to improve leavening ability in dough. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 12, p. 989–993, dez. 1990.

ODA, Y. et al. Interspecific Hybrid Between *Saccharomyces Mikatae* and *Saccharomyces Cerevisiae* as an Alternative Strain for Bread Making. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 10, n. 1, p. 127–129, 2020.

OMEDI, J. O. et al. Advances in present-day frozen dough technology and its improver and novel biotech ingredients development trends—A review. **Cereal Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 34–56, jan. 2019.

PEREIRA, E. P. R. et al. Influência de agentes oxidantes sobre as propriedades reológicas de massas de farinha de trigo branca e de grão inteiro e sobre o volume específico de pão francês. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 03, p. 161–171, out. 2009.

PÉREZ-TRAVÉS, L. et al. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 102–111, mai. 2012.

PIŠKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 183–186, abril. 2006.

PIŠKUR, J.; LANGKJÆR, R. B. Yeast genome sequencing: The power of comparative genomics. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 381–389, jul. 2004.

PROCÓPIO, Dielle Pierotti. **Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Second Generation Ethanol from Xylooligosaccharides and Acetate**. 2021. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021

PYLER, E. J.; GORTON, L. A. **Baking Science & Technology: Formulation & production**. 4 ed. Kansas City: Sosland Publishing Co., 2009. 781 p.

QUEIROZ, Gilmar Michel. **Determinação de propriedades termofísicas do pão tipo francês durante o processo de assamento**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. doi:10.11606/D.3.2001.tde-18102001-150657. Acesso em: 11 fev. 22.

QUEROL, A.; FLEET, G. **Yeasts in Food and Beverages**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. 453 p.

RAHMAN, M. S. Food stability beyond water activity and glass transition: Macro-micro region concept in the state diagram. **International Journal of Food Properties**, v. 12, n. 4, p. 726–740, ago. 2009.

RAHMAN, M. S. Food stability determination by macro-micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 4, p. 402–416, ago. 2010.

RAHMAN, M. S. Applications of macro–micro region concept in the state diagram and critical temperature concepts in determining the food stability. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1679–1685, jun. 2012.

RASHIDI, A. et al. Frozen baguette bread dough I. Rheological behavior during storage. **Journal of Cereal Science**, v. 72, p. 24–29, nov. 2016.

RESTUCCIA, C. et al. Saccharomyces hybrids as a tool for improving the quality of moscato di siracusa doc wine. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 1, p. 28–35, jan. 2011.

RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E.; AÑÓN, M. C. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 913–918, jun. 2001.

RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E.; AÑÓN, M. C. Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. **Food Research International**, v. 36, n. 4, p. 357–363, jan. 2003.

RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E.; AÑÓN, M. C. Effects of Yeast Freezing in Frozen Dough. **Cereal Chemistry Journal**, v. 80, n. 4, p. 454–458, jul. 2003.

RONDA, F. et al. Staling of frozen partly and fully baked breads. Study of the combined effect of amylopectin recrystallization and water content on bread firmness. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 1, p. 97–103, jan. 2011.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts: Yeast Technology**. 2. ed. London: Academic Press Limited, 1993. 620 p.

ROSELL, C. M. Trends in Science of Doughs and Bread Quality. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. B. T. **Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention**. 2. ed. Crambridge: Academic Press, 2019. p. 333–343.

ROSELL, C. M.; ALTAMIRANO-FORTOUL, R. Cryoprotective Effect of Ingredients on Bread Quality. In: CALDERON-DOMINGUEZ, G.; GUTIERREZ-LOPEZ, G. F.; NIRANJAN, K. **Advances in Heat Transfer Unit Operations: Baking and Freezing in Bread Making**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 351–370.

ROSELL, C. M.; GÓMEZ, M. Frozen dough and partially baked bread: An update. **Food Reviews International**, v. 23, n. 3, p. 303–319, jun. 2007.

SANCHEZ, D. B. O. et al. Effect of Maize Resistant Starch and Transglutaminase: A Study of Fundamental and Empirical Rheology Properties of Pan Bread Dough. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 10, p. 2865–2876, jan. 2014.

SANTOS, R. M. et al. Quantitative proteomic analysis of the Saccharomyces cerevisiae industrial strains CAT-1 and PE-2. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 114–121, jan. 2017.

SASANO, Y. et al. Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances the fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 624–627, mar. 2012.

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

SHI, X. et al. The relationship of freeze tolerance with intracellular compounds in baker's yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3042–3053, mar. 2014.

SHIMA, J. et al. Breeding of freeze-tolerant baker's yeast by the regulation of trehalose metabolism. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 34, p. 257–260, out. 2000.

SHIMA, J.; TAKAGI, H. Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 53, n. 3, p. 155–164, mai. 2009.

SILVA, Maria Estela da. **Avaliação do desenvolvimento de leveduras contaminantes de processos de produção de etanol por parâmetros não convencionais**. 1994. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994. doi:10.11606/D.11.2019.tde-20191218-143715. Acesso em: 11 fev. 22.

SILVAS-GARCÍA, M. I. et al. Effect of freezing rate and storage on the rheological, thermal and structural properties of frozen wheat dough starch. **Starch/Staerke**, v. 68, n. 11–12, p. 1103–1110, fev. 2016.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M.; BRUCE, I. J. **Yeast Genetics: a manual of methods**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989. 104 p.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 353–360, abr. 1995.

STATISTA. **Consumer Market Outlook – Bread**, 2022. Disponível em: <<https://www.statista.com/outlook/40050100/100/bread/worldwide>>. Acesso em: 11 fev. 22.

SULTAN, W. J. **Practical Baking**. 5. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. 822 p.

SUN, X. et al. MAL62 overexpression and NTH1 deletion enhance the freezing tolerance and fermentation capacity of the baker's yeast in lean dough. **Microbial cell factories**, v. 15, p. 54, abr. 2016.

TAN, H. et al. Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1275–1285, ago. 2014.

TANGHE, A. et al. Identification of genes responsible for improved cryoresistance in fermenting yeast cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1–3, p. 259–262, abr. 2000.

TEUNISSEN, A. et al. Isolation and Characterization of a Freeze-Tolerant Diploid Derivative of an Industrial Baker's Yeast Strain and Its Use in Frozen Doughs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4780–4787, out. 2002.

TULHA, J. et al. Yeast, the Man's Best Friend. In: VALDEZ, B. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**. London: IntechOpen, 2012. 502 p.

VAN DER BORGHT, A. et al. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, mai. 2005.

WANG, P. et al. Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 238–246, mar. 2014.

WEEGELS, P. L. et al. Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 2, p. 103–111, mar. 1996.

WEEGELS, P. L.; HAMER, R. J.; SCHOFIELD, J. D. Depolymerisation and Re-polymerisation of Wheat Glutenin During Dough Processing. II. Changes in Composition. **Journal of Cereal Science**, v. 25, n. 2, p. 155–163, mar. 1997.

WINANS, M. J. Yeast Hybrids in Brewing. **Fermentation**, v. 8, n. 2, 2022.

YI, J.; JOHNSON, J. W.; KERR, W. L. Properties of bread made from frozen dough containing waxy wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 364–369, nov. 2009.

YI, J.; KERR, W. L. Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1474–1483, nov. 2009a.

YI, J.; KERR, W. L. Combined effects of dough freezing and storage conditions on bread quality factors. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 495–501, ago. 2009b.

ZOUNIS, S. et al. Studying frozen dough structure using low-temperature scanning electron microscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 2, p. 135–147, fev. 2002.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, jun. 1990.

APÊNDICE A

Tabela A1 – Dados obtidos no experimento para a identificação do tipo sexual dos esporos da PE-2 e da FLE

(continua)

E esporos	Formação de halo na placa		Conclusão	Nomenclatura
	<i>Tester MATα</i>	<i>Tester MATa</i>		
1	Não	Não	Diploide e descarte	-
2	Não	Não	Diploide e descarte	-
3	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-1
4	Não	Não	Diploide e descarte	-
5	Não	Não	Diploide e descarte	-
6	Não	Não	Diploide e descarte	-
7	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-2
8	Não	Não	Diploide e descarte	-
9	Não	Não	Diploide e descarte	-
10	Não	Não	Diploide e descarte	-
11	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-3
12	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-4
13	Não	Não	Diploide e descarte	-
14	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-5
15	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-6
16	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-7
PE-2 17	Não	Não	Diploide e descarte	-
18	Não	Não	Diploide e descarte	-
19	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-8
20	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-9
21	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-10
22	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-11
23	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-12
24	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-13
25	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-14
26	Não	Não	Diploide e descarte	-
27	Não	Não	Diploide e descarte	-
28	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-15
29	Não	Não	Diploide e descarte	-
30	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-16
31	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-17
32	Não	Não	Diploide e descarte	-
33	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-18
34	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-19

Tabela A1 – Dados obtidos no experimento para a identificação do tipo sexual dos esporos da PE-2 e da FLE

(continua)

E esporos	Formação de halo na placa		Conclusão	Nomenclatura
	<i>Tester MATα</i>	<i>Tester MATa</i>		
35	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-20
36	Não	Não	Diploide e descarte	-
37	Não	Não	Diploide e descarte	-
38	Não	Não	Diploide e descarte	-
39	Não	Não	Diploide e descarte	-
40	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-21
41	Não	Não	Diploide e descarte	-
42	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-22
43	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-23
44	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-24
45	Não	Não	Diploide e descarte	-
46	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-25
47	Não	Não	Diploide e descarte	-
48	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-26
49	Não	Não	Diploide e descarte	-
50	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-27
51	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-28
52	Não	Não	Diploide e descarte	-
PE-2 53	Não	Não	Diploide e descarte	-
54	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-29
55	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-30
56	Não	Não	Diploide e descarte	-
57	Não	Não	Diploide e descarte	-
58	Não	Não	Diploide e descarte	-
59	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-31
60	Não	Não	Diploide e descarte	-
61	Não	Não	Diploide e descarte	-
62	Não	Não	Diploide e descarte	-
63	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-32
64	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-33
65	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-34
66	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-35
67	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-36
68	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-37
69	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-38
70	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-39
71	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-40

Tabela A1 – Dados obtidos no experimento para a identificação do tipo sexual dos esporos da PE-2 e da FLE

(conclusão)

Esporos	Formação de halo na placa		Conclusão	Nomenclatura	
	<i>Tester MATα</i>	<i>Tester MATa</i>			
PE-2	72	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-41
	73	Não	Não	Diploide e descarte	-
	74	Não	Não	Diploide e descarte	-
	75	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-PE-42
	76	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-PE-43
	1	Não	Não	Diploide e descarte	-
FLE	2	Não	Não	Diploide e descarte	-
	3	Não	Não	Diploide e descarte	-
	4	Não	Não	Diploide e descarte	-
	5	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-1
	6	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-2
	7	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-3
	8	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-4
	9	Não	Sim	Haploide MATa	Ha-FLE-5
	10	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-6
	11	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-7
	12	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-8
	13	Não	Não	Diploide e descarte	-
	14	Não	Não	Diploide e descarte	-
	15	Não	Não	Diploide e descarte	-
	16	Não	Não	Diploide e descarte	-
	17	Não	Não	Diploide e descarte	-
	18	Não	Não	Diploide e descarte	-
	19	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-9
	20	Sim	Não	Haploide MAT α	Ha-FLE-10

Fonte: o autor (2022)

Tabela A2 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPD20 de todas as cepas estudadas

(continua)

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
PE-2	0,6178 \pm 0,0648	0,8716 \pm 0,0062
Ha-PE-1	0,5764 \pm 0,0862	0,8376 \pm 0,0324
Ha-PE-2	0,2442 \pm 0,0216	0,7496 \pm 0,0986
Ha-PE-3	0,4921 \pm 0,0349	0,9582 \pm 0,0325
Ha-PE-4	0,4189 \pm 0,0490	0,8619 \pm 0,0741
Ha-PE-5	0,2442 \pm 0,0306	0,6821 \pm 0,0269
Ha-PE-6	0,4944 \pm 0,0153	0,9236 \pm 0,0321
Ha-PE-7	0,4178 \pm 0,0105	0,9063 \pm 0,0599
Ha-PE-8	0,5292 \pm 0,0248	0,9367 \pm 0,0653
Ha-PE-9	0,3514 \pm 0,0764	0,6436 \pm 0,0591
Ha-PE-10	0,4743 \pm 0,0092	0,8502 \pm 0,1091
Ha-PE-11	0,4995 \pm 0,0169	0,9195 \pm 0,0316
Ha-PE-12	0,2969 \pm 0,1494	0,6768 \pm 0,0409
Ha-PE-13	0,3437 \pm 0,0679	0,6833 \pm 0,0421
Ha-PE-14	0,3412 \pm 0,0294	0,6260 \pm 0,0329
Ha-PE-15	0,5667 \pm 0,0198	0,9140 \pm 0,0092
Ha-PE-16	0,3308 \pm 0,0174	0,7199 \pm 0,0389
Ha-PE-17	0,5342 \pm 0,0653	0,9211 \pm 0,0225
Ha-PE-18	0,5884 \pm 0,0341	0,9501 \pm 0,0762
Ha-PE-19	0,3324 \pm 0,0312	0,8060 \pm 0,0105
Ha-PE-20	0,5697 \pm 0,0655	0,8895 \pm 0,0573
Ha-PE-21	0,5490 \pm 0,0534	0,8958 \pm 0,0310
Ha-PE-22	0,4506 \pm 0,0242	0,9936 \pm 0,0173
Ha-PE-23	0,5478 \pm 0,2187	0,9316 \pm 0,1109
Ha-PE-24	0,5246 \pm 0,0260	0,9897 \pm 0,0897
Ha-PE-25	0,2303 \pm 0,0343	0,7601 \pm 0,0961
Ha-PE-26	0,4700 \pm 0,0481	0,9150 \pm 0,0816
Ha-PE-27	0,5543 \pm 0,0519	0,9725 \pm 0,0463
Ha-PE-28	0,5740 \pm 0,0217	0,9193 \pm 0,0364
Ha-PE-29	0,4116 \pm 0,0122	1,0057 \pm 0,0794
Ha-PE-30	0,4202 \pm 0,1045	0,8841 \pm 0,0639
Ha-PE-31	0,4845 \pm 0,1115	0,9525 \pm 0,0268
Ha-PE-32	0,4382 \pm 0,0302	0,8948 \pm 0,0504
Ha-PE-33	0,5545 \pm 0,0286	0,9224 \pm 0,0117
Ha-PE-34	0,4507 \pm 0,0303	0,8788 \pm 0,0328
Ha-PE-35	0,5534 \pm 0,0145	0,9560 \pm 0,0157
Ha-PE-36	0,5094 \pm 0,0288	0,9762 \pm 0,0948
Ha-PE-37	0,4374 \pm 0,0278	0,8850 \pm 0,0284

Tabela A2 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPD20 de todas as cepas estudadas

(conclusão)

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
Ha-PE-38	0,3257 \pm 0,0139	0,7537 \pm 0,0206
Ha-PE-39	0,5443 \pm 0,0173	0,9813 \pm 0,0140
Ha-PE-40	0,5546 \pm 0,0594	0,9324 \pm 0,0244
Ha-PE-41	0,4669 \pm 0,0106	0,9124 \pm 0,0075
Ha-PE-42	0,5361 \pm 0,0040	0,9313 \pm 0,0115
Ha-PE-43	0,4170 \pm 0,0386	0,8837 \pm 0,0450
FLE	0,6745 \pm 0,0110	0,8761 \pm 0,0038
Ha-FLE-1	0,1847 \pm 0,0271	0,5829 \pm 0,0072
Ha-FLE-2	0,2083 \pm 0,0371	0,5564 \pm 0,0339
Ha-FLE-3	0,1660 \pm 0,0189	0,4296 \pm 0,0238
Ha-FLE-4	0,1452 \pm 0,0376	0,0494 \pm 0,0101
Ha-FLE-5	0,5482 \pm 0,0396	0,7333 \pm 0,0197
Ha-FLE-6	0,4299 \pm 0,0199	0,7963 \pm 0,0093
Ha-FLE-7	0,2144 \pm 0,0222	0,7043 \pm 0,0247
Ha-FLE-8	0,3619 \pm 0,0559	0,6571 \pm 0,0193
Ha-FLE-9	0,2130 \pm 0,2881	0,0627 \pm 0,0227
Ha-FLE-10	0,1566 \pm 0,0606	0,1573 \pm 0,0127

Fonte: o autor (2022)

Tabela A3 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPM10 de todas as cepas estudadas

(continua)

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
PE-2	0,4188 \pm 0,0192	0,6736 \pm 0,0066
Ha-PE-1	0,4111 \pm 0,0045	0,6856 \pm 0,0022
Ha-PE-2	0,2826 \pm 0,0141	0,5355 \pm 0,0290
Ha-PE-3	0,3778 \pm 0,0097	0,7087 \pm 0,0076
Ha-PE-4	0,3190 \pm 0,0049	0,6546 \pm 0,0095
Ha-PE-5	0,2819 \pm 0,0165	0,6187 \pm 0,0525
Ha-PE-6	0,3717 \pm 0,0045	0,6951 \pm 0,0074
Ha-PE-7	0,3309 \pm 0,0026	0,6823 \pm 0,0039
Ha-PE-8	0,3645 \pm 0,0113	0,6779 \pm 0,0152
Ha-PE-9	0,2779 \pm 0,0051	0,6017 \pm 0,0266
Ha-PE-10	0,3644 \pm 0,0048	0,6589 \pm 0,0015
Ha-PE-11	0,3805 \pm 0,0718	0,6664 \pm 0,0437
Ha-PE-12	0,2796 \pm 0,0163	0,5880 \pm 0,0246
Ha-PE-13	0,2993 \pm 0,0086	0,6705 \pm 0,0074
Ha-PE-14	0,3365 \pm 0,1165	0,5699 \pm 0,0566
Ha-PE-15	0,3462 \pm 0,0183	0,6634 \pm 0,0111
Ha-PE-16	0,2913 \pm 0,0143	0,6029 \pm 0,0063
Ha-PE-17	0,3926 \pm 0,0057	0,7477 \pm 0,0050
Ha-PE-18	0,3387 \pm 0,0123	0,6742 \pm 0,0118
Ha-PE-19	0,2884 \pm 0,0062	0,6532 \pm 0,0139
Ha-PE-20	0,3847 \pm 0,0165	0,6886 \pm 0,0046
Ha-PE-21	0,3844 \pm 0,0054	0,7075 \pm 0,0053
Ha-PE-22	0,3295 \pm 0,0161	0,6783 \pm 0,0223
Ha-PE-23	0,4047 \pm 0,0084	0,6917 \pm 0,0214
Ha-PE-24	0,3765 \pm 0,0029	0,7366 \pm 0,0097
Ha-PE-25	0,2879 \pm 0,0125	0,7393 \pm 0,0095
Ha-PE-26	0,3559 \pm 0,0134	0,6717 \pm 0,0075
Ha-PE-27	0,3889 \pm 0,0028	0,7327 \pm 0,0167
Ha-PE-28	0,3831 \pm 0,0162	0,7364 \pm 0,0160
Ha-PE-29	0,4120 \pm 0,0360	0,7074 \pm 0,0082
Ha-PE-30	0,3064 \pm 0,0451	0,6612 \pm 0,0943
Ha-PE-31	0,3865 \pm 0,0218	0,6957 \pm 0,0125
Ha-PE-32	0,3448 \pm 0,0094	0,7260 \pm 0,0142
Ha-PE-33	0,3652 \pm 0,0040	0,7197 \pm 0,0145
Ha-PE-34	0,3335 \pm 0,0123	0,7011 \pm 0,0201
Ha-PE-35	0,3569 \pm 0,0049	0,7289 \pm 0,0052
Ha-PE-36	0,3628 \pm 0,0212	0,7655 \pm 0,0118
Ha-PE-37	0,3524 \pm 0,0032	0,6937 \pm 0,0055

Tabela A3 – Valores de μ e $DO_{\text{máx}}$ calculados a partir do cultivo em microplaca em YPM10 de todas as cepas estudadas

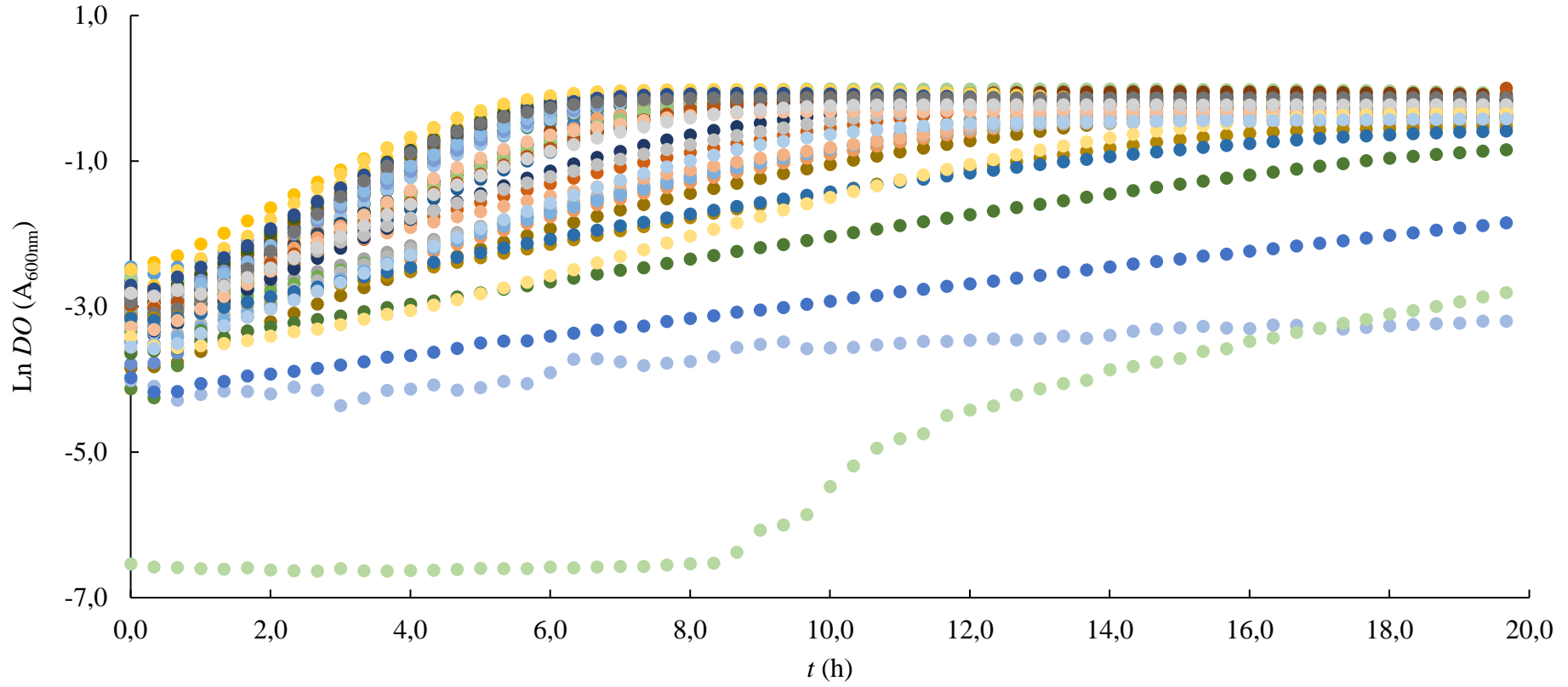
(conclusão)

Cepa	μ (h^{-1})	$DO_{\text{máx}}$
Ha-PE-38	0,2741 \pm 0,0069	0,6603 \pm 0,0171
Ha-PE-39	0,3921 \pm 0,0158	0,7141 \pm 0,0126
Ha-PE-40	0,3383 \pm 0,0034	0,7520 \pm 0,0098
Ha-PE-41	0,3708 \pm 0,0167	0,7165 \pm 0,0142
Ha-PE-42	0,3925 \pm 0,0096	0,7211 \pm 0,0095
Ha-PE-43	0,6339 \pm 0,0700	0,6433 \pm 0,0397
FLE	0,5722 \pm 0,0314	0,6710 \pm 0,0179
Ha-FLE-1	0,1594 \pm 0,0070	0,4127 \pm 0,0097
Ha-FLE-2	0,1656 \pm 0,0201	0,4119 \pm 0,0196
Ha-FLE-3	0,1489 \pm 0,0177	0,3435 \pm 0,0247
Ha-FLE-4	0,1309 \pm 0,0499	0,0845 \pm 0,0169
Ha-FLE-5	0,4506 \pm 0,0103	0,6144 \pm 0,0092
Ha-FLE-6	0,3456 \pm 0,0171	0,6761 \pm 0,0220
Ha-FLE-7	0,1868 \pm 0,0378	0,5747 \pm 0,0107
Ha-FLE-8	0,2695 \pm 0,0127	0,5185 \pm 0,0131
Ha-FLE-9	0,2086 \pm 0,0878	0,0852 \pm 0,0140
Ha-FLE-10	0,1097 \pm 0,0060	0,2189 \pm 0,0242

Fonte: o autor (2022)

APÊNDICE B

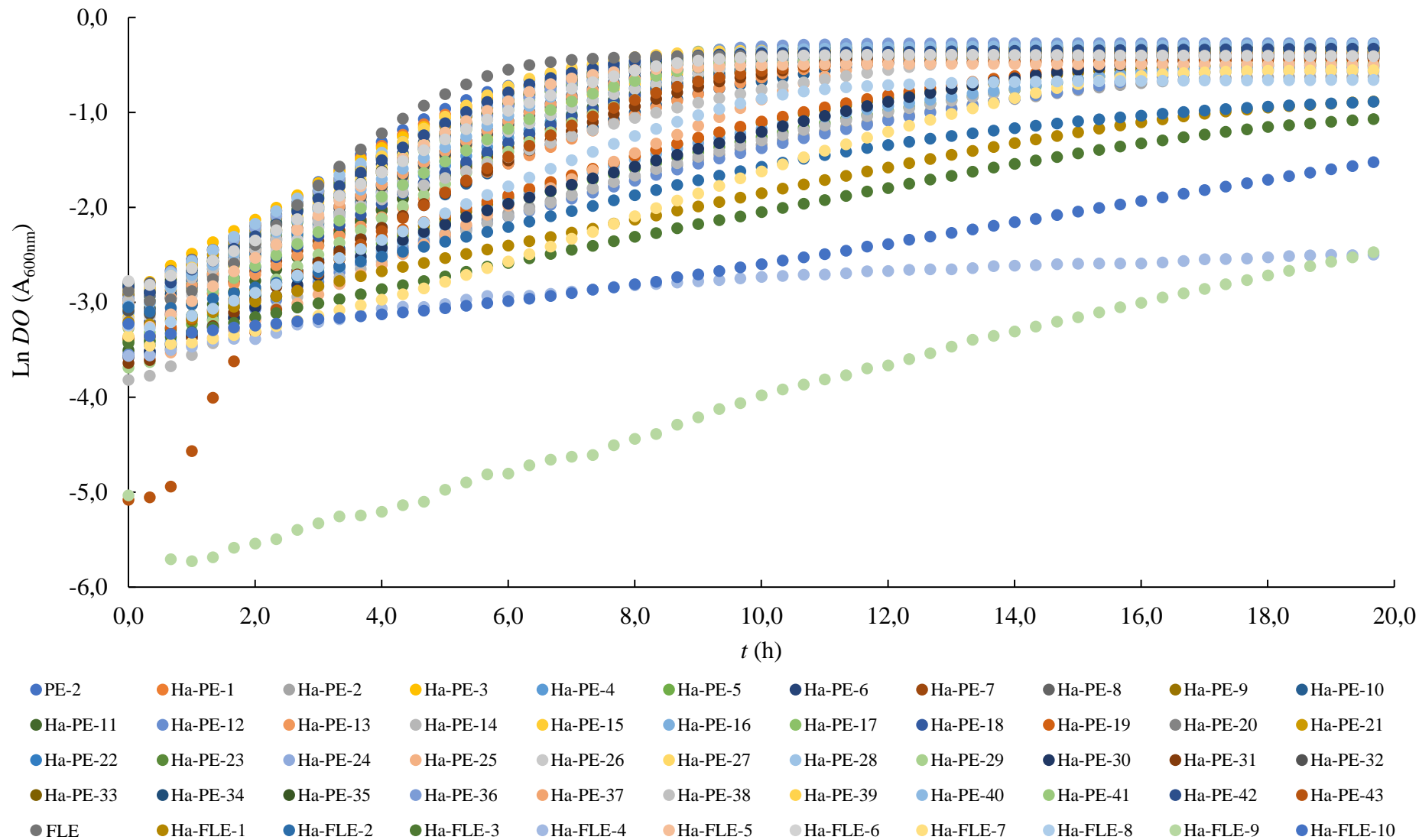
Figura B1 – Curvas de crescimento das cepas parentais PE-2 e FLE e dos seus haploides obtidas em YPD20



- PE-2 ● Ha-PE-1 ● Ha-PE-2 ● Ha-PE-3 ● Ha-PE-4 ● Ha-PE-5 ● Ha-PE-6 ● Ha-PE-7 ● Ha-PE-8 ● Ha-PE-9 ● Ha-PE-10
- Ha-PE-11 ● Ha-PE-12 ● Ha-PE-13 ● Ha-PE-14 ● Ha-PE-15 ● Ha-PE-16 ● Ha-PE-17 ● Ha-PE-18 ● Ha-PE-19 ● Ha-PE-20 ● Ha-PE-21
- Ha-PE-22 ● Ha-PE-23 ● Ha-PE-24 ● Ha-PE-25 ● Ha-PE-26 ● Ha-PE-27 ● Ha-PE-28 ● Ha-PE-29 ● Ha-PE-30 ● Ha-PE-31 ● Ha-PE-32
- Ha-PE-33 ● Ha-PE-34 ● Ha-PE-35 ● Ha-PE-36 ● Ha-PE-37 ● Ha-PE-38 ● Ha-PE-39 ● Ha-PE-40 ● Ha-PE-41 ● Ha-PE-42 ● Ha-PE-43
- FLE ● Ha-FLE-1 ● Ha-FLE-2 ● Ha-FLE-3 ● Ha-FLE-4 ● Ha-FLE-5 ● Ha-FLE-6 ● Ha-FLE-7 ● Ha-FLE-8 ● Ha-FLE-9 ● Ha-FLE-10

Fonte: o autor (2022)

Figura B2 – Curvas de crescimento das cepas parentais PE-2 e FLE e dos seus haploides obtidas em YPM10



Fonte: o autor (2022)