



# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

Fermentação láctica como estratégia de valorização de resíduos industriais de ketchup e integração em novas formulações.

por

Beatriz da Silva Baía Costa

[Setembro 2023]





# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

FERMENTAÇÃO LÁCTICA COMO ESTRATÉGIA DE VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS  
INDUSTRIAIS DE KETCHUP E INTEGRAÇÃO EM NOVAS FORMULAÇÕES.

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica  
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Beatriz da Silva Baía Costa

Supervisor (Empresa): Mestre Diogo Figueira

Orientadora (Universidade): Doutora Maria da Conceição Hogg

[Setembro 2023]



## Resumo

Nos últimos anos, os padrões de produção e consumo cada vez mais insustentáveis levaram a um aumento dos recursos utilizados, com um desperdício anual estimado em 1,3 mil milhões de toneladas, equivalente a um terço da produção mundial de alimentos para consumo humano. A empresa Casa Mendes Gonçalves produz anualmente grandes quantidades de ketchup com a formação inerente de resíduos industriais, designados purgas. Atualmente, a sua valorização passa pela produção de biogás e fertilizantes, mas a solução encontrada não garante a sua valorização na íntegra, uma vez que parte das purgas acabam em aterros e representam um custo significativo para a empresa. Assim, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia de valorização das purgas, através de um processo fermentativo com bactérias ácido lácticas (BAL) e posterior incorporação em ketchups. Para tal, recolheram-se duas purgas da unidade produtiva da empresa, uma sem conservantes e outra com sorbato de potássio, que não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros físico químicos face aos ketchups, confirmando a sua relevância de valorização. As análises microbiológicas realizadas demonstraram que as purgas possuem parâmetros adequados para o reprocessamento destes fluxos. As purgas revelaram-se meios com condições pouco favoráveis para o desenvolvimento das BAL, pelo que se realizou uma diluição de fator 6 (D6) para diminuir a acidez acética e o °Brix e aumentar o pH. Na purga sem conservantes os inóculos mais promissores, que fermentaram em apenas 7 dias, foram *Leuconostoc mesenteroides*, individualmente e em consórcio com *Lactobacillus plantarum*, com D6 e 1,5% de sal. Nesta diluição, também a associação de *Debaryomyces hansenii* com o consórcio de 4 BAL com 0,4% de sal fermentou ao fim de uma semana. O consórcio das 4 BAL também se destacou na purga com fator de diluição 3 (D3) com atividade fermentativa em 7 dias. Na purga com conservantes, o consórcio das 4 bactérias em estudo com D6 e 0,4% de NaCl, assim como com D3 e 1,5% de sal apresentaram a maior produção de ácido láctico. As quatro fermentações da purga sem conservantes com melhores resultados foram selecionadas para o desenvolvimento de ketchups com diferentes percentagens de incorporação de cada uma das quatro purgas fermentadas. O ketchup sem conservantes que levou à formação das purgas foi utilizado como padrão e, de uma forma geral, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros físico químicos entre as amostras desenvolvidas e o padrão. A análise sensorial permitiu selecionar os ketchups com a incorporação de 40,9% de purga fermentada com o consórcio de 4 BAL, com D3 e 1,5% de sal e o ketchup com a incorporação de 39,2% de purga fermentada com *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, com D6 e 1,5% de sal. A análise nutricional destas amostras evidenciou a melhoria nutricional dos ketchups com a inclusão da purga fermentada, que apresentaram um conteúdo proteico mais elevado, assim como um teor de cinzas e fibras alimentares mais elevado. Futuramente, é essencial a análise das fermentações com recurso a HPLC para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos e o teor de açúcares ao longo da fermentação, de forma a correlacionar com os resultados de pH e acidez obtidos nos ensaios fermentativos realizados.

**Palavras-chave:** Circularidade; sustentabilidade; ketchup; fermentação; desperdício alimentar.



## Abstract

In recent years, the increasingly unsustainable production and consumption patterns have led to an increase in the resources used, with an estimated annual waste of 1.3 billion tonnes, equivalent to a third of the world's food production for human consumption. The company Casa Mendes Gonçalves annually produces large quantities of ketchup with the inherent formation of industrial waste, called purges. Currently, its recovery goes through the production of biogas and fertilizers, but the solution found does not guarantee its full recovery, since part of the purges end up in landfill and represent a significant cost to the company. Thus, the present work aims to develop a strategy of valorization of the purges, through a fermentative process with lactic acid bacteria (LAB) and subsequent incorporation in ketchups. To this end, two purges were collected from the company's production unit, one without preservatives and the other with potassium sorbate, which did not present any significant differences ( $p > 0.05$ ) in the physicochemical parameters compared to ketchups, confirming their relevance of valorization. The microbiological analyses performed demonstrated that the purges have adequate parameters for the reprocessing of these flows. The purges proved to be a medium with unfavorable conditions for the development of LAB, so a dilution of factor 6 (D6) was performed to decrease acetic acidity and °Brix and increase pH. In the purge without preservatives the most promising inoculums, which fermented in just 7 days, were *Leuconostoc mesenteroides*, individually and in consortium with *Lactobacillus plantarum*, with D6 and 1.5% salt. Also in this dilution, the association of *Debaryomyces hansenii* with the consortium of 4 LAB with 0.4% salt fermented after one week. The consortium of the 4 LAB also stood out in the purges with dilution factor of 3 (D3) with fermentative activity in 7 days. In the purge with preservatives, the consortium of the 4 bacteria under study with D6 and 0.4% NaCl, as well as with D3 and 1.5% salt showed the highest lactic acid production.

The four preservative-free purge fermentations with the best results were selected for the development of ketchups with different percentages of incorporation of each one of the four fermented purges. The ketchup without preservatives that led to the formation of the purges was used as a standard and, in general, there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the physicochemical parameters between the developed samples and the standard. The sensory analysis allowed to select the ketchups with the incorporation of 40.9% of fermented purge with the consortium of 4 LAB, with D3 and 1.5% of salt and the ketchup with the incorporation of 39.2% of fermented purge with *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*, with D6 and 1.5% of salt. The nutritional analysis of these samples showed the nutritional improvement of ketchups with the inclusion of fermented purge, which has higher protein content as well as a superior content of ash and dietary fiber. In the future, it is essential to analyze the fermentations using HPLC to identify and quantify the organic acids produced and the sugar content throughout the fermentation in order to correlate with the pH and acidity results obtained in the fermentation tests performed.

**Keywords:** Circularity; sustainability; ketchup; fermentation; food waste.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha família que sempre me apoiou e me motivou ao longo deste percurso. À minha mãe que sempre me alegrou quando as coisas não correram tão bem, ao meu pai que me deu sempre os melhores conselhos e ao meu irmão pela tranquilidade que sempre me transmite. A vocês MUITO obrigada por festejarem sempre as minhas conquistas como se fossem vossas.

À Ema que me acompanhou de pertos nestes meses e que tornou tudo mais leve e animado.

À Carminho e à Ema que foram as melhores pessoas para partilhar estes 6 meses de estágio com boa disposição. Uma grande obrigada por todas as conversas, desabafos e pelas gargalhadas!

Agradeço também a todos no departamento de IDI da empresa que me ajudaram a integrar e a sentir-me em “casa”. Em especial agradeço à Maria que me ensinou imenso de fermentações, e me despertou para este mundo do qual eu pouco sabia, e que se tornou uma grande amiga. Ao Diogo, o meu supervisor na empresa, agradeço também por tudo o que me ensinou e pelo tempo disponibilizado.

À professora Conceição Hogg obrigada por toda a sabedoria transmitida ao longo do meu percurso académico.

À Universidade Católica Portuguesa do Porto agradeço pelas oportunidades que me proporcionou e pelas pessoas fantásticas que pude conhecer.



## ÍNDICE

Resumo.....	iii
Abstract .....	v
Agradecimentos .....	vii
ÍNDICE.....	ix
Lista de figuras .....	xii
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Local de estágio .....	2
1.3 Objetivo .....	2
1.4 Etapas do Estágio .....	3
<b>2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 Fermentação láctica.....	3
2.1.1 Bactérias ácido lácticas (BAL).....	4
2.1.2 Levedura: <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	8
2.1.3 Modos de iniciação .....	9
2.1.4 Fatores que influenciam o processo de fermentação .....	9
2.2 Propriedades dos produtos fermentados .....	10
2.2.1 Propriedades antioxidantes .....	11
2.2.2 Propriedades antimicrobianas.....	11
2.3 Tendência de consumo de produtos fermentados .....	11
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Estirpes e matéria-prima .....	12
3.2 Ensaio de fermentação láctica .....	13
3.3 Caracterização físico-química .....	14
3.3.1 Medição do pH.....	14
3.3.2 Medição dos cloretos.....	14
3.3.3 Medição da acidez acética.....	14
3.3.4 Conversão de acidez acética para acidez láctica .....	15
3.3.5 Determinação do grau de Brix .....	15
3.3.6 Medição da cor .....	15
3.4 Análise reológica .....	16
3.4.1 Medição de consistência .....	16
3.5 Análises microbiológicas.....	16
3.5.1 Preparação da suspensão inicial.....	16
3.5.2 Contagem de microrganismos totais a 30°C .....	16
3.5.3 Contagem de bolores e leveduras.....	17
3.5.4 Contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) .....	17
3.6 Desenvolvimento de ketchups .....	17
3.7 Análise sensorial.....	19

3.8	Análise nutricional .....	20
3.9	Análise de custos dos produtos .....	20
3.10	Análise estatística .....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1	Análise dos custos gerados pelos resíduos da empresa.....	20
4.2	Análise preliminar das purgas sem e com conservantes: Parâmetros físico químicos e microbiológicos .....	20
4.3	Ensaio preliminares de fermentação .....	22
4.4	Estudo das condições ótimas de fermentação na purga A.....	25
4.4.1	Melhoria do meio fermentativo .....	25
4.4.2	Estudo da fermentação com diferentes inóculos e variação do teor de sal.....	25
4.4.3	Efeito da diluição no comportamento da fermentação do mix 4 .....	33
4.5	Aplicações das condições de fermentação da purga A na purga B .....	35
4.6	Avaliação da incorporação da purga A fermentada numa formulação de ketchup ...	38
4.6.1	Avaliação da cor .....	40
4.6.2.	Poupança obtida com as novas formulações .....	42
4.6.2	Análise microbiológica .....	43
4.6.3	Análise sensorial .....	43
4.6.4	Caraterização nutricional .....	45
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	47
6	TRABALHO FUTURO.....	48
	APÊNDICES.....	49
	Apêndice A. Ensaio de Fermentação .....	49
	Apêndice B Análise sensorial .....	50
7.	BIBLIOGRAFIA.....	53



## Lista de figuras

<b>Figura 2.1.</b> Esquematização simplificada do metabolismo de BAL homoláticas pela via Embden-Meyerhof, na presença de oxigénio e em respiração. A negrito, os principais produtos destas vias metabólicas. Adaptado de (Gänzle, 2015). .....	4
<b>Figura 2.2.</b> Esquematização simplificada do metabolismo de BAL heteroláticas. A negrito, os principais produtos destas vias metabólicas. Adaptado de (Gänzle, 2015). .....	5
<b>Figura 2.3.</b> Kombucha, kefir, kimchi e sauerkraut de diversas marcas presentes no mercado. ....	12
<b>Figura 3.1.</b> Imagem dos frascos de 320g (à direita) e 520g (à esquerda) e respetivos airlocks de silicone utilizados nas fermentações de purga de ketchup. ....	14
<b>Figura 3.2.</b> Etapas do desenvolvimento do ketchup: produção, enchimento, rotulagem e selagem, respetivamente. ....	18
<b>Figura 3.3.</b> Registo fotográfico da prova sensorial de ketchup. ....	19
<b>Figura 4.1.</b> Imagens das purgas recolhidas na produção, a) sem conservantes e b) com sorbato de potássio (conservante). ....	21
<b>Figura 4.2.</b> Evolução do pH e da concentração de ácido láctico (g/L) na fermentação da purga A. Letras diferentes na mesma linha indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .	23
<b>Figura 4.3.</b> Evolução do pH e da concentração de ácido láctico (g/L) na fermentação da purga B. Letras diferentes na mesma linha indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .	23
<b>Figura 4.4.</b> Contaminação presente, ao fim de 21 dias, no ensaio com inoculação de <i>Lb. rhamnosus</i> . ....	27
<b>Figura 4.5.</b> Amostra de <i>Lb. plantarum</i> e <i>P. pentosaceus</i> com produção de gás no 14º dia de fermentação. ....	28
<b>Figura 4.6.</b> Contaminação presente, ao fim de 21 dias, no ensaio inoculado com <i>L. mesenteroides</i> com adição de sal. ....	31
<b>Figura 4.7.</b> Contaminação presente, ao fim de 14 dias, no ensaio inoculado com <i>Lb. plantarum</i> e <i>L. mesenteroides</i> com adição de sal. ....	33
<b>Figura 4.8.</b> Versões K1, K2, K3 e K4 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente. ....	40
<b>Figura 4.9.</b> Versões K5, K6, K7 e K8 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente. ....	41
<b>Figura 4.10.</b> Versões K9, K10, K11 e K12 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente. ....	42
<b>Figura 4.11.</b> Versões K13, K14, K15 e K16 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente. ....	42
<b>Figura 4.12.</b> Pontuações médias para os diferentes atributos sensoriais e apreciação global das amostras em estudo. ....	44
<b>Figura 4.13.</b> Resultados obtidos para a intenção de compra dos ketchups desenvolvidos. ....	45
<b>Figura B.1.</b> Folha de prova. ....	50
<b>Figura B.2.</b> Folha de prova (continuação). ....	51
<b>Figura B.3.</b> Folha de prova (continuação). ....	52



## Lista de tabelas

<b>Tabela 3.1.</b> Estirpes de bactérias ácido lácticas adquiridas para os ensaios de fermentação. ....	13
<b>Tabela 3.2.</b> Designação dada às purgas fermentadas selecionadas para o desenvolvimento dos ketchups. ....	17
<b>Tabela 3.3.</b> Formulações das diferentes versões de ketchup e respetiva percentagem de incorporação de purgas fermentadas.....	18
<b>Tabela 3.4.</b> Formulações dos diferentes ketchups com incorporação do teor máximo de purga fermentada. ....	18
<b>Tabela 3.5.</b> Codificação das amostras e respetiva versão. ....	19
<b>Tabela 4.1.</b> Análise dos parâmetros físico químicos do ketchup sem conservantes, e respetiva purga. ....	21
<b>Tabela 4.2.</b> Análise dos parâmetros físico químicos do ketchup com conservantes, e respetiva purga. ....	21
<b>Tabela 4.3.</b> Tabela resumo das análises microbiológicas da purga sem conservantes e da purga com conservantes. ....	22
<b>Tabela 4.4.</b> Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	24
<b>Tabela 4.5.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	24
<b>Tabela 4.6.</b> Evolução do °Brix nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	24
<b>Tabela 4.7.</b> Resultados das diluições realizadas na purga de ketchup sem conservantes. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	25
<b>Tabela 4.8.</b> Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	26
<b>Tabela 4.9.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	26
<b>Tabela 4.10.</b> Evolução do °Brix nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	26
<b>Tabela 4.11.</b> Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	27

<b>Tabela 4.12.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	28
<b>Tabela 4.13.</b> Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	28
<b>Tabela 4.14.</b> Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	29
<b>Tabela 4.15.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	29
<b>Tabela 4.16.</b> Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	29
<b>Tabela 4.17.</b> Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	30
<b>Tabela 4.18.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	30
<b>Tabela 4.19.</b> Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	30
<b>Tabela 4.20.</b> Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	32
<b>Tabela 4.21.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	32
<b>Tabela 4.22.</b> Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	32
<b>Tabela 4.23.</b> Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respectivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	33
<b>Tabela 4.24.</b> Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respectivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	34
<b>Tabela 4.25.</b> Tabela resumo das fermentações que ocorreram na purga A. ....	34

<b>Tabela 4.26.</b> Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respectivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	35
<b>Tabela 4.27.</b> Evolução do valor de pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	36
<b>Tabela 4.28.</b> Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	36
<b>Tabela 4.29.</b> Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	36
<b>Tabela 4.30.</b> Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix na purga com conservantes (diluição 3) inoculada com o mix 4. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	37
<b>Tabela 4.31.</b> Tabela resumo dos resultados dos ensaios de fermentação realizados na purga com conservantes. ....	37
<b>Tabela 4.32.</b> Designação dada aos inóculos selecionados. ....	38
<b>Tabela 4.33.</b> Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 10% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	38
<b>Tabela 4.34.</b> Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 20% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	38
<b>Tabela 4.35.</b> Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 30% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	39
<b>Tabela 4.36.</b> Parâmetros físico químicos de ketchup com percentagem máxima de incorporação de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	39
<b>Tabela 4.37.</b> Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	40
<b>Tabela 4.38.</b> Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	41
<b>Tabela 4.39.</b> Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	41

<b>Tabela 4.40.</b> Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	42
<b>Tabela 4.41.</b> Poupança obtida para a empresa nas respectivas versões de ketchup desenvolvidas. ..	43
<b>Tabela 4.42.</b> Tabela das análises microbiológicas realizados ao ketchup padrão e às formulações desenvolvidas com maior percentagem de incorporação de purga fermentada. ....	43
<b>Tabela 4.43.</b> Composição nutricional por 100 gramas de ketchup padrão e dos ketchups desenvolvidos com purga fermentada. ....	45
<b>Tabela A.1.</b> Tabela resumo dos ensaios de fermentação realizados e respetivos resultados. ....	49



## Lista de abreviaturas

BAL	Bactérias ácido lácticas
°Brix	Graus de Brix
D6	Diluição de fator 6
D3	Diluição de fator 3
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>D. hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
EPSs	Exopolissacarídeos
ODS	Objetivos de desenvolvimento sustentável



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização

Nos últimos anos, o crescimento populacional e económico, a nível mundial, ditaram uma procura crescente na produção alimentar e na indústria transformadora, de forma a satisfazer as necessidades da sociedade. Para este efeito, todos os dias são utilizadas grandes quantidades de recursos, com um desperdício anual estimado em 1,3 mil milhões de toneladas, equivalente a um terço da produção mundial de alimentos para consumo humano (Blakeney, 2019). Este problema intensifica-se ano após ano com padrões de produção e consumo cada vez mais insustentáveis.

A empresa onde decorreu o estágio, Casa Mendes Gonçalves, produz anualmente grandes quantidades de vinagres, picantes, temperos e molhos, como é o caso do ketchup cuja sua produção está associada a um desperdício alimentar significativo.

No que diz respeito ao ketchup, a empresa apresenta dois processos diferentes, a produção de ketchup sem conservantes em que se utilizam temperaturas elevadas na sua produção, no embalamento e na pasteurização do produto final de forma a garantir a segurança alimentar. Por outro lado, produzem também ketchup com conservantes cuja sua produção utiliza igualmente altas temperaturas, mas o embalamento é realizado a uma temperatura ambiente e recorre-se ao sorbato de potássio para obter um produto estável e seguro do ponto de vista alimentar. Em qualquer um dos processos ocorre a formação de resíduos industriais, designados purgas, que são habitualmente gerados antes do embalamento e são constituídos por água e ketchup. A recolha destes resíduos industriais garante que o que entra nas embalagens é apenas o produto, como o ketchup, sem nenhuma água residual das lavagens. No caso do ketchup sem conservantes, as purgas também se formam na linha de enchimento a quente que descarta e categoriza como produto não-conforme todas as embalagens que passam por uma temperatura de enchimento inferior a 85°C, o que resulta na inutilização de um produto com uma composição semelhante ao produto final e com elevado potencial para reincorporação em novos produtos.

A redução de resíduos, a conservação dos recursos e a melhoria da eficiência do setor produtivo tornam-se essenciais para a promoção de uma economia mais sustentável e circular, sendo que a gestão adequada dos resíduos contribui para a execução dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) 12 e 13 (Tropea, 2022). Neste sentido, a empresa tem implementada uma estratégia de valorização destes resíduos industriais, decorrentes da produção de ketchup, que resulta na transformação deste resíduo em biogás e fertilizantes por um operador externo especializado. No entanto, uma fração destes resíduos acaba em aterros pelo que a solução encontrada não garante a sua valorização na íntegra. Para além disso, representa um desperdício de matéria-prima e um custo significativo, de transporte e tratamento, para a empresa, pelo que é importante o estudo de outras formas de valorização.

## 1.2 Local de estágio

O estágio curricular, integrante do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, decorreu na empresa Casa Mendes Gonçalves, S.A. na vila da Golegã, no Departamento de Inovação, Desenvolvimento e Investigação.

A Casa Mendes Gonçalves, S.A. é uma empresa portuguesa fundada em 1982 na Vila de Golegã, no distrito de Santarém que se destacou pelo seu cariz inovador com o lançamento de um vinagre de figo, com o intuito de valorizar um produto local: o figo de Torres Novas.

Peninsular é o nome da primeira marca da Mendes Gonçalves, relançada em 2022, com foco no canal horeca tradicional, a marca conta com uma gama variada nas categorias de molhos, vinagres, temperos e piri piris.

Atualmente, e 40 anos depois, a empresa Mendes Gonçalves é a maior produtora portuguesa de temperos e condimentos, com clientes em 31 países, com especial destaque para Espanha, Israel, Marrocos, Angola e Finlândia. A empresa conta com várias marcas no portfólio, entre elas a Paladin adquirida em 2005 e relançada em 2013 com uma vasta gama de molhos, vinagres e piri piris. Em 2013 surge a Dona Pureza, inspirada na sabedoria popular do vinagre como opção de limpeza, produzido a partir de produtos vegetais, com uma identidade modernizada em 2023 e uma linha de produtos mais alargada. Neste momento a empresa assegura a produção de vários produtos de marca própria e de terceiros (*private label*), e conta já com uma área dedicada à produção de parte das suas embalagens, a Mendes Gonçalves Embalagens, Lda. (Figueira et al., 2021).

O desenvolvimento e inovação da Casa Mendes Gonçalves permitiram o crescimento do negócio e a consolidação da empresa como fabricante de molhos, picantes e vinagres para outras empresas (*private label*). Em termos de impacto financeiro, 1% do volume de negócios investido neste departamento permitiu gerar um valor próximo de 13% do volume de negócios associado a novos produtos, num intervalo de 3 anos (2019-2021) (Figueira et al., 2021).

A empresa está inserida em vários projetos em colaboração com outras empresas, como é o caso do projeto VIIAFOOD, onde se inseriu o trabalho realizado ao longo do estágio. Este projeto tem como objetivo desenvolver novos produtos, serviços e processos até 2025, em linha com as tendências nacionais e internacionais da alimentação saudável e de sustentabilidade.

## 1.3 Objetivo

Sendo a empresa Mendes Gonçalves vanguardista da inovação e da sustentabilidade, o presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver vias de circularidade para os desperdícios gerados na produção de ketchup, possibilitando a transformação de resíduos industriais, como purgas, em matéria-prima.

Neste sentido serão estudadas as condições de fermentação de purgas com bactérias ácido lácticas, e será avaliado o potencial de inclusão da purga de ketchup fermentada no desenvolvimento de novas formulações de ketchup.

#### **1.4 Etapas do Estágio**

##### **1. Familiarização com a empresa**

Durante o primeiro mês de estágio foi realizada uma integração nos diferentes departamentos da empresa, com o objetivo de conhecer melhor a unidade produtiva e os processos realizados, bem como a função de todos os colaboradores da empresa.

##### **2. Revisão da literatura**

Com base nos problemas encontrados na empresa, nomeadamente a formação de grande quantidade de resíduos industriais, foi realizada uma pesquisa bibliográfica com o intuito de compreender as metodologias aplicadas no desenvolvimento laboratorial.

##### **3. Desenvolvimento laboratorial**

Primeiramente, realizou-se a recolha das purgas para utilização em ensaios fermentativos. Os produtos das fermentações foram depois incluídos no desenvolvimento de formulações de ketchup.

##### **4. Análise dos resultados e conclusões**

Por último, todos os resultados obtidos foram cuidadosamente analisados, o que permitiu tirar ilações e sugerir trabalho futuro de melhoria.

## **2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO**

### **2.1 Fermentação láctica**

A fermentação é um método antigo de conservação de alimentos, tais como produtos lácteos, vegetais e carne, por longos períodos de tempo antes do uso da refrigeração e do recurso a conservas. Este processo continua a ser utilizado, de uma forma caseira, mas também industrial, com processos geralmente económicos que elevam os atributos sensoriais, nutricionais e de saúde dos alimentos (Malo & Urquhart, 2016; Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

Os alimentos fermentados têm captado a atenção da indústria alimentar por representarem um cenário de melhoria da segurança alimentar de forma natural (Fan & Hansen, 2012, Paramithiotis et al., 2012). Este fenómeno conhecido por bioconservação ocorre devido à microbiota responsável pela fermentação espontânea em vegetais e frutas cruas que sintetiza uma grande variedade de metabolitos primários e secundários antagonistas, dos quais se destacam as bacteriocinas por apresentarem potencial de uso como conservantes alimentares naturais seguros (Fan & Hansen, 2012). Um exemplo de aplicação é a fermentação láctica que consome os hidratos de carbono das frutas e vegetais, especificamente as glúcose, que são convertidos pelas bactérias ácido lácticas (BAL) em ácido láctico, provocando uma diminuição do pH dos alimentos para cerca de 4,0, assegurando a sua estabilidade e

evitando o crescimento de agentes patogênicos ou microrganismos de deterioração (El Sheikha & Montet, 2014).

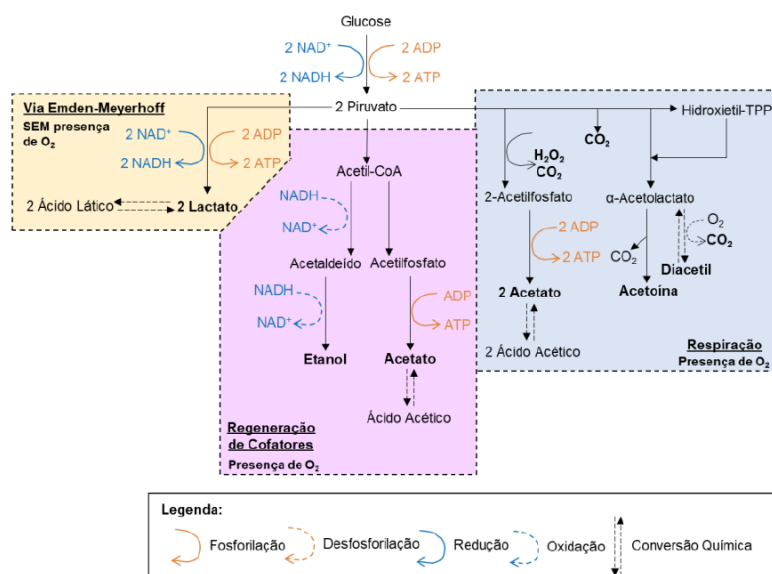
### 2.1.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas constituem um grupo heterogêneo de bactérias que partilham características metabólicas e fisiológicas, tais como serem gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, não aeróbias, mas aerotolerantes. Apresentam elevada tolerância a meios ligeiramente ácidos, com atividade num pH entre 4,0 e 4,5. Estas bactérias crescem em condições microaerófilas e são exigentes quanto aos fatores nutricionais (Axelsson, 2004; Claesson et al., 2007; Kandler, 1983; Orla-Jensen, 1919).

As bactérias ácido lácticas podem ser divididas em homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias, de acordo com a via de fermentação de hexoses (Axelsson, 2004; Kandler, 1983; Orla-Jensen, 1919).

Na fermentação homoláctica ocorre degradação das hexoses via Embden-Meyerhof, produzindo ácido láctico como principal produto final sempre que há abundância de hexoses fermentescíveis no meio de cultura e ausência de oxigênio (Gänzle, 2015).

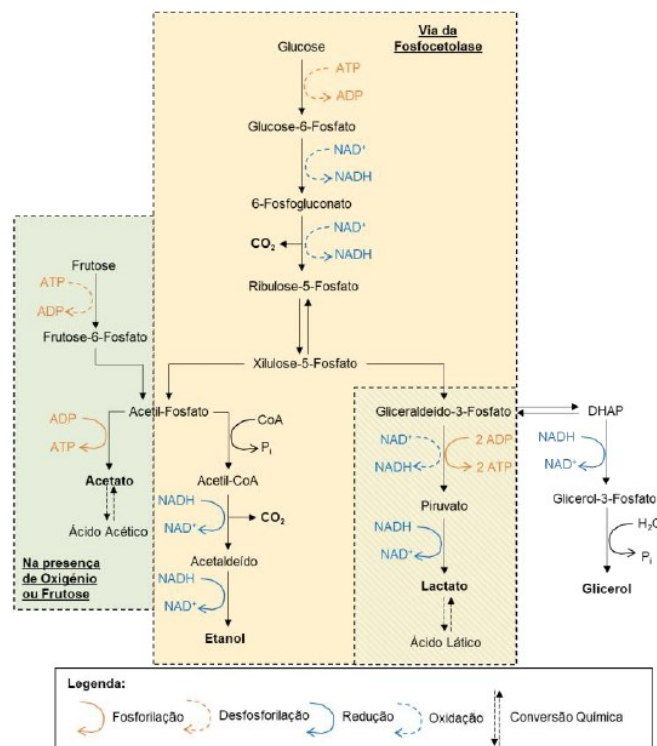
Neste tipo de fermentação, podem ser seguidas outras vias, sendo o principal ponto de ramificação o piruvato, obtido no processo de glicólise de hexoses, tais como glucose e frutose. Na presença de oxigênio, pode ser seguida a via de regeneração de cofatores como NAD<sup>+</sup>, onde se produz etanol e acetato, que origina o ácido acético. Outra via possível do metabolismo homofermentativo na presença de oxigênio é a respiração, na qual produzem acetato, dióxido de carbono e compostos de aroma como diacetil e acetoina (Gänzle, 2015).



**Figura 2.1.** Esquematisação simplificada do metabolismo de BAL homolácticas pela via Embden-Meyerhof, na presença de oxigênio e em respiração. A negrito, os principais produtos destas vias metabólicas. Adaptado de (Gänzle, 2015).

A fermentação heteroláctica não segue a via Embden-Meyerhof, pelo que metaboliza hexoses e pentoses através da via da fosfocetolase para produzir quantidades equimolares ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Henderson, D. P. e Toone, 1999; Kang et al., 2013).

No entanto, como esta via apresenta baixo rendimento energético, as BAL heterofermentativas utilizam outras estratégias metabólicas para o melhorar, sendo uma delas a utilização de fontes de carbono alternativas como a frutose, que favorece a produção de acetil-fosfato que será metabolizado em etanol e acetato (Gänzle, 2015). Esta reciclagem de cofatores tem um impacto positivo no alimento fermentado, aumentando o seu potencial antioxidante e antimicrobiano pela presença de acetato (Gänzle, 2015). As BAL heterolácticas têm ainda capacidade de produção de outros compostos quando o valor do pH diminui, como por exemplo a produção de glicerol, desfavorecendo a produção de lactato.



**Figura 2.2.** Esquemática simplificada do metabolismo de BAL heterolácticas. A negrito, os principais produtos destas vias metabólicas. Adaptado de (Gänzle, 2015).

As BAL heterofermentativas facultativas realizam a fermentação de forma semelhante ao grupo homofermentativo, contudo, algumas espécies produzem outros ácidos, como ácido acético em condições limitantes de glicose, pela via fosfocetolase (Zúñiga et al., 1993).

### **Lactiplantibacillus plantarum**

*Lactiplantibacillus plantarum*, também conhecida como *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria mesófila, capaz de crescer numa faixa de temperatura de 10 a 15°C, mas não em 45°C, que tolera condições de pH ácido e até mesmo uma percentagem significativa de etanol (A Corsetti, A Ciarrocchi, 2016; G-Alegría et al., 2004).

Esta é considerada uma bactéria ácido láctica heterofermentativa facultativa com capacidade de obter energia de diferentes açúcares, como arabinose, frutose, glicose, rafinose, ribose, maltose. convertendo as hexoses pela via homofermentativa e as pentoses pela via heterofermentativa. Tipicamente, *Lactobacillus plantarum* segue a via homofermentativa, cujo principal metabolito de fermentação é o ácido láctico convertido a partir de hexoses através da via Embden-Meyerhof. Não obstante, na presença de oxigênio ou quando outros substratos fermentáveis estão disponíveis, *Lb. plantarum* pode exibir algum nível de metabolismo heterofermentativo e produzir, através da conversão de pentoses, diversos subprodutos metabólicos, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono através de vias metabólicas alternativas (A Corsetti, A Ciarrocchi, 2016; Bamforth & Cook, 2019; Evanovich et al., 2019; Saulnier et al., 2007).

Na indústria alimentar é amplamente utilizada como cultura inicial em produtos fermentados lácteos e cárneos, por ser geralmente reconhecida como segura (GRAS) e apresentar efeitos de melhoria nas propriedades organolépticas dos produtos alimentícios e um maior tempo de prateleira. Para além disso, produz uma variedade de componentes bioativos, incluindo exopolissacarídeos que melhoram as propriedades reológicas (A Corsetti, A Ciarrocchi, 2016; Cui et al., 2020; Thompson et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2019). Possui ainda algumas estirpes com capacidade probiótica (Arasu et al., 2016).

*Lb. plantarum* tem captado a atenção da indústria alimentar, uma vez que várias estirpes produzem diferentes compostos antimicrobianos e péptidos antimicrobianos como bacteriocinas que inibem o crescimento de microrganismos indesejados, incluindo patogênicos e têm a capacidade de reduzir compostos indesejáveis (Seddik et al., 2017; Wang et al., 2016, Kalui et al., 2009).

### **Lacticaseibacillus rhamnosus**

*Lacticaseibacillus rhamnosus*, anteriormente conhecido como *Lb. casei subsp. rhamnosus*, é uma bactéria heterofermentativa com crescimento numa faixa de temperaturas de 15 a 45°C, que fermenta diversos açúcares como arabinose, ribose e sacarose (Ibrahim, 2016).

*Lb. rhamnosus* tem uma melhor tolerância às circunstâncias do trato digestivo quando comparado a outras estirpes probióticas. Foi a primeira estirpe a ser patenteada em 1989 devido à sua capacidade de sobreviver a ambientes ácidos e biliares (Capurso, 2019). Um estudo reporta a sobrevivência de *Lb. rhamnosus* CA15 em condições ácidas, com pH entre 2,0 a 3,0 (Capurso, 2019, Pino et al., 2022).

Esta bactéria é amplamente utilizada na indústria alimentícia, principalmente por melhorar o conteúdo probiótico dos alimentos (Ramon, 2019). Esta bactéria merece atenção especial, uma vez que produz uma bacteriocina chamada microclina, com atividade bactericida anti-gram-negativa e anti-gram-positiva e, com atividade anti-infeciosa (Capurso, 2019; Parian et al., 2018).

### **Leuconostoc mesenteroides**

*Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa com boa adaptação a meios com elevado teor de açúcar e crescimento ótimo a uma temperatura de 25°C (Menegueti et al., 2018, Soetaert et al., 1995, Holland & Liu, 2011).

Tal como as restantes, *Leuconostoc mesenteroides* é frequentemente utilizada em culturas iniciais juntamente com outras BAL e outros microrganismos na indústria de bebidas e alimentos. Geralmente, tem atividade no início da fermentação, sendo gradualmente substituída por *Lactobacillus plantarum* no meio de fermentação, já que *L. mesenteroides* apresenta grande sensibilidade à diminuição do pH e às formas não dissociadas dos ácidos láctico e acético (Lonvaud-Funel, 1999). Além da acidificação do meio, *Leuconostoc mesenteroides* também é responsável por compostos de sabor, mas também, em alguns casos, por deterioração devido à produção de dextrana (Naessens et al., 2005).

Esta bactéria tem potencial efeito como conservante alimentar quer pela produção de compostos antagonistas quer pela competição com a microflora indígena dos alimentos, esgotando a maioria dos nutrientes disponíveis. De acordo com a literatura, várias estirpes de *Leuconostoc* têm um interesse crescente, uma vez que demonstram inibição contra *Listeria monocytogenes* (Lonvaud-Funel, 1999). *Leuconostocs mesenteroides* são organismos com necessidades nutricionais complexas, já que só crescem na presença de uma fonte de aminoácidos e vitaminas, bem como hidratos de carbonos fermentáveis, para obtenção de energia (Holland & Liu, 2011).

### **Pediococcus pentosaceus**

*Pediococcus pentosaceus* apresenta metabolismo homofermentativo e grande tolerância ao ácido, com crescimento acima de 40°C numa faixa de pH de 4,5 a 8,0, sendo que pode crescer num pH até cerca de 3,5 até inibir o seu próprio crescimento (Council, 1992, Simpson, W.J., Taguchi, 1995).

*Pediococcus pentosaceus* está presente em fermentações alimentares com funções ativas na qualidade do produto e na segurança alimentar. Esta bactéria apresenta resultados promissores para aplicação na indústria alimentar como conservante biológico em alternativa ao uso de conservantes químicos, devido à produção de bacteriocinas (Qi et al., 2021, O'Bryan et al., 2018, Papagianni, 2003). As pediocinas são um tipo de bacteriocinas produzidas por estirpes de *Pediococcus pentosaceus* que estão declaradas seguras para a conservação de alimentos e têm uma eficácia comprovada contra organismos patogénicos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (Gálvez et al., 2014; Juneja et al., 2012). Vários estudos relatam que *P. pentosaceus* tem funções probióticas, incluindo anti-inflamação, anticancerígenas, antioxidante, desintoxicação e redução do colesterol (Qi et al., 2021).

### 2.1.2 Levedura: *Debaryomyces hansenii*

*Debaryomyces hansenii* é uma levedura considerada não-fermentativa, ainda que apresente uma capacidade muito fraca de fermentar glicose, galactose, sacarose, maltose e trealose (Breuer & Harms, 2006; Praphailong & Fleet, 1999). Esta levedura apresenta fraco crescimento anaeróbio, e por isso é altamente dependente da respiração, pelo que metaboliza açúcares em piruvato pela via Embden-Meyerhof e depois oxida piruvato através do ciclo do ácido tricarbóxico, onde assimila ácidos orgânicos como cítrico e láctico. A via do fosfato de pentose também opera nesta levedura (Breuer & Harms, 2006; Córdoba et al., 2009; Praphailong & Fleet, 1999). Apresenta crescimento ideal a temperaturas entre 20 a 25°C (Breuer & Harms, 2006).

O crescimento de *D. hansenii* é muito fraco em pH 2,5, mas forte na faixa de pH de 3,0 a 8,0, quando ocorre metabolização do ácido láctico e elevação do pH do meio (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014). A literatura menciona que as estirpes de *D. hansenii* são responsáveis pelo aumento do pH na superfície do queijo, devido à degradação do ácido láctico, o que permite o crescimento de uma flora bacteriana mais sensível a pH ácido (Petersen et al., 2001).

A característica mais distintiva de *D. hansenii* é o seu comportamento halófilo, isto é, a sua capacidade de crescer na presença de concentrações extremamente altas de NaCl. Esta tolerância ao sal varia com o pH do meio, sendo mais favorável em valores de pH próximos de 5,0 e pior em pH abaixo de 3,0 e acima de 7,0 (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014). Outra qualidade relevante desta levedura é o facto de ser também tolerante a concentrações muito altas de açúcares, com crescimento reportado na literatura na presença de 60% (p/v) de sacarose (Córdoba et al., 2009).

As leveduras, como *D. hansenii*, apresentam um atributo valioso que é a capacidade de produzir fatores de crescimento importantes para as bactérias. De acordo com a literatura, as bactérias não conseguem crescer em meios sem fatores de crescimento, nomeadamente vitaminas, como lactoflavina, tiamina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido fólico, biotina e aminoácidos. *D. hansenii* pode fornecer estes compostos, o que destaca a sua relevância de utilização em conjunto com bactérias ácido lácticas em ensaios de fermentação (Ferreira & Viljoen, 2003).

*D. hansenii* tem pouca tolerância a conservantes ou a tratamento térmico, e apresenta inibição em pH 5,5 por 250-500 mg L<sup>-1</sup> de ácidos benzoico ou sórbico. Dados da literatura mencionam a transformação do sorbato pelas leveduras em 1,3-pentadieno, o que produz um odor desagradável semelhante ao petróleo que leva à rejeição do consumidor, ainda que não seja tóxico (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014).

### 2.1.3 Modos de iniciação

O processo de fermentação pode ser iniciado de duas formas, de forma espontânea com recurso a bactérias ácido lácticas endógenas ou de forma controlada através da inoculação das amostras com estirpes de bactérias ácido lácticas (Urbonaviciene et al., 2015, Vinicius De Melo Pereira et al., 2020).

Caso existam condições favoráveis de anaerobiose, atividade da água, concentração de sal e temperatura é expectável que a fermentação láctica ocorra de forma espontânea nos vegetais e na fruta, com a sucessão de bactérias lácticas hetero e homofermentativas, com ou sem leveduras (Plengvidhya et al., 2004). Esta fermentação depende da atividade espontânea das BAL endógenas do alimento, que tendem a competir com os microrganismos contaminantes e, por isso a fermentação espontânea é mais suscetível a falhas, já que pode ocorrer uma supressão insuficiente de patogénicos e alterações imprevisíveis nas qualidades sensoriais, nutricionais e reológicas (Di Cagno et al., 2009, 2013; Urbonaviciene et al., 2015; Vinicius De Melo Pereira et al., 2020).

Em alternativa, a fermentação controlada com utilização de culturas *starters* é recomendada, tanto do ponto de vista de higiene como de segurança, já que permite acelerar o processo de fermentação com uma inibição mais rápida de bactérias patogénicas e, em simultâneo, um maior controlo dos processos fermentativos, de forma a assegurar a produção de fermentados com qualidade sensorial e nutricional uniforme (Urbonaviciene et al., 2015, Shah N. & Singhal R., 2017, Di Cagno et al., 2013, McFeeters, 2004).

### 2.1.4 Fatores que influenciam o processo de fermentação

O desenvolvimento e atividade das bactérias ácido lácticas na fermentação é influenciada por diversos fatores como o pH, a concentração de sal e de açúcares, os conservantes utilizados e a cultura inicial selecionada.

O pH é um dos fatores mais críticos no desenvolvimento e preservação do aroma e sabor de muitos fermentados. Geralmente, o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas é favorecido em condições de pH neutro, mas existem algumas estirpes capazes de sobreviver e desenvolver em meios ácidos, numa gama de pH entre 3 e 4, denominadas ácido tolerantes, como *Lactiplantibacillus* (Didier Montet, Ramesh C. Ray, 2015).

A concentração de cloreto de sódio tem extrema relevância no processo fermentativo, sendo usualmente adicionado numa gama entre 1,5% a 10%, com o intuito de dificultar o desenvolvimento de microrganismos de deterioração e de melhorar a consistência do produto fermentado (Didier Montet, Ramesh C. Ray, 2015; GOLDONI et al., 2001; Reina et al., 2015). Tal é possível porque as BAL são tolerantes a elevadas concentrações de sal, o que lhes confere vantagem sobre outras espécies menos tolerantes (Didier Montet, Ramesh C. Ray, 2015). No entanto, concentrações excessivas podem

igualmente ser prejudiciais ao desenvolvimento das BAL, inibindo a produção de ácido láctico e interferindo, conseqüentemente, na diminuição de pH (Reina et al., 2015).

Também o teor de açúcares é um fator importante para o bom desempenho da fermentação, uma vez que as bactérias ácido lácticas usam, principalmente, a glucose como substrato.

O sorbato de potássio é amplamente utilizado como conservante, considerado GRAS na União Europeia e nos EUA. Apresenta maior eficácia quando utilizado em pH levemente ácido e possui atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras e bactérias, devido à presença do grupo carboxilo (Mohammadzadeh-Aghdash et al., 2018).

A seleção das culturas iniciais é de especial importância para assegurar que a fermentação permite o desenvolvimento de um produto de elevada qualidade, assim como o controle de todo o processo. Frequentemente, a seleção vai de encontro às estirpes encontradas nas fermentações espontâneas dos alimentos, uma vez que terão maior probabilidade de se adaptarem rapidamente às condições do meio e superar a microflora indígena (Lonvaud-Funel, 1999). Por outro lado, destaca-se a utilização de consórcios de bactérias como cultura inicial nos processos fermentativos, uma vez que oferecem uma série de vantagens em relação às fermentações convencionais de culturas isoladas (Hesseltine, 1983). Os consórcios de bactérias podem representar uma associação estável de vários microrganismos e melhorar a taxa de crescimento das bactérias. Também têm a capacidade de exclusão de microrganismos indesejados, uma vez que possuem uma gama ampla de enzimas, capazes de atacar uma variedade de compostos para mudar ou destruir aqueles que são tóxicos no substrato de fermentação. Assim, oferecem maior proteção contra contaminações, uma vez que os consórcios têm uma base genética mais ampla e, na eventualidade de uma estirpe ser eliminada, uma segunda ou terceira estirpe resistente a fagos no inóculo assumirá o controle e continuará a fermentação (Hesseltine, 1983). A literatura demonstrou efeitos vantajosos no caso do iogurte, cuja fermentação do leite apresenta uma produção de ácido substancialmente superior com o consórcio de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, comparativamente a estas duas culturas separadamente (Driessen, 1981).

## **2.2 Propriedades dos produtos fermentados**

Os produtos fermentados apresentam diversas propriedades de grande interesse na indústria alimentar, como a melhoria da qualidade sensorial e nutricional e das propriedades promotoras da saúde de forma segura e eficaz (Whetstine et al., 2006; Xiang et al., 2019). A fermentação tem efeitos de melhoria das propriedades reológicas, conferindo texturas únicas devido à produção de exopolissacarídeos (Xiang et al., 2019; Yilmaz et al., 2015).

Para além de conferir sabores, texturas e aromas únicos aos alimentos, o processo fermentativo confere outras propriedades relevantes com potenciais benefícios para a saúde, como a melhoria da digestibilidade. Os microrganismos envolvidos na fermentação produzem enzimas que quebram hidratos de carbono complexos, inicialmente de difícil digestão, tornando a sua digestão e absorção

mais simples. O mesmo acontece com proteínas e outros componentes alimentares, o que se torna bastante relevante pelas crescentes intolerâncias alimentares e problemas digestivos (Špička et al., 2002; Xiang et al., 2019; Yuliana et al., 2013).

Realça-se ainda o facto de alguns alimentos fermentados possuírem microrganismos vivos que podem ter benefícios específicos para saúde quando consumidos, como os probióticos que ajudam a melhorar a saúde intestinal, a digestão, a função imunológica, e potencialmente oferecer outros efeitos positivos (Mohan et al., 2014; Xiang et al., 2019).

### **2.2.1 Propriedades antioxidantes**

Uma das mais importantes propriedades dos produtos fermentados, reportada amplamente na bibliografia é a sua propriedade antioxidante (Fardet & Rock, 2018; Melini et al., 2019). De um modo geral, a fermentação aumenta a atividade antioxidante dos alimentos fermentados devido à produção de diferentes compostos, dependendo da matéria-prima, do agente fermentador e das condições do processo (Melini et al., 2019).

Esta propriedade tem captado a atenção dos consumidores preocupados com o consumo de antioxidantes artificiais, criando um aumento na procura de produtos naturais com atividade antioxidante, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos. Os alimentos fermentados, como o *kimchi*, *chucrute* e *miso* são uma boa fonte destes compostos que contêm antioxidantes, tais como compostos fenólicos e flavonoides, que podem ajudar a reduzir o stress oxidativo e potencialmente diminuir o risco de doenças crónicas relacionadas com a idade e a dieta (Bah et al., 2019; Habibi Najafi et al., 2019; Joshi & Biswas, 2015; Khan et al., 2018).

### **2.2.2 Propriedades antimicrobianas**

Outra propriedade dos produtos fermentados com grande relevância é a sua preservação e extensão do prazo de validade dos alimentos, sem a necessidade de conservantes artificiais. Esta propriedade demonstrada nos produtos fermentados explica-se pelo facto da fermentação resultar na produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, que diminuem o pH do meio criando condições que limitam o crescimento de muitas bactérias patogénicas causadoras de deterioração, atuando assim como conservantes naturais (O'Sullivan et al., 2002; Şanlıer et al., 2019; Xiang et al., 2019). Adicionalmente, os microrganismos envolvidos na fermentação podem também produzir compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, que inibem o crescimento de agentes patogénicos transmitidos por alimentos (Şanlıer et al., 2019).

## **2.3 Tendência de consumo de produtos fermentados**

Os alimentos fermentados fizeram sempre parte dos padrões de consumo, quer da população portuguesa quer a nível mundial, como é o caso do pão, do vinho, da cerveja, dos iogurtes e do leite, entre tantos outros.

Para além destes alimentos já habitualmente consumidos, outros produtos fermentados têm vindo a conquistar o mercado, e a pandemia COVID-19 desempenhou um papel importante no desenvolvimento desta tendência, já que aumentou a preocupação na melhoria da imunidade e, por isso a procura por produtos que sejam benéficos para a saúde. Outro fator que parece fortalecer esta tendência é o veganismo e a inclinação por dietas à base de vegetais, especialmente nas gerações mais jovens (MordorIntelligence, 2022; Simpósio Nacional “Promoção de Uma Alimentação Saudável e Segura, 2022). O *kimchi* e o *sauerkraut* são exemplos desta tendência de mercado, assim como o *kombucha* e o *kefir*, com várias marcas a lançar estes produtos para o mercado, conforme a **Figura 2.3**.



**Figura 2.3.** *Kombucha, kefir, kimchi e sauerkraut* de diversas marcas presentes no mercado.

Os consumidores procuram no mercado produtos frescos, quer alimentos quer bebidas, de elevado valor nutricional, promotores da saúde, sabores ricos e cujo rótulo tenha uma composição simples e sem conservantes com o fundamento de que todos os produtos com composições mais complexas são habitualmente rotulados como "artificiais", diminuindo o seu interesse comercial (Bicas et al., 2010; Endrizzi, I.; Framondino, V.; Ciaghi, R.; Gasperi, 2006)

Nos últimos anos, observou-se uma procura crescente por produtos fermentados, especialmente por bebidas probióticas com efeitos benéficos na funcionalidade intestinal, pelas gerações mais jovens. Os probióticos à base de laticínios detêm a maior participação no segmento, seguidos pelas bebidas probióticas à base de frutas. Kefir e iogurtes líquidos são as principais classes de produtos que testemunharam um aumento nas vendas nos últimos anos, impulsionando o crescimento geral do mercado de bebidas fermentadas.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Estirpes e matéria-prima**

As culturas isoladas de microrganismos utilizadas nos ensaios fermentativos foram obtidas numa biblioteca de microrganismos (DSMZ, Leibniz Institute, Brunswick, Germany), cuja informação se encontra descrita na **Tabela 3.1**.

**Tabela 3.1.** Estirpes de bactérias ácido lácticas adquiridas para os ensaios de fermentação.

	<b>Estirpe</b>	<b>Nº DSMZ</b>	<b>Nome científico</b>
<b>Bactérias Ácido Lácticas</b>	<i>L. mesenteroides</i>	20343	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	<i>Lb. plantarum</i>	20205	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
	<i>Lb. rhamnosus</i>	20021	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
	<i>P. pentosaceus</i>	20336	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<b>Levedura</b>	<i>D. hansenii</i>	3428	<i>Debaryomyces hansenii</i>

A partir deste momento, o consórcio constituído pelas quatro bactérias ácido lácticas apresentadas acima designa-se **Mix 4**.

A purga de ketchup sem conservantes, designada **Purga A**, foi recolhida durante a produção do *batch* de ketchup sem conservantes e congelada em várias alíquotas de um quilograma para posterior utilização nos ensaios de fermentação. O mesmo procedimento foi elaborado para a purga de ketchup com conservantes (sorbato de potássio), designada **Purga B**. Além da utilização das purgas referidas, utilizou-se água destilada e sal refinado nos ensaios de fermentação.

Para a produção de ketchup foram utilizadas diferentes amostras de purga fermentada, assim como concentrado de tomate, açúcar granulado fino, sal refinado, vinagre de álcool, amido modificado, aroma de cassia natural (canela) e oleorresina de aipo. Os resultados foram comparados com um ketchup sem conservantes que originou as purgas utilizadas no presente trabalho, considerado ketchup padrão. A composição de todas as formulações desenvolvidas encontra-se na **Tabela 3.3** e **Tabela 3.4**.

### **3.2 Ensaios de fermentação láctica**

Para a realização dos ensaios de fermentação as purgas de ketchup foram previamente colocadas à temperatura ambiente. Nos ensaios que assim o exigiam prepararam-se as diluições previamente (de fator 3 e 6) e adicionou-se sal de modo a ter um teor final de 1,5% de NaCl na amostra a fermentar. Depois de transferidas para frascos de vidro foram inoculadas com uma concentração celular total de 10<sup>6</sup> células/mL de BAL, com a mesma concentração para a levedura utilizada, conforme descrito anteriormente por diversos autores (Špička et al., 2002; Xiong et al., 2014; Yuliana et al., 2013). O processo termina com a colocação da tampa com o *airlock* de silicone, deixando um espaço mínimo de cabeça.

Todas as fermentações foram incubadas à temperatura ambiente, com recolha de amostras ao fim de 7, 14 e 21 dias para monitorização físico química, sendo depois armazenadas a 4°C para posterior utilização na formulação de ketchups.



**Figura 3.1.** Imagem dos frascos de 320g (à direita) e 520g (à esquerda) e respectivos *airlocks* de silicone utilizados nas fermentações de purga de ketchup.

Os ensaios foram realizados em meio industrial, sem condições de esterilidade, nem controlo de temperatura e de outros fatores de relevância, permitindo com maior facilidade escalar os processos para a unidade produtiva da empresa. Ainda assim, de modo a diminuir a probabilidade de ocorrência de contaminações todo o material utilizado foi previamente esterilizado e o seu manuseamento foi feito sempre com luvas descartáveis desinfetadas com álcool.

### **3.3 Caraterização físico-química**

#### **3.3.1 Medição do pH**

Os valores de pH das amostras foram medidos à temperatura ambiente (20°C) utilizando um medidor de pH (HANNA Instruments, modelo HI 2211), equipado com o elétrodo combinado de vidro e calibrado privamente com soluções tampão padrão (pH 4 e pH 7). Foram realizadas 3 medições após estabilização.

#### **3.3.2 Medição dos cloretos**

A medição dos cloretos foi realizada no equipamento Salt-Matic 23 CRISON Instruments equipada com o elétrodo seletivo, combinado de Ag. Para tal, com auxílio de uma balança analítica (KERN, modelo ALJ 250-4AM), pesaram-se 2,1g da matriz a analisar para um tubo de amostra. O método consiste numa titulação com  $\text{AgNO}_3$  0,1M (Honeywell/Fluka), usando uma solução auxiliar de Ácido Sulfúrico 0,05M (Pareac Applichem) para ajustar o pH. O volume de titulante gasto é convertido na quantidade de NaCl presente na amostra.

#### **3.3.3 Medição da acidez acética**

A acidez contabiliza o total de ácidos presentes na amostra e é expressa em g/L de ácido acético. Esta medição é realizada com o equipamento Metter Toledo Titrator EasyPlus Easy pH. Com auxílio de uma balança analítica (KERN, modelo ALJ 250-4AM) pesou-se 0,84g da matriz a analisar para um tubo de amostra, adicionou-se 20mL de água destilada e agitou-se durante 10s. A medição deste parâmetro

consiste numa titulação com uma solução de NaOH 0,1M, sob constante agitação, até atingir um pH de 8,20.

### 3.3.4 Conversão de acidez acética para acidez láctica

A acidez, medida para as fermentações realizadas, expressa em g/L de ácido acético, foi convertida em acidez láctica, utilizando um fator de conversão baseado na massa molar de cada ácido, conforme apresentado na equação 3.3.1.

$$\text{Acidez Láctica} = \text{Acidez Acética} \times \frac{M(\text{Ácido Láctico})}{M(\text{Ácido Acético})} \quad (3.3.1)$$

Usando este fator de conversão, a acidez acética foi convertida para ácido láctico usando a seguinte fórmula, sabendo que a massa molar do ácido acético é de 60,05 g/mol, enquanto a massa molar do ácido láctico é de 90,08 g/mol.

$$\text{Acidez Láctica} = \text{Acidez Acética} \times \frac{90,08}{60,05} \quad (3.3.2)$$

A acidez láctica está expressa em g/L.

### 3.3.5 Determinação do grau de Brix

O °Brix é uma escala numérica do índice de refração que quantifica o teor de sólidos solúveis presentes numa solução aquosa, como o açúcar e o sal, com impacto no índice de refração do meio. Este parâmetro foi medido com recurso a um refratômetro da HANNA Instruments, modelo HI 96801, no qual se colocou uma gota de amostra na superfície do refratômetro e, em seguida, a leitura foi feita no visor do equipamento. A medição foi realizada em triplicado e expressa como °Brix.

### 3.3.6 Medição da cor

A avaliação instrumental da cor foi realizada utilizando um espectrocolorímetro, modelo CR-5 (Konica Minolta), baseado no sistema de coordenadas de cores CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Este sistema é descrito por três eixos:

- $L^*$ : luminosidade, compreendida entre 0 e 100, onde 0 corresponde ao preto absoluto e o branco absoluto a 100,
- $a^*$ : componente verde e vermelho, em que ( $+a^*$ ) caracteriza cores vermelhas, e ( $-a^*$ ) apresenta uma tendência para a cor verde,
- $b^*$ : componente azul e amarelo, no qual ( $+b^*$ ) caracteriza o amarelo, e ( $-b^*$ ) assinala cores azuis.

Para cada amostra a cor foi avaliada em três pontos diferentes. A mudança total de cor ( $\Delta E^*$ ) foi calculada para cada amostra usando a seguinte equação (Barreiro et al., 1997; Vieira et al., 2023):

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_i^* - L_0^*)^2 + (a_i^* - a_0^*)^2 + (b_i^* - b_0^*)^2} \quad (3.3.3)$$

onde  $L_i^*$ ,  $a_i^*$  e  $b_i^*$  representam os parâmetros da cor do ketchup padrão e  $L_0^*$ ,  $a_0^*$ ,  $b_0^*$  os parâmetros da cor dos restantes ketchups desenvolvidos com purga fermentada.

Os valores utilizados para determinar se a diferença total de cor de cada amostra ao padrão era visualmente óbvia foram os seguintes (Francis & Clydesdale, 1975):

- $\Delta E^* < 1$  as diferenças de cor não são perceptíveis pelo olho humano;
- $1 < \Delta E^* < 3$  as diferenças de cor não são óbvias para o olho humano;
- $\Delta E^* > 3$  as diferenças de cor são óbvias para o olho humano.

### 3.4 Análise reológica

#### 3.4.1 Medição de consistência

A consistência foi medida com recurso a um consistómetro da CSC Scientific, modelo LD-BC. Com o consistómetro fechado, completou-se o espaço do mesmo com a amostra de ketchup até ao limite superior. De seguida abriu-se o consistómetro e contou-se 30 segundos. Ao fim desse tempo, contabilizou-se a distância percorrida em centímetros. As medições foram realizadas à temperatura ambiente.

### 3.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas pelo laboratório de qualidade da empresa às duas amostras de purga recolhidas, bem como a quatro dos ketchups desenvolvidos. As análises foram feitas de acordo com os métodos ISO aplicados no laboratório de qualidade da Mendes Gonçalves para a contagem dos microrganismos a 30°C (ISO 4833:2013), bactérias ácido-lácticas (ISO 15214:1998), bolores e leveduras (ISO 21527-1:2008) e *enterobacteriaceae* (ISO 21528-1:2004).

#### 3.5.1 Preparação da suspensão inicial

Para preparar a suspensão inicial pesaram-se, assepticamente, 10 g de cada uma das amostras para um saco de homogeneização (*Stomacher*) e adicionaram-se 90mL de uma solução triptona sal. As misturas foram fortemente agitadas, e em seguida foram preparadas diluições em serie (de 1 para 10) em solução triptona sal.

#### 3.5.2 Contagem de microrganismos totais a 30°C

Inoculou-se 1 mL da suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa e adicionou-se 12 a 15 mL do meio de cultura *plate count agar*. Após a solidificação do meio, as placas foram

incubadas a 30°C. Procedeu-se à contagem, ao fim de 72h, de todas as colónias desenvolvidas num máximo de 300 colónias.

### 3.5.3 Contagem de bolores e leveduras

Inoculou-se 0,1 mL da suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa para o meio de cultura específico (dichloran rose bengal chloramphenicol para produtos com  $a_w > 0,95$  e dichloran glicerol agar para produtos com  $a_w < 0,95$ ). Espalhou-se o líquido sobre a superfície da placa com um espalhador estéril até a completa absorção no meio. As placas foram incubadas aerobiamente, com as tampas numa posição superior, na estufa a 25°C por 5 dias. No final do tempo de incubação procedeu-se à leitura das placas, selecionando-se as placas com menos de 150 colónias.

### 3.5.4 Contagem de bactérias ácido lácticas (BAL)

Inoculou-se 1 mL de suspensão inicial de cada diluição preparada para a respetiva placa e adicionou-se 12 a 15 mL do meio de cultura específico de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). Após a solidificação do meio, adicionou-se uma outra camada de meio de cultura (15 mL) e deixou-se solidificar novamente. De seguida, as placas foram invertidas e incubadas a 30°C durante 72h  $\pm$  3h, sendo que ao fim deste tempo selecionaram-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150. Para confirmação das colónias, repicou-se as colónias características para meio de cultura *nutrient agar* e incubou-se a placa a 37°C durante 24h.

## 3.6 Desenvolvimento de ketchups

Na **Tabela 3.2** estão representadas as fermentações selecionadas da purga sem conservantes (Purga A) para o desenvolvimento de ketchups e as respetivas designações dadas.

**Tabela 3.2.** Designação dada às purgas fermentadas selecionadas para o desenvolvimento dos ketchups.

Inóculo	Fator de diluição	Sal (%)	Designação
mix 4	3	1,5	A.1
<i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	A.2
<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	A.3
<i>D. hansenii</i> + mix 4	6	0,4	A.4

Para cada uma das quatro fermentações selecionadas, elaboraram-se ketchups com incorporação de 10%, 20%, e 30% de purga fermentada e uma versão com incorporação do teor máximo de purga para remoção total da água da receita. As formulações criadas foram desenvolvidas a partir da receita de ketchup que originou as purgas utilizadas no trabalho. A elaboração dos ketchups teve em consideração a acidez, o °Brix e o teor de sal de cada fermentação obtida, conforme se apresenta na **Tabela 3.3** e **Tabela 3.4**.

**Tabela 3.3.** Formulações das diferentes versões de ketchup e respetiva percentagem de incorporação de purgas fermentadas.

Teor de purga (%)	Purga incorporada	Versão	Ingrediente (%)			
			Água	Açúcar	Vinagre	Sal Refinado
-	-	Padrão	36,1	21,7	11,9	2,3
10	A.1	K1	28,1	20,6	11,1	2,1
	A.2	K2	27,4	21,1	11,4	2,1
	A.3	K3	27,4	21,1	11,4	2,1
	A.4	K4	27,3	21,2	11,3	2,1
20	A.1	K5	19,0	20,6	10,4	2,0
	A.2	K6	18,0	21,1	11,0	2,0
	A.3	K7	18,0	21,1	11,0	2,0
	A.4	K8	18,1	21,2	10,8	2,0
30	A.1	K9	9,9	20,6	9,6	1,8
	A.2	K10	8,6	21,1	10,5	1,8
	A.3	K11	8,6	21,1	10,5	1,8
	A.4	K12	8,8	21,1	10,2	1,8

**Tabela 3.4.** Formulações dos diferentes ketchups com incorporação do teor máximo de purga fermentada.

Teor purga (%)	Purga incorporada	Versão	Ingrediente (%)			
			Água	Açúcar	Vinagre	Sal Refinado
-	-	Padrão	36,1	21,7	11,9	2,3
40,9	A.1	K13	0	20,6	8,8	1,6
39,2	A.2	K14	0	21,1	10,1	1,7
39,2	A.3	K15	0	21,1	10,1	1,7
39,4	A.4	K16	0	21,2	9,7	1,7

Para cada versão de ketchup produziu-se um quilograma numa BIMBY VORWERK modelo TM5. Primeiramente, o concentrado de tomate foi triturado juntamente com a purga fermentada e água, e de seguida dispersou-se os ingredientes secos numa velocidade superior. Depois de incorporar totalmente os ingredientes sólidos foram aplicadas temperaturas entre 60 a 90°C, durante 10 minutos. A produção do ketchup ficou completa com a adição do componente ácido – o vinagre de álcool. O ketchup foi embalado a quente em frascos rPET, selados com 243 volts durante 2,6 segundos de acordo com o procedimento utilizado na empresa, e conservados a 4°C.



**Figura 3.2.** Etapas do desenvolvimento do ketchup: produção, enchimento, rotulagem e selagem, respetivamente.

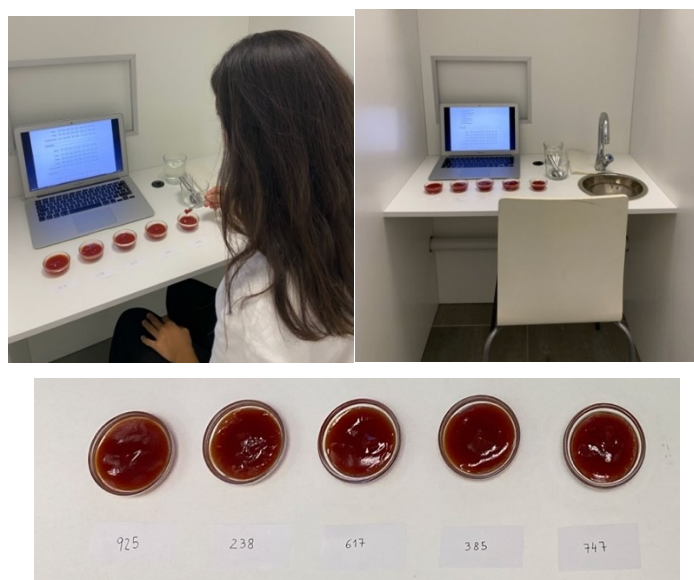
### 3.7 Análise sensorial

A aceitação dos ketchups foi avaliada a partir de um grupo de consumidores (n = 16, 3 homens, 14 mulheres), selecionados dentro da empresa. De forma a determinar o ketchup mais apreciado, apresentou-se o ketchup padrão sem conservantes, bem como as quatro formulações de ketchup desenvolvidas com diferentes percentagens de incorporação de cada purga fermentada, conforme apresentado na **Tabela 3.5**.

**Tabela 3.5.** Codificação das amostras e respetiva versão.

Código	Ketchup
617	Padrão
385	K13
925	K14
238	K15
747	K16

As amostras foram codificadas com 3 dígitos. Cada amostra foi deixada à temperatura ambiente (20°C) por 1 hora antes da degustação, após ser armazenado a 4°C por pelo menos 24 horas, e depois servida num copo de vidro com colher e um copo com água para lavar o palato entre as amostras. Os participantes foram instruídos a beber água antes e depois de cada degustação.



**Figura 3.3.** Registo fotográfico da prova sensorial de ketchup.

Os provadores preencheram, para cada ketchup, uma folha de prova desenvolvida para o efeito (**Apêndice B**), na qual foi pedido para avaliar diferentes atributos como aparência, aroma, acidez e sabor, assim como a apreciação global da amostra, numa escala hedónica de nove pontos: 1 = "não gostei extremamente", 2 = "não gostei muito", 3 = "não gostei moderadamente", 4 = "não gostei ligeiramente", 5 = "nem gostei nem não gostei", 6 = "gostei ligeiramente", 7 = "gostei moderadamente", 8 = "gostei muito" e 9 = "gostei extremamente". A intenção de compra também foi avaliada pelos

participantes, numa escala de cinco níveis, que variou entre "Eu certamente não compraria" a "Eu certamente compraria".

### **3.8 Análise nutricional**

Para a análise da composição química foram selecionadas as amostras de K13 (ketchup com 40,9% de purga A) e K15 (ketchup com 39,2% de purga C) e o ketchup padrão. Todas as análises foram realizadas por uma empresa externa.

### **3.9 Análise de custos dos produtos**

Para o cálculo do custo dos produtos desenvolvidos, teve-se em consideração o preço/kg presente nas fichas técnicas de cada matéria-prima. A poupança obtida em cada formulação de ketchup foi calculada pela diferença do custo face ao ketchup padrão e expressa em percentagem.

### **3.10 Análise estatística**

Os resultados de pH, acidez láctica, °Brix, cloretos, cor e consistência foram medidos em triplicado e submetidos a análise estatística de forma a averiguar a ocorrência de diferenças significativas entre os resultados. Para a análise de variância (ANOVA) foi utilizado o programa de análise estatística Graphpad Prism (versão 9.0), recorrendo-se ao teste Tukey para comparar mais de 2 amostras, com um grau de confiança de 95% ( $p = 0,05$ ). Realizou-se o teste t-Student quando se comparou apenas duas amostras. Na análise sensorial os valores obtidos não seguiam a normalidade pelo que se utilizou-se um teste não paramétrico para o efeito, designadamente o Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de  $p$  foram inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Cada valor é apresentado com uma média de triplicados  $\pm$  desvio padrão.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Análise dos custos gerados pelos resíduos da empresa**

Inicialmente realizou-se uma análise aos produtos da empresa que apresentaram não conformidades no ano de 2022. As purgas totalizam entre 13 000 a 14 000 quilogramas de desperdício gerado e um prejuízo entre 11 000 a 12 000€ no espaço de um ano, valores expressivos que justificam o trabalho de circularidade industrial. Salientam-se as despesas adicionais pela ocupação de equipamento, mão-de-obra e despesas de processamento de resíduos.

### **4.2 Análise preliminar das purgas sem e com conservantes: Parâmetros físico químicos e microbiológicos**

Numa primeira fase foram recolhidas duas purgas da unidade produtiva da Mendes Gonçalves e realizadas análises dos parâmetros físico químicos de cada uma. Os resultados apresentam-se na **Tabela 4.1** e **Tabela 4.2**.



**Figura 4.1.** Imagens das purgas recolhidas na produção, a) sem conservantes e b) com sorbato de potássio (conservante).

As purgas recolhidas (**Figura 4.1**) são visualmente idênticas, diferindo na sua formulação, uma vez que a purga A não contém conservantes e a purga B contém sorbato de potássio. O uso de conservantes como o sorbato de potássio poderá afetar o desempenho da fermentação da purga B, uma vez que a sua função é de bloqueio do desenvolvimento de carga microbiana (Mohammadzadeh-Aghdash et al., 2018).

**Tabela 4.1.** Análise dos parâmetros físico químicos do ketchup sem conservantes, e respetiva purga.

Amostra	Ketchup sem conservantes	Purga A
pH	3,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,10 <sup>a</sup>
°Brix	34,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	31,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
Acidez Acética (g/L)	1,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,01 <sup>a</sup>
Cloretos (%)	2,303 ± 0,240 <sup>a</sup>	2,313 ± 0,081 <sup>a</sup>
Consistência (cm)	5,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
L*	23,00 ± 2,65 <sup>a</sup>	24,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
a*	29,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	28,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
b*	25,67 ± 2,08 <sup>a</sup>	25,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
ΔE*	-	2,24

**Tabela 4.2.** Análise dos parâmetros físico químicos do ketchup com conservantes, e respetiva purga.

Amostra	Ketchup com conservantes	Purga B
pH	3,45 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,10 <sup>a</sup>
°Brix	39,8 ± 4,0 <sup>a</sup>	36,4 ± 1,0 <sup>a</sup>
Acidez Acética (g/L)	1,55 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,10 <sup>a</sup>
Cloretos (%)	2,903 ± 0,297 <sup>a</sup>	2,668 ± 0,059 <sup>a</sup>
Consistência (cm)	7,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	7,0 ± 1,0 <sup>a</sup>
L*	23,33 ± 4,04 <sup>a</sup>	24,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
a*	28,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	26,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
b*	20,67 ± 6,11 <sup>a</sup>	21,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
ΔE*	-	2,24

As análises demonstraram que apenas existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na consistência do ketchup sem conservantes e da purga A, o que é expectável visto que a medição da consistência deste ketchup é realizada a uma temperatura elevada (40°C) e a purga foi analisada a uma temperatura consideravelmente inferior, o que afeta diretamente os resultados. O facto dos restantes parâmetros

avaliados não apresentarem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os ketchups e respectivas purgas, realça a importância de valorização destes resíduos industriais. A cor, que é um dos atributos sensoriais mais importantes do ketchup, não apresentou diferenças óbvias ao olho humano, porque  $1 < \Delta E < 3,0$ , de acordo com a literatura, é um resultado satisfatório (Francis & Clydesdale, 1975).

É de realçar que a revalorização das purgas tem de estar de acordo com os parâmetros de qualidade para o reprocessamento destes fluxos, já que não é possível valorizar fluxos materiais que coloquem em causa a segurança de consumidores (Oosterveer et al., 2014). À vista disso, realizaram-se análises microbiológicas, cujos resultados se apresentam na

#### **Tabela 4.3.**

**Tabela 4.3.** Tabela resumo das análises microbiológicas da purga sem conservantes e da purga com conservantes.

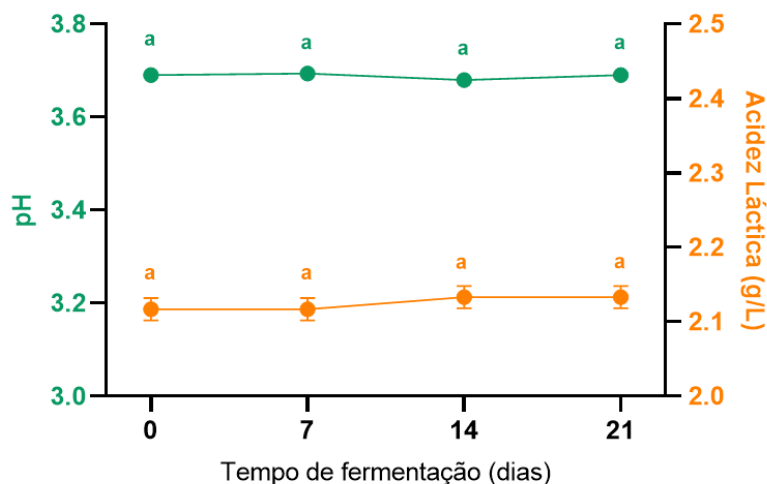
Análise	Resultado (UFC/g)	
	Purga A	Purga B
Contagem de Microrganismos a 30°C	1,2E+4	<1,0E+1
Contagem de Bactérias Ácido-Láticas	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Bolores	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Leveduras	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Enterobacteriaceae	<1,0E+1	<1,0E+1

A análise à **Tabela 4.3** permitiu verificar que nenhuma das purgas recolhidas apresentou crescimento microbiano.

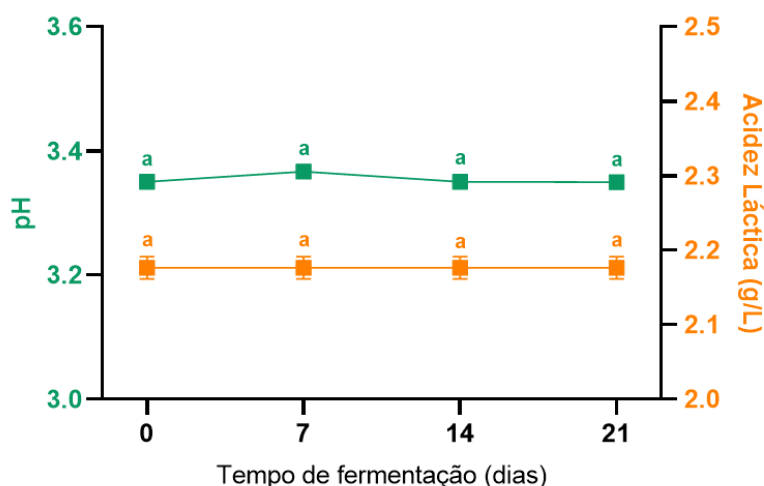
No caso da Purga A, as análises mostraram que o tratamento térmico aplicado na sua produção, com temperaturas entre 60°C a 90°C, bem como o pH de 3,7 contribuíram para a eliminação dos possíveis microrganismos existentes. No caso da Purga B, o conservante utilizado, assim como o pH reduzido (3,3) também impediram o crescimento microbiano.

#### **4.3 Ensaios preliminares de fermentação**

Primeiramente realizou-se um ensaio preliminar em cada umas das purgas, ambas inoculadas com o mix 4. O desempenho da fermentação foi monitorizado com a análise dos parâmetros físico químicos, que se encontram expressos nos gráficos da **Figura 4.2** e **Figura 4.3**. com os valores de pH e concentração de ácido láctico.



**Figura 4.2.** Evolução do pH e da concentração de ácido láctico (g/L) na fermentação da purga A. Letras diferentes na mesma linha indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 4.3.** Evolução do pH e da concentração de ácido láctico (g/L) na fermentação da purga B. Letras diferentes na mesma linha indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Os gráficos evidenciam que a fermentação não ocorreu em nenhuma das purgas, uma vez que nem o pH apresentou uma descida significativa ( $p > 0,05$ ) no seu valor, nem a concentração de ácido láctico aumentou significativamente ( $p > 0,05$ ). Este resultado era expectável já que a purga de ketchup contém um elevado teor de açúcares, acidez e um pH baixo, o que representa um meio onde poucas ou nenhuma bactérias ácido lácticas têm registos de atividade (Axelsson, 2004; Claesson et al., 2007; Kandler, 1983; Orla-Jensen, 1919).

Uma vez que se verificou na literatura que as condições desfavoráveis encontradas nas purgas podem ser melhoradas com a utilização de *D. hansenii*, testaram-se dois inóculos com esta levedura. *D. hansenii* apresenta capacidade de crescimento na faixa de pH da purga A, ao contrário das restantes bactérias. Para além disso, tem a capacidade de degradar o ácido láctico, o que permite aumentar o pH do meio fermentativo e possibilitar o crescimento de bactérias mais sensíveis a meios ácidos. Esta

bactéria consegue também tolerar concentrações muito altas de açúcares, tal como a purga apresenta (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014). Desta forma, fez sentido testar a levedura como inóculo individualmente e em consórcio com o mix 4, na purga A (**Tabela 4.4 e Tabela 4.5**).

Esta fermentação não foi realizada na purga B, uma vez que a levedura na presença do sorbato de potássio produz um odor desagradável semelhante ao petróleo, não desejado no produto final (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014).

**Tabela 4.4.** Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	3,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,69 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	3,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,01 <sup>a</sup>
21	3,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,01 <sup>a</sup>

**Tabela 4.5.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	2,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,02 <sup>a</sup>
7	2,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,02 <sup>a</sup>
14	2,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,02 <sup>a</sup>
21	2,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,01 <sup>a</sup>

**Tabela 4.6.** Evolução do °Brix nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	31,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	31,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,9 ± 1,6 <sup>a</sup>
7	31,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	32,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	31,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	32,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
21	32,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	33,0 ± 0,9 <sup>a</sup>

Contrariamente ao que seria expectável, a levedura não provocou nenhuma melhoria no meio fermentativo que possibilitasse o desenvolvimento da fermentação pelo mix 4, constituído por bactérias mais sensíveis aos teores de açúcar e de acidez apresentados.

#### 4.4 Estudo das condições ótimas de fermentação na purga A

A purga A foi utilizada como meio modelo para o processo fermentativo, uma vez que não contém conservantes com possível efeito negativo no desenvolvimento da fermentação e apresenta uma carga microbiana inicial menor, devido ao enchimento a quente, o que faz com que seja um meio fermentativo mais simples para este estudo.

##### 4.4.1 Melhoria do meio fermentativo

Uma vez que os ensaios preliminares permitiram verificar que as purgas não representam meios de fermentação favoráveis para o crescimento das bactérias, foi necessário melhorar as condições fermentativas, com foco na acidez, pH e °Brix. Neste sentido, fizeram-se duas diluições da purga A com água destilada, uma de fator 3 e outra de fator 6.

**Tabela 4.7.** Resultados das diluições realizadas na purga de ketchup sem conservantes. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de *Tukey*,  $p < 0,05$ ).

Diluição	pH	°Brix	Acidez Acética (g/L)
Purga	3,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	31,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>a</sup>
Fator 3	3,84 ± 0,02 <sup>ab</sup>	10,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>b</sup>
Fator 6	3,89 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>c</sup>

Na **Tabela 4.7** pode-se observar que não houve um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) do pH da amostra com fator de diluição 3 em relação à purga, o que pode estar relacionado com a diluição feita com água destilada que não provoca grandes alterações no valor do pH. No entanto, a amostra com um fator de diluição 6 teve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no pH para um valor de 3,89 ± 0,03, mais favorável para o crescimento das BAL (Axelsson, 2004; Claesson et al., 2007; Kandler, 1983; Orla-Jensen, 1919).

Os resultados apresentados (**Tabela 4.7**) mostram que tanto o °Brix, como a concentração de ácido acético apresentaram descidas significativas ( $p < 0,05$ ) nos seus valores face à purga, sendo que a diluição de fator 6 foi mais acentuada. Esta diluição apresentou condições mais propícias para o desenvolvimento da fermentação, e por isso foi utilizada nos ensaios seguintes.

##### 4.4.2 Estudo da fermentação com diferentes inóculos e variação do teor de sal

De seguida realizaram-se ensaios para estudar o comportamento dos diferentes inóculos utilizados onde se utilizou a purga diluída num fator de 6, com um teor de sal de 0,4% e 1,5%.

- Teor de sal de 0,4%

Primeiramente, compara-se o comportamento do mix 4 com cada uma das bactérias individualmente. Os resultados de pH, concentração de ácido láctico e °Brix ao longo das fermentações apresentam-se a seguir (**Tabela 4.8** e **Tabela 4.9**).

**Tabela 4.8.** Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>b</sup>
14	3,17 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,87 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,10 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,10 ± 0,01 <sup>c</sup>
21	3,08 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,86 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,01 <sup>d</sup>

**Tabela 4.9.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	0,73 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,03 <sup>b</sup>
21	0,90 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,07 <sup>c</sup>

**Tabela 4.10.** Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
21	4,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>a</sup>

Os resultados evidenciam o desempenho positivo da inoculação da purga com o mix 4 cujo pH apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) até  $3,08 \pm 0,06$  e, conseqüentemente, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da acidez láctica de  $(0,41 \pm 0,01)$  g/L até  $(0,90 \pm 0,02)$  g/L após 21 dias.

Relativamente às estirpes inoculadas individualmente na purga, *P. pentosaceus* mostrou atividade fermentativa com uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH, assim como um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de ácido láctico ao longo da fermentação. Considerando que o pH inicial desta fermentação era significativamente baixo, este resultado está de acordo com a literatura que refere a presença de bactérias heterofermentativas numa fase inicial e o domínio de bactérias homofermentativas, como *P. pentosaceus* em fases posteriores, em que o meio já é muito ácido (Charles W. Bamforth, 2019). Os resultados também vão de encontro à literatura que menciona a presença desta estirpe em fermentações espontâneas de tomate, um dos principais constituintes do ketchup, sugerindo uma maior facilidade de adaptação às condições do meio, conforme se observou (Di Cagno et al., 2013; Lonvaud-Funel, 1999).

*P. pentosaceus* destacou-se face ao mix 4 por terminar com maior acidez, e conseqüentemente menor pH, resultado suportado pela literatura que indica que o aumento na concentração de ácido láctico promove também o crescimento de *P. pentosaceus*, considerada uma espécie muito tolerante a meios ácidos (Di Cagno et al., 2015).

*L. mesenteroides* não apresentou qualquer atividade possivelmente devido à sua sensibilidade às condições ácidas descrita na literatura como característica desta estirpe (Paramithiotis et al., 2010).

*Lb. rhamnosus* apresentou no 14º dia uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do seu pH, e um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da acidez, o que indica atividade fermentativa. No 21º dia de fermentação não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) tanto no pH como na acidez láctica, relativamente ao início do ensaio, o que poderá ser explicado pela contaminação detetada (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4.** Contaminação presente, ao fim de 21 dias, no ensaio com inoculação de *Lb. rhamnosus*.

O °Brix não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) ao longo de nenhuma fermentação.

Também se realizaram ensaios com 3 consórcios diferentes cuja literatura menciona o seu sucesso em produtos à base de tomate e, que por isso apresentam maior possibilidade de terem bom desempenho na fermentação da purga de ketchup (Ricci et al., 2020; Simões et al., 2022). Os resultados destes ensaios estão apresentados na **Tabela 4.11** e **Tabela 4.12** e **Tabela 4.13**.

**Tabela 4.11.** Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,95 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,76 ± 0,06 <sup>b</sup>
21	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>

**Tabela 4.12.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>b</sup>
21	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>

**Tabela 4.13.** Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	4,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
7	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,9 <sup>a</sup>
21	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a</sup>

Contrariamente ao que seria expectável, nenhum dos consórcios registou atividade fermentativa, e por isso não apresentaram benefícios de utilização neste meio. Este resultado pode ser explicado pelo facto das fermentações estudadas na literatura terem sido feitas em produtos à base de tomate, e neste caso a purga utilizada ser uma matriz bem mais complexa (Ricci et al., 2020; Simões et al., 2022).

Um resultado curioso foi o consórcio de *Lb. plantarum* + *P. pentosaceus* que apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da acidez, no 14º dia de fermentação, com produção de etanol e CO<sub>2</sub> (Figura 4.5). Dado que *P. pentosaceus* é homofermentativa e *Lb. plantarum* heterofermentativa facultativa, este resultado demonstra que esta última apresentou metabolismo heterofermentativo com a produção de metabolitos secundários como etanol, conforme a literatura (Evanovich et al., 2019).



**Figura 4.5.** Amostra de *Lb. plantarum* e *P. pentosaceus* com produção de gás no 14º dia de fermentação.

O comportamento do mix 4 foi comparado com a atividade de *D. hansenii* como inóculo isolado e em consórcio de ambos, de forma a entender a influência desta levedura no meio (Tabela 4.14, Tabela 4.15, Tabela 4.16).

**Tabela 4.14.** Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,04 ± 0,02 <sup>b</sup>
14	3,17 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,01 <sup>c</sup>
21	3,08 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,01 <sup>c</sup>

**Tabela 4.15.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>
7	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>b</sup>
14	0,73 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,02 <sup>c</sup>
21	0,90 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,02 <sup>d</sup>

**Tabela 4.16.** Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix		
	Mix 4	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> + mix 4
0	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
21	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>

A levedura não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros analisados ao longo da fermentação, o que é expectável visto que a literatura relata que *D. hansenii* não tem capacidade fermentativa (Praphailong & Fleet, 1999).

O consórcio de *D. hansenii* e o mix 4 registou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no pH ao fim de sete dias de fermentação, com estabilização nos restantes dias, em que não se verificam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Os valores de acidez láctica apresentaram também diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) sete dias depois o início do ensaio até ao último dia. O °Brix não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Comparando o comportamento do mix 4 com o consórcio *D. hansenii* + mix 4 é visível o melhor desempenho do mix 4 em associação com *D. hansenii*, pela descida mais acentuada do pH ao longo

da fermentação. O mesmo se observa na acidez láctica, cuja sua produção é significativamente superior quando se usa o inóculo *D. hansenii* + mix 4. Este resultado comprova a vantagem de utilização da levedura em consórcio com as BAL, e está de acordo com a literatura que relata a melhoria do meio pela levedura e a sua capacidade de produzir fatores de crescimento, nomeadamente vitaminas e aminoácidos, de extrema importância para as bactérias (Ferreira & Viljoen, 2003).

- Teor de sal de 1,5%

De seguida, realizaram-se ensaios de fermentação com os mesmos inóculos utilizados nos ensaios anteriores, discutidos no ponto 4.3.2, com a exceção dos inóculos com a levedura (*D. hansenii* e *D. hansenii*+mix 4). Estes ensaios tiveram a finalidade de entender melhor o impacto de uma concentração final de 1,5% de NaCl no meio fermentativo.

**Tabela 4.17.** Evolução do pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	3,80 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	3,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,96 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,01 <sup>a</sup>
21	3,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,01 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,02 <sup>a</sup>

**Tabela 4.18.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respetivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>
21	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>

**Tabela 4.19.** Evolução do °Brix nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix				
	Mix 4	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	6,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
21	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>a</sup>

*Lb. plantarum* apresentou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no pH, na acidez e no total de sólidos solúveis no 21º dia do ensaio, o que pode revelar indícios de fermentação. Este resultado pode ser corroborado pela literatura que menciona a presença desta estirpe em fermentações espontâneas de tomate, o que explica a capacidade de adaptação de *L. plantarum* a este meio de fermentação (Di Cagno et al., 2013).

Destaca-se o efeito negativo do sal no desempenho da fermentação com o mix 4 e nos ensaios com *P. pentosaceus* que não registaram nenhuma atividade fermentativa, contrariamente aos ensaios realizados sem adição de sal no qual a purga fermentou com os dois inóculos.

Contrariamente ao que ocorreu nos ensaios anteriores, nestes ensaios com 1,5% de NaCl o inóculo *L. mesenteroides* teve um desempenho positivo, sustentado pela diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH, assim como pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos valores de acidez ao longo dos 21 dias. Também o °Brix diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no 21º dia. Este resultado é concordante com a informação da bibliografia que menciona que a fermentação vegetal é frequentemente caracterizada pela sucessão de espécies BAL, na qual *L. mesenteroides* é a estirpe que habitualmente inicia a fermentação devido à sua capacidade de tolerar uma ampla gama de concentrações de sal (Paramithiotis et al., 2014).

No 21º dia de fermentação verificou-se um desvio na tendência fermentativa com um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no pH e uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da acidez, devido ao aparecimento de uma contaminação (**Figura 4.6**). A literatura reporta a presença desta estirpe em fermentações espontâneas de tomate, um dos componentes principais do ketchup, o que justifica a atividade fermentativa de *L. mesenteroides* observada na purga de ketchup diluída (Di Cagno et al., 2013).



**Figura 4.6.** Contaminação presente, ao fim de 21 dias, no ensaio inoculado com *L. mesenteroides* com adição de sal.

Os resultados relativos aos consórcios de duas estirpes utilizados encontram-se na **Tabela 4.20**, **Tabela 4.21** e **Tabela 4.22**.

**Tabela 4.20.** Evolução do pH nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	3,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,79 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>
14	3,12 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,98 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>
21	3,03 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,98 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,78 ± 0,02 <sup>a</sup>

**Tabela 4.21.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respectivos ensaios de fermentação realizados com adição de sal. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>
7	0,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>
14	0,60 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>
21	0,72 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>

**Tabela 4.22.** Evolução do °Brix nos respectivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix		
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
0	6,4 ± 0,1 <sup>ab</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	6,4 ± 0,1 <sup>ab</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
21	6,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>

Relativamente aos consórcios que anteriormente não apresentaram atividade, neste ensaio com 1,5% de sal verificou-se a fermentação com dois consórcios, *Lb. rhamnosus* com *P. pentosaceus* e *Lb. plantarum* com *L. mesenteroides*.

O consórcio de *Lb. rhamnosus* com *P. pentosaceus* apresentou uma descida gradual do pH, sendo que essa diminuição foi significativa ( $p < 0,05$ ) no 14º e no 21º dia de fermentação. A medição da acidez seguiu a mesma tendência. Esta fermentação apresentou formação de CO<sub>2</sub> e etanol, metabólitos secundários produzidos pelo metabolismo heterofermentativo de *Lb. rhamnosus* (Calasso & Gobbetti, 2016). A medição do °Brix apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o dia 7 e o dia 21.

Por outro lado, o inóculo composto por *Lb. plantarum* e *L. mesenteroides* registou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no pH ao fim de sete dias de fermentação, com uma estabilização destes valores nos restantes dias. A acidez também registou, tal como o valor de °Brix, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do seu valor logo ao fim de sete dias. No 14º dia de fermentação a descida significativa ( $p < 0,05$ ) na acidez produzida pelo consórcio poderá ser explicada pela contaminação observada **Figura 4.7**.



**Figura 4.7.** Contaminação presente, ao fim de 14 dias, no ensaio inoculado com *Lb. plantarum* e *L. mesenteroides* com adição de sal.

A fermentação do consórcio segue uma tendência semelhante à fermentação de *L. mesenteroides* o que poderá indicar o domínio desta estirpe no consórcio. Realça-se o facto do inóculo criar acidez em apenas sete dias de fermentação, o que o torna ideal para a fermentação da purga A, em contexto industrial.

#### 4.4.3 Efeito da diluição no comportamento da fermentação do mix 4

Adicionalmente, realizaram-se ensaios apenas com o mix 4, por questões de limitação de tempo, em duas diluições distintas (diluição 6 e diluição 3) sem sal adicionado e com um teor de sal de 1,5%, de forma avaliar o comportamento deste consórcio.

- Diluição 6 vs Diluição 3

**Tabela 4.23.** Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respetivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		Ácido Láctico (g/L)		°Brix	
	Diluição 6	Diluição 3	Diluição 6	Diluição 3	Diluição 6	Diluição 3
0	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	3,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
14	3,17 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
21	3,08 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,1 <sup>b</sup>

Estes ensaios demonstram que este consórcio não tem um desempenho favorável na purga menos diluída (diluição 3) uma vez que não apresenta diferenças significativas em nenhum parâmetro à exceção do °Brix.

- Diluição 6 vs Diluição 3 (ambas com o mesmo teor de sal: 1,5%)

**Tabela 4.24.** Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respectivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		Ácido Láctico (g/L)		°Brix	
	Diluição 6	Diluição 3	Diluição 6	Diluição 3	Diluição 6	Diluição 3
0	3,80 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	3,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
14	3,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,1 <sup>b</sup>
21	3,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,13 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,1 <sup>b</sup>

Estes resultados demonstram que a adição de sal tem um efeito positivo no mix 4 utilizado como inóculo na purga menos diluída (diluição 3), com uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da acidez láctica, contrariamente ao que se verificou anteriormente sem a adição de sal. O valor dos sólidos solúveis totais apresentou também uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no 7º dia de ensaio. Assim, o mix 4 na purga com diluição 3 revela-se que bom inóculo para utilização em escala piloto, uma vez que a fermentação ocorre em menos tempo comparativamente às restantes, com o valor de pH e acidez láctica a permanecerem estáveis nos restantes dias de fermentação.

Por outro lado, a adição de sal na diluição 6 tem um efeito negativo na fermentação, na qual não se registaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no pH e na acidez.

Conclui-se que o sal tem um efeito benéfico na purga menos diluída (diluição 3), que apresenta condições mais desfavoráveis ao desenvolvimento das BAL.

Apresenta-se a seguir (**Tabela 4.25**) o resumo dos ensaios realizados com a purga A que fermentaram, com especificação dos que fermentaram em apenas 7 dias.

**Tabela 4.25.** Tabela resumo das fermentações que ocorreram na purga A.

Cultura inicial	Diluição	% NaCl	Fermentou em 7 dias?
Mix 4	3	1,5	Sim
	6	0,4	Não
<i>P. pentosaceus</i>	6	0,4	Não
<i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	Sim
<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	Sim
<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6	1,5	Não
<i>D. hansenii</i> + mix 4	6	0,4	Sim

#### 4.5 Aplicações das condições de fermentação da purga A na purga B

Depois de estudadas as condições de fermentação da purga A, selecionaram-se os inóculos que fermentaram para aplicar na purga com conservantes. Como mencionado anteriormente, a levedura *Debaryomyces hansenii* não será utilizada como inóculo nestes ensaios, uma vez que a purga utilizada contém sorbato de potássio e a literatura menciona a transformação deste composto noutra com um odor desagradável semelhante ao petróleo que leva à rejeição do consumidor (Córdoba et al., 2009; Wrent et al., 2014).

A análise de resultados segue a divisão apresentada nos resultados dos ensaios com a purga A, primeiramente os resultados com teor de sal de 0,4% e depois os ensaios com 1,5% de sal, todos com uma diluição de fator 6, à exceção de um ensaio realizado com o mix 4 com uma diluição de fator 3, conforme a **Tabela 4.25**.

- Teor de sal de 0,4%

**Tabela 4.26.** Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix nos respetivos ensaios de fermentação. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		Ácido Láctico (g/L)		°Brix	
	Mix 4	<i>P. pentosaceus</i>	Mix 4	<i>P. pentosaceus</i>	Mix 4	<i>P. pentosaceus</i>
0	3,63 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	3,10 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,62 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
14	2,89 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,54 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
21	2,90 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,52 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>a</sup>

Nos ensaios sem adição de sal, apenas o mix 4 apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos três parâmetros em análise, nomeadamente o pH, o ácido láctico e o °Brix, o que indica que este inóculo fermentou na purga com sorbato de potássio.

Por sua vez, *P. pentosaceus* não fermentou neste meio, possivelmente devido a um efeito negativo do sorbato de potássio no desenvolvimento desta bactéria, ainda que vários estudos afirmem que este não afeta o crescimento das BAL (Romero-Gil et al., 2016).

- Teor de sal de 1,5%

As fermentações realizadas com a purga B cuja percentagem de sal foi de 1,5% apresentam-se na **Tabela 4.27**.

**Tabela 4.27.** Evolução do valor de pH nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	pH		
	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum + L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus + P. pentosaceus</i>
0	3,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
7	3,10 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,17 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,17 ± 0,02 <sup>b</sup>
14	2,94 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,01 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,99 ± 0,01 <sup>c</sup>
21	2,90 ± 0,02 <sup>d</sup>	2,94 ± 0,01 <sup>d</sup>	2,93 ± 0,01 <sup>d</sup>

Todos os inóculos testados apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH ao longo dos 21 dias de fermentação, terminando com valores semelhantes entre si.

**Tabela 4.28.** Evolução da concentração de ácido láctico (g/L) nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Ácido Láctico (g/L)		
	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum + L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus + P. pentosaceus</i>
0	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>
7	0,55 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>b</sup>
14	0,62 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,72 ± 0,01 <sup>c</sup>
21	0,75 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,72 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,68 ± 0,02 <sup>d</sup>

No que diz respeito ao ácido láctico presente em cada fermentação, todos apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do teor deste composto.

**Tabela 4.29.** Evolução do °Brix nos respetivos ensaios de fermentação realizados. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	°Brix		
	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum + L. mesenteroides</i>	<i>Lb. rhamnosus + P. pentosaceus</i>
0	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	6,6 ± 0,2 <sup>bc</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>	7,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
14	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
21	6,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	6,8 ± 0,4 <sup>a</sup>

*L. mesenteroides* e o consórcio de *Lb. plantarum* e *L. mesenteroides* apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do teor de sólidos solúveis totais, contrariamente a *Lb. rhamnosus* + *P. pentosaceus* que não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) ao longo da fermentação.

Tendo em conta os resultados apresentados verificou-se que *L. mesenteroides* individualmente apresenta uma diminuição mais acentuada do pH e um aumento da concentração de ácido láctico face ao consórcio *Lb. plantarum* + *L. mesenteroides*.

Os resultados da fermentação com o mix 4 como inóculo na purga com uma diluição de fator três apresentam-se na **Tabela 4.30**.

**Tabela 4.30.** Evolução do valor de pH, concentração de ácido láctico (g/L) e °Brix na purga com conservantes (diluição 3) inoculada com o mix 4. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Tempo (dias)	Parâmetros analisados		
	pH	Ácido Láctico (g/L)	°Brix
0	3,49 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>a</sup>	15,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
7	3,23 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,00 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
14	3,11 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,10 ± 0,00 <sup>b</sup>	11,7 ± 0,1 <sup>b</sup>
21	3,06 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,17 ± 0,0 <sup>c</sup>	12,0 ± 0,2 <sup>b</sup>

O pH da fermentação com o inóculo mix 4 apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do seu valor ao longo dos 21 dias, enquanto a acidez das amostras aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas no 14º dia. O °Brix diminuiu significativamente ao fim de sete dias e depois manteve-se constante.

O resumo dos ensaios com a purga com conservantes apresenta-se na **Tabela 4.31**.

**Tabela 4.31.** Tabela resumo dos resultados dos ensaios de fermentação realizados na purga com conservantes.

Cultura inicial	Diluição	% NaCl	Fermentou em 7 dias?
Mix 4	3	1,5	Não
	6	0,4	Não
<i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	Não
<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	Não
<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6	1,5	Não

Estes resultados mostram que o sorbato de potássio não teve influência negativa no desempenho das fermentações, o que está de acordo com a literatura que reporta um maior efeito inibitório contra bolores e leveduras em comparação com bactérias, indicando que este não interfere na fermentação ácido láctica (Dehghan et al., 2018; Sofos & Busta, 1981).

Por outro lado, nenhum ensaio apresentou uma estabilização dos valores de pH e da concentração de ácido láctico ao fim de 7 dias, contrariamente ao que se verificou em alguns ensaios com a purga A.

#### 4.6 Avaliação da incorporação da purga A fermentada numa formulação de ketchup

Uma vez que se pretende desenvolver vias de circularidade para os desperdícios gerados na produção de ketchup, avaliou-se a incorporação da purga A, fermentada com diferentes inóculos, numa nova formulação deste molho. Selecionaram-se as fermentações da purga A com melhor desempenho para incorporar em novas formulações de ketchup, cuja designação dada se apresenta na **Tabela 4.32**.

**Tabela 4.32.** Designação dada aos inóculos selecionados.

Inóculo	Fator de diluição	Sal (%)	Designação
Mix 4	3	1,5	A.1
<i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	A.2
<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	A.3
<i>D. hansenii</i> + Mix 4	6	0,4	A.4

O ketchup sem conservantes que originou as purgas foi considerado padrão, pelo que a elaboração das formulações foi feita com o intuito de manter os parâmetros físico químicos e as qualidades sensoriais do mesmo. Testaram-se diferentes percentagens de incorporação das fermentações, nomeadamente 10%, 20% e 30% de cada uma em formulações de ketchup, conforme se apresenta na **Tabela 4.33**, **Tabela 4.34** e **Tabela 4.35**.

**Tabela 4.33.** Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 10% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Purga	Amostra	pH	°Brix	Acidez Acética (g/L)	Cloretos (%)	Consistência (cm)
-	Padrão	3,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	34,7 ± 2,6 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,305 ± 0,241 <sup>a</sup>	5,9 ± 1,20 <sup>a</sup>
A.1	K1	3,57 ± 0,02 <sup>a</sup>	36,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,341 ± 0,004 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
A.2	K2	3,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	35,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,257 ± 0,005 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
A.3	K3	3,57 ± 0,01 <sup>a</sup>	36,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,287 ± 0,007 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
A.4	K4	3,56 ± 0,03 <sup>a</sup>	34,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,153 ± 0,003 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>a</sup>

As formulações com inclusão de 10% de purga fermentada não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) relativamente ao padrão em nenhum dos parâmetros físico químicos analisados.

**Tabela 4.34.** Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 20% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Purga	Amostra	pH	°Brix	Acidez Acética (g/L)	Cloretos (%)	Consistência (cm)
-	Padrão	3,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	34,7 ± 2,6 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,305 ± 0,241 <sup>ab</sup>	5,9 ± 1,20 <sup>a</sup>
A.1	K5	3,56 ± 0,03 <sup>a</sup>	36,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,571 ± 0,007 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
A.2	K6	3,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	34,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,238 ± 0,005 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
A.3	K7	3,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	36,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,271 ± 0,004 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
A.4	K8	3,56 ± 0,03 <sup>a</sup>	35,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,220 ± 0,008 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>a</sup>

A incorporação de 20% de purga fermentada nos ketchups também não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na análise dos parâmetros, ainda que na análise dos cloretos as diferentes fórmulas desenvolvidas apresentem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si.

**Tabela 4.35.** Parâmetros físico químicos de ketchup com incorporação de 30% de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Purga	Amostra	pH	°Brix	Acidez Acética (g/L)	Cloretos (%)	Consistência (cm)
-	Padrão	3,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	34,7 ± 2,6 <sup>ab</sup>	1,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,305 ± 0,241 <sup>a</sup>	5,9 ± 1,20 <sup>a</sup>
A.1	K9	3,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	37,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,296 ± 0,004 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
A.2	K10	3,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	34,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,310 ± 0,002 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
A.3	K11	3,55 ± 0,02 <sup>a</sup>	36,3 ± 0,5 <sup>ab</sup>	1,69 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,282 ± 0,005 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
A.4	K12	3,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	35,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,343 ± 0,005 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,1 <sup>a</sup>

Também quando se utilizou 30% de purga fermentada no desenvolvimento de formulações de ketchup não se registaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros analisados. A análise dos sólidos solúveis totais apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas versões K9 e K10 desenvolvidas.

Uma vez que um fator de grande relevância para a estratégia de valorização dos resíduos é a poupança gerada para a empresa realizaram-se 4 formulações adicionais, com a percentagem máxima de incorporação de cada purga fermentada na receita de ketchup. Para tal, retirou-se toda a água da receita e diminuiu-se ao máximo o uso de vinagre consoante a acidez obtida em cada fermentação. As percentagens incorporadas de cada purga, bem como os parâmetros físico químicos das 4 versões apresentam-se na **Tabela 4.36**.

**Tabela 4.36.** Parâmetros físico químicos de ketchup com percentagem máxima de incorporação de purga fermentada. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Purga	Purga (%)	Amostra	pH	°Brix	Acidez acética (g/L)	Cloretos (%)	Consistência (cm)
-	-	Padrão	3,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	34,7 ± 2,6 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,305 ± 0,241 <sup>a</sup>	5,9 ± 1,2 <sup>a</sup>
A.1	40,9	K13	3,54 ± 0,02 <sup>a</sup>	38,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,79 ± 0,03 <sup>ab</sup>	2,271 ± 0,008 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
A.2	39,2	K14	3,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	36,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,83 ± 0,05 <sup>ab</sup>	2,230 ± 0,005 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
A.3	39,2	K15	3,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	37,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,267 ± 0,003 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
A.4	39,4	K16	3,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	37,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	1,70 ± 0,02 <sup>ab</sup>	1,874 ± 0,004 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>a</sup>

A suplementação do ketchup com o teor máximo de purga fermentada não alterou as características físico-químicas dos ketchups desenvolvidos comparativamente ao padrão, à exceção da versão K13 com uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no valor de sólidos solúveis totais.

A formulação K15 apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor de acidez relativamente ao padrão, e a versão K16 exibiu diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na medição dos cloretos em relação ao padrão.

Na **Tabela 4.36** e na **Tabela 4.35** verificou-se uma maior consistência dos ketchups com inclusão de um fermentado face ao padrão, ainda que sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) neste parâmetro. Tal pode estar relacionado com o facto destes resultados corresponderem à inclusão de maiores percentagens de purga fermentada, e conseqüentemente a inclusão de uma maior fração de exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias ácido lácticas, que devido às suas propriedades físicas e características reológicas, melhoram a textura e a viscosidade do molho (Liu et al., 2010; Werning et al., 2012).

Estes resultados demonstraram que os molhos desenvolvidos não apresentaram diferenças nos parâmetros físico químicos face ao padrão, o que se revela muito vantajoso do ponto de vista económico uma vez que estes ketchups geram uma poupança para a empresa através da diminuição do uso de matérias-primas na sua formulação.

#### 4.6.1 Avaliação da cor

Os parâmetros de cor do CIELAB, bem como os valores  $\Delta E^*$ , são apresentados nas seguintes tabelas.

**Tabela 4.37.** Parâmetros de cor do CIELAB e respetivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Amostra	Cor			
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
Padrão	23,00 ± 2,65 <sup>a</sup>	29,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	25,67 ± 2,08 <sup>a</sup>	-
K1	22,09 ± 0,06 <sup>a</sup>	30,17 ± 0,08 <sup>a</sup>	28,27 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,80
K2	22,17 ± 0,05 <sup>a</sup>	29,56 ± 0,06 <sup>a</sup>	27,20 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,76
K3	22,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	30,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	27,86 ± 0,06 <sup>ab</sup>	2,57
K4	22,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	30,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	28,27 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,83

Comparativamente ao padrão, todas as formulações com incorporação de 10% de purga fermentada não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros L\* e a\*, o que demonstra que a incorporação de purga fermentada nesta proporção não afetou a luminosidade (L\*) nem a tendência para o vermelho/verde (a\*), parâmetro muito relevante no ketchup.

Relativamente ao parâmetro b\* que reflete os tons de amarelo (+b\*) e azul (-b\*), a adição da purga provocou nas versões K1 e K4 um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) deste parâmetro para a tonalidade amarela, em relação ao padrão.



**Figura 4.8.** Versões K1, K2, K3 e K4 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente.

**Tabela 4.38.** Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Amostra	Cor			
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
Padrão	23,00 ± 2,65 <sup>a</sup>	29,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	25,67 ± 2,08 <sup>ab</sup>	-
K5	21,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	29,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	26,88 ± 0,07 <sup>ac</sup>	1,69
K6	22,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	29,80 ± 0,05 <sup>a</sup>	27,70 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,27
K7	23,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	29,22 ± 0,06 <sup>a</sup>	24,03 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,73
K8	23,66 ± 0,05 <sup>a</sup>	28,37 ± 0,07 <sup>a</sup>	24,66 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,55

Nas formulações com inclusão de 20% de purga fermentada nenhum dos parâmetros apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) face ao padrão.



**Figura 4.9.** Versões K5, K6, K7 e K8 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respetivamente.

**Tabela 4.39.** Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Amostra	Cor			
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
Padrão	23,00 ± 2,65 <sup>a</sup>	29,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	25,67 ± 2,08 <sup>ab</sup>	-
K9	24,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	26,75 ± 0,04 <sup>b</sup>	20,42 ± 0,04 <sup>c</sup>	6,05
K10	21,95 ± 0,05 <sup>a</sup>	29,95 ± 0,06 <sup>a</sup>	27,60 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,28
K11	23,84 ± 0,05 <sup>a</sup>	28,66 ± 0,06 <sup>ab</sup>	24,13 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,88
K12	22,16 ± 0,06 <sup>a</sup>	29,75 ± 0,06 <sup>a</sup>	26,80 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,47

No que diz respeito às formulações com 30% de purga fermentada, verificou-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros a\* e b\* na versão K9 face ao padrão, o que indica no parâmetro a\* uma maior tendência para a tonalidade verde e no parâmetro b\* para o azul. Este resultado pode estar relacionado com o menor rigor na pesagem da oleorresina cuja pigmentação é predominantemente azul e verde.

A mudança de cor total do ketchup padrão com as restantes versões foi avaliada pelo cálculo de ( $\Delta E^*$ ), que indica o grau de diferença de cor entre duas amostras. A versão K9 apresenta o valor mais alto de ( $\Delta E^*$ ) superior a 3, pelo que se distingue a olho nu a diferença de cor desta versão e o padrão.



**Figura 4.10.** Versões K9, K10, K11 e K12 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respectivamente.

**Tabela 4.40.** Parâmetros de cor do CIELAB e respectivas formulações de ketchup desenvolvidas. Valores médios com letras diferentes (na mesma coluna) indicam que são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Amostra	Cor			
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
Padrão	23,00 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	29,33 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	25,67 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	-
K13	21,48 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	28,97 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	25,74 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,56
K14	22,17 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	29,48 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	26,68 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,32
K15	22,86 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	29,68 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	26,51 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,92
K16	23,17 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	29,07 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	24,16 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,54

Tal como nas restantes formulações não existiram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no L\*, o que revela que a inclusão de purga fermentada no desenvolvimento de ketchups não afeta a luminosidade do molho. Tanto o parâmetro a\* como o b\* não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras.

A versão K15 foi a que apresentou menos diferenças em relação ao ketchup padrão, com valor de  $\Delta E^*$  mais baixo.



**Figura 4.11.** Versões K13, K14, K15 e K16 dos ketchups desenvolvidos apresentados da esquerda para a direita, respectivamente.

De uma forma geral, a inclusão das purgas fermentadas nos ketchups não afetou os parâmetros da cor (L\*, a\* e b\*).

#### 4.6.2. Poupança obtida com as novas formulações

Com base nos custos das matérias-primas utilizadas nas formulações desenvolvidas, verificou-se que as versões K13, K14, K15 e K16 são as que criam maior poupança, quer do ponto de vista económico, como de utilização dos recursos, nomeadamente de matérias-primas. As poupanças obtidas nas restantes versões foram inferiores pelo que não se apresentaram na seguinte tabela.

**Tabela 4.41.** Poupança obtida para a empresa nas respetivas versões de ketchup desenvolvidas.

Purga	Purga (%)	Versão	Poupança (%)
A.1	40,9	K13	1,9
A.2	39,2	K14	1,2
A.3	39,2	K15	1,2
A.4	39,4	K16	1,1

A poupança conseguida para a empresa está de acordo com a percentagem de incorporação de cada purga fermentada nos diferentes ketchups, onde a maior incorporação gerou uma maior poupança.

#### 4.6.2 Análise microbiológica

Depois do desenvolvimento das várias formulações de ketchup com inclusão de purga fermentada, foram selecionadas as quatro versões para análise sensorial que apresentaram uma maior poupança para a empresa. Antes da realização da análise sensorial todas as amostras foram analisadas microbiologicamente.

**Tabela 4.42.** Tabela das análises microbiológicas realizados ao ketchup padrão e às formulações desenvolvidas com maior percentagem de incorporação de purga fermentada.

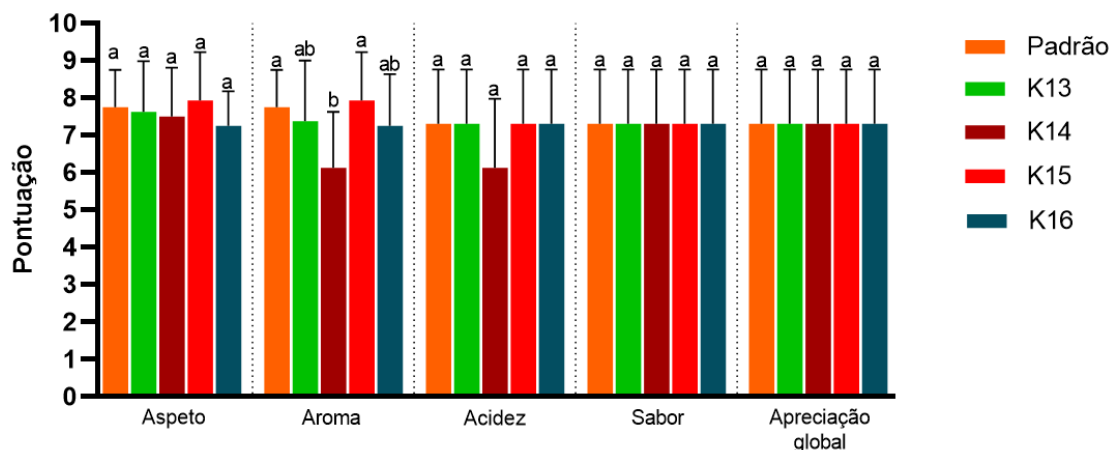
Análise	Resultado (UFC/g)				
	Padrão	K13	K14	K15	K16
Contagem de Microrganismos a 30°C	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Bactérias Ácido-Láticas	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Bolores	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de Leveduras	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1	<1,0E+1

Os resultados mostram que nenhum ketchup apresentou crescimento microbiano, o que demonstra que o tratamento térmico aplicado na sua produção, com temperaturas entre 60°C a 90°C, contribuiu para a eliminação dos possíveis microrganismos existentes.

#### 4.6.3 Análise sensorial

Em virtude dos resultados obtidos nas 4 versões de ketchup com maior incorporação de purga, cujos parâmetros se encontram muito semelhantes entre si e o padrão, realizou-se uma análise sensorial de forma a perceber a aceitação das formulações de ketchup.

As pontuações médias dos 9 parâmetros foram expressas num gráfico que está expresso na **Figura 4.12**.



**Figura 4.12.** Pontuações médias para os diferentes atributos sensoriais e apreciação global das amostras em estudo.

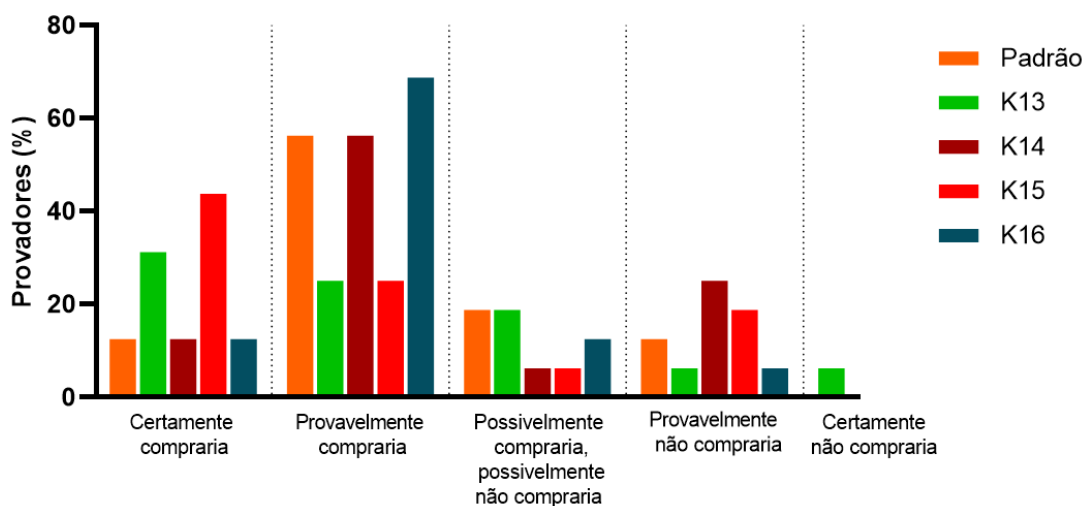
De uma forma geral os atributos dos ketchups em análise não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre si, o que é um ponto positivo, visto que o padrão não se destacou face aos ketchups com inclusão de purga fermentada, indicando uma elevada aceitação dos consumidores para as formulações desenvolvidas.

As amostras não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no aspeto, o que segue a mesma tendência da análise realizada à cor em que também não se verificaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Ainda assim, a amostra K16 foi considerada com o pior aspeto pelo consumidor, com uma pontuação de  $7,63 \pm 1,02$  para "aspeto". Tal poderá estar relacionado com diferenças visíveis na textura deste ketchup face ao padrão, devido à produção de EPSs pelas BAL que criam uma textura única.

Em termos do atributo "aroma", a versão K14 ( $6,69 \pm 1,66$ ) diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do padrão, e da versão K15 ( $7,31 \pm 1,45$ ), cujo aroma foi o mais apreciado. O aroma a fermentado é um atributo que poderá diminuir as hipóteses de compra dos ketchups desenvolvidos, pelo que o resultado é extremamente positivo para a versão K15 que se destaca neste parâmetro.

A acidez dos diferentes ketchups não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), ainda que o K14 apresentasse um valor consideravelmente mais baixo, como se observou também no atributo "aroma".

A apreciação global mostrou que as amostras foram igualmente aceites pelos provadores uma vez que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre si. Realça-se que apesar de todas as formulações serem apreciadas, K13 e K15 apresentaram valores ligeiramente superiores nos atributos "aspeto" e "aroma".



**Figura 4.13.** Resultados obtidos para a intenção de compra dos ketchups desenvolvidos.

A intenção de compra do produto também foi avaliada pelo painel e os resultados estão apresentados na **Figura 4.13**.

Na **Figura 4.13** pode-se observar que cerca de 40% do painel de provadores afirmou que “certamente compraria” K15 e 30% “certamente compraria” a versão K13. A versão K16 foi a amostra que obteve mais avaliações “provavelmente compraria”, pelo que se destaca a grande aceitação desta amostra.

#### 4.6.4 Caracterização nutricional

Uma vez que as análises foram realizadas externamente e com custos adicionais para a empresa, apenas se realizou análise de uma réplica dos ketchups desenvolvidos, pelo que não foi possível realizar análise estatística destes resultados.

As amostras K13 e K15 destacaram-se na análise sensorial e por isso foram caracterizadas nutricionalmente, assim como o ketchup utilizado como padrão.

**Tabela 4.43.** Composição nutricional por 100 gramas de ketchup padrão e dos ketchups desenvolvidos com purga fermentada.

Parâmetro	Padrão	K13	K15
Humidade (g/100g)	46,8	63,6	65,6
Hidratos de carbono (g/100g)	28,9	30,7	28,9
Proteína (g/100g)	1,23	1,54	1,43
Fibras alimentares (g/100g)	0,3	1,2	1,2
Lípidos (g/100g)	<0,3	<0,3	<0,3
Sódio (g/100g)	0,92	0,90	0,84
Ácidos gordos saturados (g/100g)	<0,05	<0,05	<0,05
Ácidos gordos monoinsaturados (g/100g)	<0,05	<0,05	<0,05
Ácidos gordos polinsaturados (g/100g)	<0,05	<0,05	<0,05
Açúcares totais (g/100g)	25,3	30,6	28,1
Cinzas totais (g/100g)	2,3	3,0	2,9
Valor energético kJ (kJ/100g)	528	558	525
Valor energético Kcal (kcal/100g)	124	131	124

As análises realizadas mostraram que a incorporação de um fermentado tornou os ketchups mais nutritivos, com um teor de cinza mais elevado, assim como de fibras alimentares. Estes resultados estão concordantes com a literatura, que descreve amplamente a melhoria nutricional dos alimentos após fermentação (Simões et al., 2022). O aumento da composição mineral foi também descrito na bibliografia na fermentação de vários grupos de alimentos (Melini et al., 2019a).

A composição nutricional dos ketchups desenvolvidos apresentou um aumento ligeiro do conteúdo proteico comparativamente ao padrão, conforme estudos realizados com legumes que verificaram um aumento no teor proteico e de cinzas após a fermentação, possivelmente devido ao aumento da biomassa bacteriana e à perda de hidratos de carbono durante o processo de fermentação (Emkani et al., 2022).

A humidade das amostras K13 e K15 foi consideravelmente superior à do padrão que pode ser justificada pela incorporação de purgas com 78% a 88% de água na sua constituição, dependendo da diluição realizada e do teor de sal adicionado. O maior teor de humidade da versão K15 era expectável visto pelo facto da purga ter maior percentagem de água face à versão K13.

Os parâmetros nutricionais analisados mostraram que a versão K15 se assemelhou mais ao padrão. A versão K13 apresentou maior teor de hidratos de carbono, assim como de açúcares totais, e exibiu um valor energético também superior. Este resultado pode ser explicado pelo facto da purga utilizada na versão K13 apresentar um °Brix superior.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho estudou-se o desenvolvimento de uma solução de valorização das purgas de ketchup formadas na unidade produtiva da empresa Mendes Gonçalves cujos parâmetros físico químicos não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) face ao ketchup entregue ao consumidor final, o que destaca a relevância de valorização deste resíduo industrial. A estratégia de valorização estudada foi a fermentação com bactérias ácido lácticas cujos estudos realizados permitiram concluir que as purgas não representavam meios favoráveis para o desenvolvimento das BAL. De forma a melhorar as condições de fermentação da purga A antes das fermentações realizou uma diluição de fator 6 (D6) para diminuir a acidez acética e o °Brix e aumentar o pH.

Na purga sem conservantes os inóculos mais promissores, que fermentaram em apenas 7 dias, foram *Leuconostoc mesenteroides*, individualmente e em consórcio com *Lactobacillus plantarum*, com D6 e 1,5% de sal. Nesta diluição, também a associação de *Debaryomyces hansenii* com o consórcio de 4 BAL com 0,4% de sal fermentou ao fim de uma semana. O consórcio das 4 BAL também se destacou na purga com fator de diluição 3 (D3) com atividade fermentativa em 7 dias. Enquanto na purga com conservantes, o consórcio das 4 bactérias em estudo com D6 e 0,4% de NaCl, assim como com D3 e 1,5% de sal apresentaram a maior produção de ácido láctico.

As quatro melhores fermentações da purga de ketchup sem conservantes foram incorporadas em novas formulações, que tiveram como padrão o ketchup que deu origem às purgas, o que permitiu criar circularidade na produção deste ketchup e valorização de um resíduo industrial. A incorporação da acidez produzida nas fermentações permitiu o desenvolvimento de formulações de ketchup com diminuição da percentagem de vinagre utilizada, assim como as frações de água, açúcar e sal. De uma forma geral, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros físico químicos entre as amostras desenvolvidas e o padrão, salientando o potencial das formulações desenvolvidas. Em termos microbiológicos ficou demonstrado que o processo utilizado no desenvolvimento dos ketchups foi eficaz, pelo que os produtos são seguros para alimentação.

As formulações de ketchup desenvolvidas permitiram criar uma poupança para a empresa, com valores mais expressivos nas versões K13, K14, K15 e K16, entre 1 e 2%. O trabalho desenvolvido permitiu não só gerar uma poupança do ponto de vista económico, mas também de utilização de recursos nas novas formulações, e diminuição dos resíduos industriais gerados, o que aumentou a circularidade do processo produtivo de ketchup. As versões K13, K14, K15 e K16 foram selecionadas para a análise sensorial por apresentarem a maior vantagem económica. A prova realizada permitiu selecionar os ketchups com a incorporação de 40,9% de purga fermentada com o mix 4, com D3 e 1,5% de sal (K13) e o ketchup com a incorporação de 39,2% de purga fermentada com *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, com D6 e 1,5% de sal (K15).

A análise nutricional destas amostras evidenciou a melhoria nutricional dos ketchups com a inclusão da purga fermentada, que apresentaram um conteúdo proteico mais elevado, assim como um teor de cinzas e fibras alimentares mais elevado.

## 6 TRABALHO FUTURO

A estratégia de circularidade desenvolvida para a produção de ketchup e valorização das purgas formadas carece de verificação para aplicação industrial. A análise das fermentações com recurso a HPLC é fundamental para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos, bem como o teor de açúcares durante toda a fermentação e correlacionar esses valores com os resultados de pH e acidez e °Brix obtidos nos ensaios fermentativos realizados.

Como se trata de um ambiente industrial, será conveniente a diminuição do tempo de fermentação atual de 7 dias através do aumento da quantidade de inóculo utilizado, e através do estudo da viabilidade da técnica de *backslopping* nestes ensaios fermentativos, uma vez que permite processos fermentativos mais rápidos, e produtos mais semelhantes em todas as fermentações.

Uma vez que os fermentados apresentam potencial uso como conservantes naturais, característica muito relevante para a indústria, faria sentido estudar o efeito das purgas fermentadas como conservantes naturais no desenvolvimento de novos molhos sem adição de sorbato de potássio ou tratamento térmico, com monitorização da atividade microbológica.

Depois de realizadas as melhorias necessárias e aplicada com sucesso a estratégia de circularidade numa escala piloto, poder-se-ia estender a aplicação da metodologia desenvolvida a todos os ketchups produzidos na Mendes Gonçalves, assim como a purgas formadas na produção de outros molhos como barbecue e mostarda, cuja formulação não incluem óleo de forma a aumentar a circularidade na unidade de produção da empresa.

## APÊNDICES

### Apêndice A. Ensaios de Fermentação

Tabela 0.1. Tabela resumo dos ensaios de fermentação realizados e respectivos resultados.

Purga utilizada	Cultura inicial	Diluição	% NaCl	Fermentou?	Fermentou em 7 dias?
Purga sem conservantes	Mix 4	-	2,2	não	não
		3	0,4	não	não
			1,5	sim	sim
		6	0,4	sim	não
			1,5	não	não
	<i>Lb. plantarum</i>	6	0,4	não	não
	1,5		não	não	
	<i>L. mesenteroides</i>	6	0,4	não	não
	1,5		sim	sim	
	<i>Lb. rhamnosus</i>	6	0,4	não	não
	1,5		não	não	
	<i>P. pentosaceus</i>	6	0,4	sim	não
	1,5		não	não	
	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	0,4	não	não
1,5	sim		sim		
<i>Lb. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6	0,4	não	não	
1,5		não	não		
<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6	0,4	não	não	
1,5		sim	não		
<i>D. hansenii</i>	-	2,2	não	não	
		6	0,4	não	não
	<i>D. hansenii</i> + mix 4	-	2,2	não	não
Purga com conservantes	Mix 4	6	0,4	sim	não
		6	0,4	sim	não
	<i>P. pentosaceus</i>	6	0,4	não	não
	<i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	sim	não
	<i>Lb. plantarum</i> + <i>L. mesenteroides</i>	6	1,5	sim	não
	<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6	1,5	sim	não

## Apêndice B Análise sensorial

Folha de prova									
ID Proveedor: _____	Idade: _____	Gênero: _____							
<b>Instruções:</b>									
a) São fornecidas cinco amostras, cada uma rotulada com um código de três dígitos.									
925	238	617	385	747					
b) Classifique as amostras fornecidas da esquerda para a direita, limpando o seu paladar entre amostras antes de avaliar a amostra seguinte, de acordo com a escala apresentada, sendo:									
1- Desgostei extremamente									
2- Desgostei muito									
3- Desgostei moderadamente									
4- Desgostei ligeiramente									
5- Indiferente									
6- Gostei ligeiramente									
7- Gostei moderadamente									
8- Gostei muito									
9- Gostei extremamente									
<hr/>									
<b>Amostra 925</b>									
<hr/>									
Aspetto:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aroma:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acidez:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Apreciação global:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figura 0.1. Folha de prova.

---

**Amostra 238**

---

Aspeto:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Aroma:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Acidez:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Sabor:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Apreciação global:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

---

**Amostra 617**

---

Aspeto:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Aroma:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Acidez:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Sabor:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Apreciação global:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

---

**Amostra 385**

---

Aspeto:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Aroma:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Acidez:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Sabor:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Apreciação global:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Figura 0.2. Folha de prova (continuação).

---

**Amostra 747**

---

Aspeto:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Aroma:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Acidez:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Sabor:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

Apreciação global:  1  2  3  4  5  6  7  8  9

**Comentários:**

---

---

---

---

**Intenção de compra**

---

c) Quantifique, numa escala de 1 a 5, cada amostra onde:

- 1- Certamente não compraria
- 2- Provavelmente não compraria
- 3- Possivelmente compraria, possivelmente não compraria
- 4- Provavelmente compraria
- 5- Certamente compraria

Amostra 925:  1  2  3  4  5

Amostra 238:  1  2  3  4  5

Amostra 617:  1  2  3  4  5

Amostra 385:  1  2  3  4  5

Amostra 747:  1  2  3  4  5

**Comentários:**

---

---

---

Figura 0.3. Folha de prova (continuação).

## 7. BIBLIOGRAFIA

- A Corsetti, A Ciarrocchi, and R. P. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition* (Vol. 4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00856-8>
- Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Sriganesh, S. (2016). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S6–S10.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 139, 1–66.
- Bah, A., Ferjani, R., Fhoula, I., Gharbi, Y., Najjari, A., Boudabous, A., & Ouzari, H. I. (2019). Microbial community dynamic in tomato fruit during spontaneous fermentation and biotechnological characterization of indigenous lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, 69(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1385-4>
- Bamforth, C. W., & Cook, D. J. (2019). *Food, fermentation, and micro-organisms*. John Wiley & Sons.
- Barreiro, J. A., Milano, M., & Sandoval, A. J. (1997). Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 33(3–4), 359–371.
- Bicas, J. L., Silva, J. C., Dionísio, A. P., & Pastore, G. M. (2010). Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 7–18. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000100002>
- Blakeney, M. (2019). Food loss and food waste: Causes and solutions. In *Food Loss and Food Waste: Causes and Solutions*. <https://doi.org/10.4337/9781788975391>
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Calasso, M., & Gobbetti, M. (2016). *Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus* spp.: *Other Species*.
- Capurso, L. M. (2019). Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG A Review. *Journal of Clinical Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1097>
- Charles W. Bamforth, D. J. C. (2019). Vegetable Fermentations. In *Food, Fermentation, and Micro-organisms* (Vol. 15, pp. 211–215). <https://doi.org/10.1002/9783527620920.ch17>
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 22–28.
- Córdoba, J. J., Andrade, M. J., Bermúdez, E., Núñez, F., Asensio, M. A., & Rodríguez, M. (2009). *Debaryomyces*. In *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (pp. 565–575). <https://doi.org/10.1201/b22030-44>
- Council, N. R. (1992). *Applications of biotechnology in traditional fermented foods*. National Academies Press.
- Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>
- Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents.

- Trends in Food Science and Technology*, 80, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Di Cagno, R., Filannino, P., & Gobbetti, M. (2015). Vegetable and Fruit Fermentation by Lactic Acid Bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (Second Edi, pp. 216–230). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch14>
- Di Cagno, R., Surico, R. F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J. C., Buchin, S., De Gara, L., & Gobbetti, M. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.017>
- Didier Montet, Ramesh C. Ray, N. Z.-R. (2015). Lactic Acid Fermentation of Vegetables and Fruits. In *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods* (1st Editio). CRC Press Bota Raton.
- Driessen, F. M. (1981). Protocooperation of yogurt bacteria in continuous cultures. *Special Publications of the Society for General Microbiology*, 99–120.
- El Sheikha, A. F., & Montet, D. (2014). Fermented fish and fish products: Snapshots on culture and health. *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*, 188–222. <https://doi.org/10.1201/b17307>
- Emkani, M., Oliete, B., & Saurel, R. (2022). Effect of Lactic Acid Fermentation on Legume Protein Properties, a Review. *Fermentation*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/fermentation8060244>
- Endrizzi, I.; Framondino, V.; Ciaghi, R.; Gasperi, F. . et al. (2006). Toward a new fruit juice line with a high healthy power. *Ingredienti Alimentari (Italy)*, 5(27).
- Evanovich, E., De Souza Mendonça Mattos, P. J., & Guerreiro, J. F. (2019). Comparative genomic analysis of lactobacillus plantarum: An overview. *International Journal of Genomics*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4973214>
- Fan, L., & Hansen, L. T. (2012). Fermentation and Biopreservation of Plant-Based Foods with Lactic Acid Bacteria. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*, 56–69.
- Fardet, A., & Rock, E. (2018). In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: A narrative review of evidence. *Nutrition Research Reviews*, 31(1), 52–70. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000191>
- Ferreira, A. D., & Viljoen, B. C. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00252-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00252-6)
- Figueira, D., Rodrigues, G., & Castelo-Branco, D. (2021). *Relatório de sustentabilidade: Criamos o futuro da alimentação.*
- Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1975). *Food colorimetry: theory and applications*. AVI Publishing Co. Inc.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild Lactobacillus plantarum and Oenococcus oeni strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology*

- Letters*, 230(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00854-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00854-1)
- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). *Application of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins for Food Biopreservation*. 1, 15–22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7_3)
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- GOLDONI, J., GOLDONI, C., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., & LIMA, U. (2001). Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas. *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia Na Produção de Alimentos.*, 269–304.
- Habibi Najafi, M. B., Fatemizadeh, S. S., & Tavakoli, M. (2019). Release of Proteolysis Products with ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities in Probiotic Yogurt Containing Different Levels of Fat and Prebiotics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(1), 367–377. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9679-8>
- Henderson, D. P. e Toone, E. J. (1999). Aldolases. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (pp. 337–440). Newnes.
- Hesseltine, C. W. (1983). Microbiology of oriental fermented foods. *Annual Review of Microbiology*, 37, 575–601. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.003043>
- Holland, R., & Liu, S.-Q. (2011). *Leuconostoc spp.* Elsevier, 138–142.
- Ibrahim, S. A. (2016). Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus spp.: Other Species. In *Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00857-x>
- Joshi, S. R., & Biswas, K. (2015). Antioxidants in fermented foods. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages, Fao 1998*, 553–566. <https://doi.org/10.1201/b18279>
- Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., & Yan, X. (2012). Novel natural food antimicrobials\*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 381–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101241>
- Kalui, C. M., Mathara, J. M., Kutima, P. M., Kiiyukia, C., & Wongo, L. E. (2009). Functional characteristics of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4363–4373.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.
- Kang, T. S., Korber, D. R., & Tanaka, T. (2013). Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative Lactobacillus panis PM1. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7818–7826.
- Khan, M. K., Karnpanit, W., Nasar-Abbas, S. M., Huma, Z. E., & Jayasena, V. (2018). Development of a fermented product with higher phenolic compounds and lower anti-nutritional factors from germinated lupin (Lupinus angustifolius L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(12), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13843>
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., & Xiao, M. (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by Bacillus licheniformis 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 101(14), 5528–5533.

- Lonvaud-Funel, A. (1999). *LEUCONOSTOC*.
- Malo, P. M., & Urquhart, E. A. (2016). *Fermented Foods: Use of Starter Cultures* (B. Caballero, P. M. Finglas, & F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá (Eds.); pp. 681–685). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00282-8>
- McFeeters, R. F. (2004). Fermentation Microorganisms and Flavor Changes in Fermented Foods. *Journal of Food Science*, *69*(1), 2002–2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17876.x>
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019a). Health-promoting components in fermented foods: an up-to-date systematic review. *Nutrients*, *11*(5), 1189.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019b). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. *Nutrients*, *11*(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu11051189>
- Meneguetti, M. G., Gaspar, G. G., Laus, A. M., Basile-Filho, A., Bellissimo-Rodrigues, F., & Auxiliadora-Martins, M. (2018). Bacteremia by *Leuconostoc mesenteroides* in an immunocompetent patient with chronic Chagas disease: A case report. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1), 13–15. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3452-7>
- Mohammadzadeh-Aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanebandi, D., Dehghan, P., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*, *257*(December 2017), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.020>
- Mohan, V., Spiegelman, D., Sudha, V., Gayathri, R., Hong, B., Praseena, K., Anjana, R. M., Wedick, N. M., Arumugam, K., Malik, V., Ramachandran, S., Bai, M. R., Henry, J. K., Hu, F. B., Willett, W., & Krishnaswamy, K. (2014). Effect of brown rice, white rice, and brown rice with legumes on blood glucose and insulin responses in overweight Asian Indians: A randomized controlled trial. *Diabetes Technology and Therapeutics*, *16*(5), 317–325. <https://doi.org/10.1089/dia.2013.0259>
- MordorIntelligence. (2022). *ALIMENTOS E BEBIDAS FERMENTADAS - CRESCIMENTO, TENDÊNCIAS, IMPACTO DA COVID-19 E PREVISÕES (2023 - 2028)*.
- Naessens, M., Cerdobbel, A. N., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc dextranucrase and dextran: production, properties and applications*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, *80*(8), 845–860.
- O'Bryan, C. A., Koo, O. K., Sostrin, M. L., Ricke, S. C., Crandall, P. G., & Johnson, M. G. (2018). Characteristics of Bacteriocins and Use as Food Antimicrobials in the United States. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (Vol. 2011). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00015-4>
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, *84*(5–6), 593–604. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
- Oosterveer, P., Adjei, B. E., Vellema, S., & Slingerland, M. (2014). Global sustainability standards and food security: Exploring unintended effects of voluntary certification in palm oil. *Global Food Security*, *3*(3–4), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.09.006>

- Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria: Fred Host and Son*. Copenhagen.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465–499. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00077-6)
- Paramithiotis, S., Doulgeraki, A. I., Tsilikidis, I., Nychas, G. J. E., & Drosinos, E. H. (2012). Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Control*, 27(1), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.022>
- Paramithiotis, S., Hondrodinou, O. L., & Drosinos, E. H. (2010). Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Research International*, 43(4), 1098–1103.
- Paramithiotis, S., Kouretas, K., & Drosinos, E. H. (2014). Effect of ripening stage on the development of the microbial community during spontaneous fermentation of green tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1600–1606. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6464>
- Parian, A. M., Mullin, G. E., Langhorst, J., & Brown, A. C. (2018). Inflammatory Bowel Disease. In *Integrative Medicine: Fourth Edition* (Fourth Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35868-2.00050-5>
- Petersen, K. M., Moller, P. L., & Jespersen, L. (2001). DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2), 11–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00568-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00568-2)
- Pino, A., Vaccalluzzo, A., Caggia, C., Balzaretto, S., Vanella, L., Sorrenti, V., Ronkainen, A., Satokari, R., & Randazzo, C. L. (2022). *Lactocaseibacillus rhamnosus* CA15 (DSM 33960) as a Candidate Probiotic Strain for Human Health. *Nutrients*, 14(22), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu14224902>
- Plengvidhya, V., Breidt, F., & Fleming, H. P. (2004). Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 93(3), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.010>
- Praphailong, W., & Fleet, G. H. (1999). *Debaryomyces*.
- Qi, Y., Huang, L., Zeng, Y., Li, W., Zhou, D., Xie, J., Xie, J., Tu, Q., Deng, D., & Yin, J. (2021). *Pediococcus pentosaceus*: Screening and Application as Probiotics in Food Processing. *Frontiers in Microbiology*, 12(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.762467>
- Ramon, R. (2019). *Lactobacillus rhamnosus*: A Probiotic With Powerful Benefits. *Healthline*. <https://www.healthline.com/nutrition/lactobacillus-rhamnosus#intro>
- Reina, L. D., Pérez-Díaz, I. M., Breidt, F., Azcarate-Peril, M. A., Medina, E., & Butz, N. (2015). Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation at 20°C. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007>
- Ricci, A., Marrella, M., Hadj Saadoun, J., Bernini, V., Godani, F., Dameno, F., Neviani, E., & Lazzi, C. (2020). Development of lactic acid-fermented tomato products. *Microorganisms*, 8(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081192>
- Romero-Gil, V., García-García, P., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2016). Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in

- table olives. *Food Microbiology*, 54, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.014>
- Şanlıer, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2019). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506–527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>
- Saulnier, D. M. A., Molenaar, D., De Vos, W. M., Gibson, G. R., & Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1753–1765. <https://doi.org/10.1128/AEM.01151-06>
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shah N., & Singhal R. (2017). Fermented Fruits and Vegetables. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 45–89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00003-0>
- Shiferaw Terefe, N., & Augustin, M. A. (2020). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(17), 2887–2913.
- Simões, S., Santos, R., Bento-Silva, A., Santos, M. V., Mota, M., Duarte, N., Sousa, I., Raymundo, A., & Prista, C. (2022). Improving nutritional quality of unripe tomato through fermentation by a consortium of yeast and lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(4), 1422–1429. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11476>
- Simpósio Nacional “Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura.* (n.d.). <https://www.insa.min-saude.pt/9o-simposio-nacional-promocao-de-uma-alimentacao-saudavel-e-segura-spas-2022/>
- Simpson, W.J., Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0\\_5](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_5)
- Soetaert, W., Schwengers, D., Buchholz, K., & Vandamme, E. J. (1995). A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 10, Issue C). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(06\)80116-4](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(06)80116-4)
- Sofos, J. N., & Busta, F. F. (1981). Antimicrobial Activity of Sorbate. *Journal of Food Protection*, 44(8), 614–623. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-44.8.614>
- Špička, J., Kalač, P., Bover-Cid, S., & Křížek, M. (2002). Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*, 215, 509–514.
- Thompson, H. O., Önnings, G., Holmgren, K., Strandler, H. S., & Hultberg, M. (2020). *Fermentation of Cauliflower and White Beans with Lactobacillus plantarum – Impact on Levels of Riboflavin, Folate, Vitamin B12, and Amino Acid Composition.* 236–242.
- Tropea, A. (2022). *Food Waste Valorization. Fermentation* 2022. 8, 168. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040168>
- Urbonaviciene, D., Viskelis, P., Bartkiene, E., Juodeikiene, G., & Vidmantiene, D. (2015). The use of

- lactic acid bacteria in the fermentation of fruits and vegetables — technological and functional properties. *Biotechnology*, 135–164. <https://doi.org/10.5772/59938>
- Vieira, M. R., Simões, S., Carrera-Sánchez, C., & Raymundo, A. (2023). Development of a Clean Label Mayonnaise Using Fruit Flour. *Foods*, 12(11), 2111.
- Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A. J., Magalhães Júnior, A. I., & Soccol, C. R. (2020). A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, 36(2), 135–167. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630636>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Werning, M. L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., & López, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Food Additives*, 83–114.
- Whetstone, M. E. C., Drake, M. A., Broadbent, J. R., & McMahon, D. (2006). Enhanced nutty flavor formation in cheddar cheese made with a malty *Lactococcus lactis* adjunct culture. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3277–3284. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72364-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72364-5)
- Wrent, P., Rivas, E. M., Gil de Prado, E., Peinado, J. M., & de Silóniz, M. I. (2014). Debaryomyces. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 1, 563–570. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00081-1>
- Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 203–243. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.003>
- Xiong, T., Li, X., Guan, Q., Peng, F., & Xie, M. (2014). Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses. *Food Control*, 41, 122–127.
- Yilmaz, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlısu, N. B., Sagdic, O., & Arici, M. (2015). Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1604–1624. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8936>
- Yuliana, N., Nurdjanah, S., & Margareta, M. (2013). The Effect of a Mixed-Starter Culture of Lactic Acid Bacteria on the Characteristics of Pickled Orange-Fleshed Sweet Potato L. *Microbiology*, 7(1), 1–8.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, Y., Cui, Y., & Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317–332.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>

Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 18(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90005-2)