



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa**

DESENVOLVIMENTO DE POLPAS DE FRUTA FERMENTADAS

Viviana Ribeiro Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Co-orientadora: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2013

"O valor da realização está na conquista"

Albert Einstein

Agradecimentos:

Por detrás de um trabalho individual, esconde-se um grande número de contribuições, comentários, sugestões, apoios ou críticas construtivas vindas de várias pessoas que, pela importância que tiveram, é forçoso que sejam destacadas.

Por essa razão, não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Moldão, pela ajuda, incentivo, amizade, confiança depositada em mim, disponibilidade, amabilidade, pela preocupação que sempre demonstrou e por ter sempre uma palavra amiga.

Obrigada por me demonstrar que um professor pode ser muito mais do que alguém que apenas transmite um conhecimento.

À minha co-orientadora Professora Doutora Luísa Brito, por todos os ensinamentos, a orientação, confiança depositada em mim, estímulo para que tudo corresse sempre da melhor maneira, paciência para as minhas dúvidas, boa disposição constante, pelas conversas animadas, pela lição de vida! Além de tudo o resto, aprendi que, na vida, temos impreterivelmente que “relativizar”. Guardo com carinho a enorme amizade e ligação pessoal construídas.

A todos no Laboratório de Microbiologia do ISA, começando pela Mestre Ana Carla Silva, que me ensinou a dar os primeiros passos no laboratório e sem a qual tudo seria mais difícil. Agradeço também a todos os meus colegas mestrandos, em especial Inês Oro, Ana Ramos, Ana Teles, Sandro Martins, Virna Dutra, Yigit Keskin. O meu muito obrigada por tudo, sem vocês não teria sido a mesma coisa, foram muito importantes nesta caminhada. Agradeço também à Mestre Rute Coutinho e aos doutorandos Paula Cunha e António Lourenço, por toda a amizade, bons conselhos e todos os momentos partilhados comigo.

À minha querida Susana Silvério por toda a ajuda que prestou na fase final do trabalho, pela disponibilidade e pela paciência nos períodos de stress, foi muito importante para mim.

À minha família por todo o apoio em especial à minha avó, à minha mãe, tia e prima Eliana. Também aos meus tios, padrinho João e madrinha do coração, Sónia.

A todos os meus amigos, especialmente ao Paulo Costa e Mara Marques que há muitos anos me acompanham e que com certeza continuarão a acompanhar.

Agradeço de forma especial ao meu namorado Bruno Godinho, que sempre me acompanha por todas as jornadas da vida, pela paciência, amor, compreensão, carinho, motivação e ajuda. Agradeço também à sua família, em especial à sua mãe Maria Clara Afonso Godinho por todo o carinho e ajuda.

Agradeço a todos os colegas de mestrado que me acompanharam desde a minha entrada no ISA, Andreia Noa, Tânia Figueiredo, Sofia Cristas, Luís Miguel e a todos os outros. Obrigada pela vossa amizade.

Por fim, a todos os outros que, não estando mencionados, de uma maneira ou de outra me ajudaram a levar este trabalho a bom porto.

A TODOS, O MEU MUITO OBRIGADA!

Resumo

A Indústria Alimentar procura, constantemente, a inovação pelo desenvolvimento de novos produtos, com novos sabores e aromas, capazes de promover o bem-estar e a saúde dos consumidores. A utilização da fermentação de polpa de fruta constitui, assim, uma das vias possíveis para dar resposta a esta procura.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver bebidas fermentadas não alcoólicas, ou pouco alcoólicas, com baixo ou nulo teor de açúcares a partir de polpas de pera, maçã e pêsego.

Foram testadas quatro estirpes de leveduras e catorze estirpes de bactérias lácticas, em mono e em co-cultura. Nas três polpas de fruta, a combinação de estirpes de *BC* e *LB* em co-cultura foi a que conduziu a melhores resultados. Nas polpas de pera e de maçã, esta combinação foi a mais interessante numa avaliação sensorial prévia, enquanto que na polpa de pêsego, além de interessante organoleticamente, produziu um abaixamento do °Brix inicial que chegou a atingir 50% e uma concentração de etanol de aproximadamente 2,5% (v/v).

Palavras-chave: Polpa de pêsego; polpa de maçã; polpa de pera; fermentação; bactérias lácticas; leveduras.

Abstract

The Food Industry is constantly on the lookout for innovation by developing new products with new flavors that are able to promote the well-being and the health of the consumers. The use of fermented fruit pulps is therefore one possible way to respond to this demand.

The aim of this study was to develop low or non-alcoholic fermented beverages with low or no sugar content from pulps of pear, apple and peach.

Four yeast strains and fourteen strains of lactic acid bacteria were tested, in mono and in co-culture.

In the three fruit pulps, the combination of *BC* and *LB* in co-culture was the one that provided the best results. In apple and in pear pulps this combination was the most interesting in a sensory evaluation provided, while, in addition, the pulp of peach, besides good organoleptic properties reduced °Brix to about 50% and reached approximately 2,5 % of ethanol (v/v).

Key words: Pulp of peach; pulp of apple; pulp of pear; fermentation; lactic acid bacteria; yeast.

Extended Abstract

Fruits and vegetables are excellent sources of fat soluble vitamins, such as vitamins D, E, K, and the water soluble vitamin B-complex, vitamin C and E, as well as fibers, minerals and antioxidants, among others.

One different way to consume fruits is in the form of fermented fruit pulps. The investigation on fermentation of fruit pulps is, therefore, extremely relevant.

Fermentation provides pleasant organoleptic alterations of the food matrix, improves nutritional value and helps the conservation of the product itself. In this context, the objective of this study was to develop low or non-alcoholic fermented beverages with low sugar content from pulps of pear, apple and peach. The pulps that were used were provided by the company.

Four strains of yeasts and fourteen strains of lactic acid bacteria were tested, in mono and in co-culture.

The strains used in the assays were available in CBISA (Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia) and Coleção de Leveduras do Instituto Superior de Agronomia.

The fermented pulps were characterized in terms of °Brix, pH value and alcohol content. The growth of the strains was monitored along the fermentations with respect to colony forming units per ml of pulp (CFU/ml).

In the fermentation of the pulp of pear, the combination of strains *BC* and *LB* has proved to be the one that mostly contributed to the pleasant sensory characteristics of the fermented product, although the °Brix has not achieved the 50% reduction.

In the fermentation of the apple pulp, in a similar way, the combination of strains *BC* and *LB* was the combination that provided the best sensory results. But the reduction of °Brix did not reached the 50%.

In the fermentation of peach pulp, it was concluded that the best combination in terms of °Brix reduction and pleasant organoleptic properties was *BC* and *LB*. This combination resulted in a very appealing fermented flavor and in a decrease of °Brix in the order of 50% which was according to the initial objective of the work. The only drawback was that the ethanol reached about 2% (v/v), which could not be avoided, since under these conditions (high sugar content of the pulps) the alcoholic fermentation is induced in the yeast strains.

In fact, the assays performed showed that it was not possible to appreciably reduce the °Brix only by the action of lactic acid bacteria. The fruit pulp (pH of 3.8 to 4.4) does not present ideal conditions for the growth of lactic acid bacteria. By the other side, in the

pulps where only yeasts were used, it was possible to achieve the desired reduction in °Brix, but the resulting fermented products did not present appealing sensory characteristics. Thus, it was concluded that in order to obtain a fermented beverage with pleasant properties it is necessary to use yeast and lactic acid bacteria in co-culture. In this sense, it is possible to obtain fermented fruit pulps with lower sugar contents and very low ethanol concentration.

During this work, the monitorization of the sugar content was performed through °Brix evaluation. This parameter indicates the soluble solids and, in fruit juices, these are essentially glucose, fructose and sucrose. However, this is an indirect measurement of total solids, which gives no information regarding the type of sugars present. In fact, the °Brix is an effective approach to get a sense of the content of sugars that may be present in the unfermented pulp, but from the moment that the fermentation starts more rigorous methods for determination of sugars are needed.

The work presented here shows that the fermented peach pulp may be marketable because it presents very pleasant sensorial characteristics, very appreciable reduction of sugars, low concentrations of ethanol and, therefore, proves to be a very attractive fermented fruit pulp for a specific market niche presenting special interest in beverages with low sugar content and very particular sensorial characteristics.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE QUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução geral e objetivos	1
1.2. Polpa de fruta	3
1.2.1. Produção de polpa de fruta.....	3
1.2.2. Composição da matéria-prima	5
1.3. Bebidas fermentadas, processo fermentativo e parâmetros críticos	7
1.3.1. Fermentação láctica	8
1.3.2. Fermentação alcoólica.....	10
1.4. Bactérias lácticas e leveduras.....	10
1.4.1. Bactérias lácticas.....	10
1.4.2. Leveduras.....	11
1.4.3. Interação entre bactérias lácticas e leveduras	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Polpas de fruta.....	14
2.2. Estirpes utilizadas.....	14
2.3. Meios de cultura e soluções utilizadas	16
2.3.1. MRS <i>Broth</i>	16
2.3.2. GYP (Glucose – Yeast – Peptone)	16
2.3.3. <i>Plate Count Agar</i> (PCA).....	17
2.3.4. Solução de Ringer	17
2.4. Manutenção e crescimento de estirpes.....	18
2.4.1. Coleção de trabalho.....	18
2.4.2. Inóculos	18
2.5. Enumeração de microrganismos	18

2.5.1.	Microrganismos totais a 30 °C	18
2.5.2.	Bolores e leveduras	19
2.5.3.	Bactérias lácticas e leveduras em mono e em co-cultura.....	19
2.6.	Determinações químicas	19
2.6.1.	pH.....	19
2.6.2.	Teor de sólidos solúveis (°Brix).....	19
2.6.3.	Teor em etanol	20
2.6.4.	Teor de açúcares totais e redutores (Fenol sulfúrico e DNS)	21
2.7.	Análise sensorial.....	22
2.8.	Ensaio de fermentação	22
2.8.1.	Polpa de pera	23
2.8.2.	Polpa de maçã.....	23
2.8.2.1.	Estirpes utilizadas em mono-cultura	23
2.8.2.2.	Estirpes utilizadas em co-cultura	23
2.8.3.	Polpa de pêsego	24
2.8.3.1.	Estirpes utilizadas em mono-cultura	24
2.8.3.2.	Estirpes utilizadas em co-cultura	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1.	Fermentação de polpa de pera	25
3.2.	Fermentação de polpa de maçã (Resultados preliminares)	29
3.2.1.	Fermentação em mono-cultura	29
3.2.2.	Fermentação em co-cultura	33
3.3.	Fermentação de polpa de pêsego (Resultados preliminares).....	38
3.3.1.	Fermentação em mono-cultura	38
3.3.2.	Fermentação em co-cultura	40
4.	CONCLUSÕES.....	51
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
	ANEXO.....	60

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Composição média de maçã, pera e pêssego	5
Quadro 2 - Conteúdo de açúcares fermentescíveis nos frutos	6
Quadro 3 - Sumos fermentados com diferentes matrizes e respetivas culturas	7
Quadro 4 - Espécies de bactérias lácticas, que foram isoladas de frutas e legumes crus ou fermentados espontaneamente	8
Quadro 5 - Estirpes microbianas utilizadas	15
Quadro 6 - Composição do meio de cultura MRS <i>Broth</i>	16
Quadro 7 - Composição do meio de cultura GYP	16
Quadro 8 - Composição do meio de cultura PCA	17
Quadro 9 - Composição da solução de Ringer	17
Quadro 10 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de leveduras e bactérias	30
Quadro 11 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias.....	32
Quadro 12 - Resultados da avaliação sensorial, pH,°Brix e teor de etanol de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LD</i>	33
Quadro 13 - Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LC</i>	34
Quadro 14 - Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LB</i>	35
Quadro 15 - Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LA</i>	35

Quadro 16 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de leveduras e a bactéria <i>BC</i>	36
Quadro 17 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias	39
Quadro 18 - Resultados da avaliação sensorial, pH, °Brix e teor de etanol de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LA</i>	40
Quadro 19 - Resultados da avaliação sensorial, pH, °Brix e teor de etanol de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LB</i>	41
Quadro 20 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LC</i>	42
Quadro 21 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura <i>LD</i>	42
Quadro 22 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias e leveduras	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama geral de produção de polpa de fruta	4
Figura 2 - Representação esquemática de uma fermentação geral homoláctica e heteroláctica	9
Figura 3 - Fermentação alcoólica	10
Figura 4 - Vias de degradação da glucose e citrato por <i>BC</i> . Erro! Marcador não definido.	
Figura 5 - Polpa de pera, pêsego e maçã, respetivamente	14
Figura 6 - Esquema geral de um sistema de HPLC	20
Figura 7 - Curva de calibração para o etanol	21
Figura 8 - Estirpe de levedura em GYP+AMP	25
Figura 9 - Estirpes de levedura e bactéria láctica em GYP	26
Figura 10 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i>	26
Figura 11 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BD</i> e <i>LB</i>	27
Figura 12 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera inteira, fermentada por por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i>	28
Figura 13 - Evolução dos valores de °Brix e pH em polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i>	36
Figura 14 - Evolução dos valores de °Brix e pH em polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i>	37
Figura 15 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i> com proporção de inóculo 1.	44

Figura 16 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêssego diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i> com proporção de inóculo 2.	45
Figura 17 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêssego diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i> com proporção de inóculo 3.	46
Figura 18 - Evolução dos valores de °Brix, pH e Log UFC/mL em polpa de pêssego diluída a 1:2, fermentada por cultura de <i>BC</i>	47
Figura 19 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêssego diluída a 1:2, fermentada por cultura de <i>LB</i>	48
Figura 21 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêssego inteira, fermentada por co-cultura de <i>BC</i> e <i>LB</i>	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução geral e objetivos

Estima-se que a ingestão diária de frutas e vegetais, *per capita*, seja mais baixa que o recomendado (Di Cagno *et al.*, 2011), pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e pela FAO (*Food and Agriculture Organization*), que deve ser de 400 g de frutas e hortícolas. Nesta perspetiva, interessa encontrar formas de incentivar os consumidores a atingirem a ingestão diária recomendada de uma forma agradável e mais prática.

As frutas e vegetais são excelentes fontes de vitaminas lipossolúveis, tais como as vitaminas D, E, K e hidrossolúveis, como as dos complexos B, C e P, assim como de fibras e minerais, antioxidantes, entre outros.

A Indústria Alimentar procura constantemente a inovação pelo desenvolvimento de produtos que promovam o bem-estar e a saúde dos consumidores (Yoon *et al.*, 2004). O consumidor procura ainda novos sabores, aromas e produtos práticos e de fácil consumo. A juntar a estes factos, há uma preocupação pela ingestão excessiva de açúcares que não é, de todo, recomendada por profissionais de saúde. Deste modo, os sumos de fruta são problemáticos, pois o seu consumo constitui-se como um dos possíveis fatores que estão na base da obesidade, embora esta teoria ainda não esteja totalmente comprovada (Ludwig *et al.*, 2001; Schulze *et al.*, 2004). Assim, é do interesse da Indústria reduzir as concentrações em açúcares fermentescíveis nas bebidas de fruta (Rodbotten *et al.*, 2008). Não obstante os resultados de um estudo feito por Rodbotten *et al.* (2008), os consumidores em geral preferem um sumo mais doce, em detrimento de um menos doce, mas a consciência crescente dos problemas inerentes ao consumo excessivo de açúcares facilmente assimiláveis, pode conduzir a uma procura de novos tipos de sumo de fruta.

Neste contexto, a fermentação de polpas de fruta com vista à redução de açúcares, um dos principais objetivos do trabalho, revela-se extremamente relevante e atual. Esta tendência tem vindo a favorecer o aparecimento de produtos alimentares enriquecidos em probióticos, prebióticos, vitaminas e minerais, entre outros (Betoret *et al.*, 2003).

A fermentação proporciona alterações organolépticas agradáveis, melhora o valor nutritivo e ajuda à conservação do próprio produto (Blandino *et al.*, 2003; Leroy *et al.*, 2004), juntando assim os benefícios de um produto fermentado aos benefícios da ingestão dos frutos (Ankolekar *et al.*, 2012).

A fermentação através de bactérias lácticas, tem sido utilizada para melhorar o valor nutritivo de alimentos considerados pobres nutricionalmente (Nout, 2009), bem como promover a sua conservação. Sabe-se hoje que, ao introduzir culturas de estirpes que produzam compostos anti-microbianos, poderá ser proporcionado um maior tempo de vida útil ao alimento (Hutkins, 2006).

As alterações que ocorrem nos alimentos fermentados são induzidas por microrganismos que, estando presentes, naturalmente ou introduzidos na matriz alimentar, conduzem à hidrólise de glúcidos e proteínas em elementos mais facilmente digeríveis (Romano *et al.*, 2006).

A fermentação láctica é um processo bastante utilizado em bebidas que tenham como base o leite (Owczarek *et al.*, 2012). No entanto, existem pessoas intolerantes à lactose, açúcar presente naturalmente no leite, devido à incapacidade de produção da enzima β – galactosidase que degrada este dissacárido nos monossacáridos, glucose e galactose (Hutkins, 2006).

Os produtos lácteos também não são adequados a indivíduos intolerantes à proteína animal nem a vegetarianos, o que faz com que seja cada vez mais importante encontrar novas bebidas que preencham estas necessidades específicas e as necessidades dos consumidores que, simplesmente, estão mais preocupados com a saúde em geral e preferem um alimento, de alguma forma, mais saudável (Baki *et al.*, 2011).

A utilização de bactérias lácticas noutras bases não lácticas surge assim como um foco de interesse crescente, pois estas bactérias possuem uma influência benéfica no organismo, sendo conhecidas pelos seus efeitos conservantes e desintoxicantes (Chelule *et al.*, 2010; Owczarek *et al.*, 2012).

Este trabalho foi efetuado no âmbito de um projeto empresarial em parceria com o Instituto Superior de Agronomia em que as partes assumiram uma obrigação de confidencialidade incidente sobre toda a informação de carácter técnico, científico, comercial e de organização interna, independentemente da forma de divulgação e do suporte da dita informação a que cada uma delas aceder.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias para produção de bebidas fermentadas não alcoólicas ou pouco alcoólicas, com baixo ou nulo teor de açúcares a partir de polpas de pêssigo, maçã e pera.

1.2. Polpa de fruta

1.2.1. Produção de polpa de fruta

Dada a sazonalidade da fruta, esta é processada na respetiva campanha de produção. Uma das formas mais usuais é a produção de polpa, que é um preparado de fruta que constitui matéria-prima para vários produtos tal como sumos, entre outros. Numa unidade industrial a fruta passa por diversas fases até ser obtida a polpa (Fig. 1).

Após receção e armazenagem, escolha e lavagem, a fruta é descaroçada e triturada. A polpa resultante do processo de trituração é normalmente branqueada, com o objetivo de desnaturação enzimática através do uso de calor durante curtos períodos de tempo. O processo é efetuado por forma a diminuir o volume de subprodutos, verificando-se recuperação de polpa nas operações unitárias de descaroçamento ou despulpagem.

Após o branqueamento, há uma refinação, que vai homogeneizar a polpa e um desarejamento, para evitar oxidações.

A operação unitária que se segue é a pasteurização, que vai conferir estabilidade microbiológica à polpa, seguida de arrefecimento rápido.

Por último, faz-se um enchimento asséptico por forma a evitar contaminações do produto.

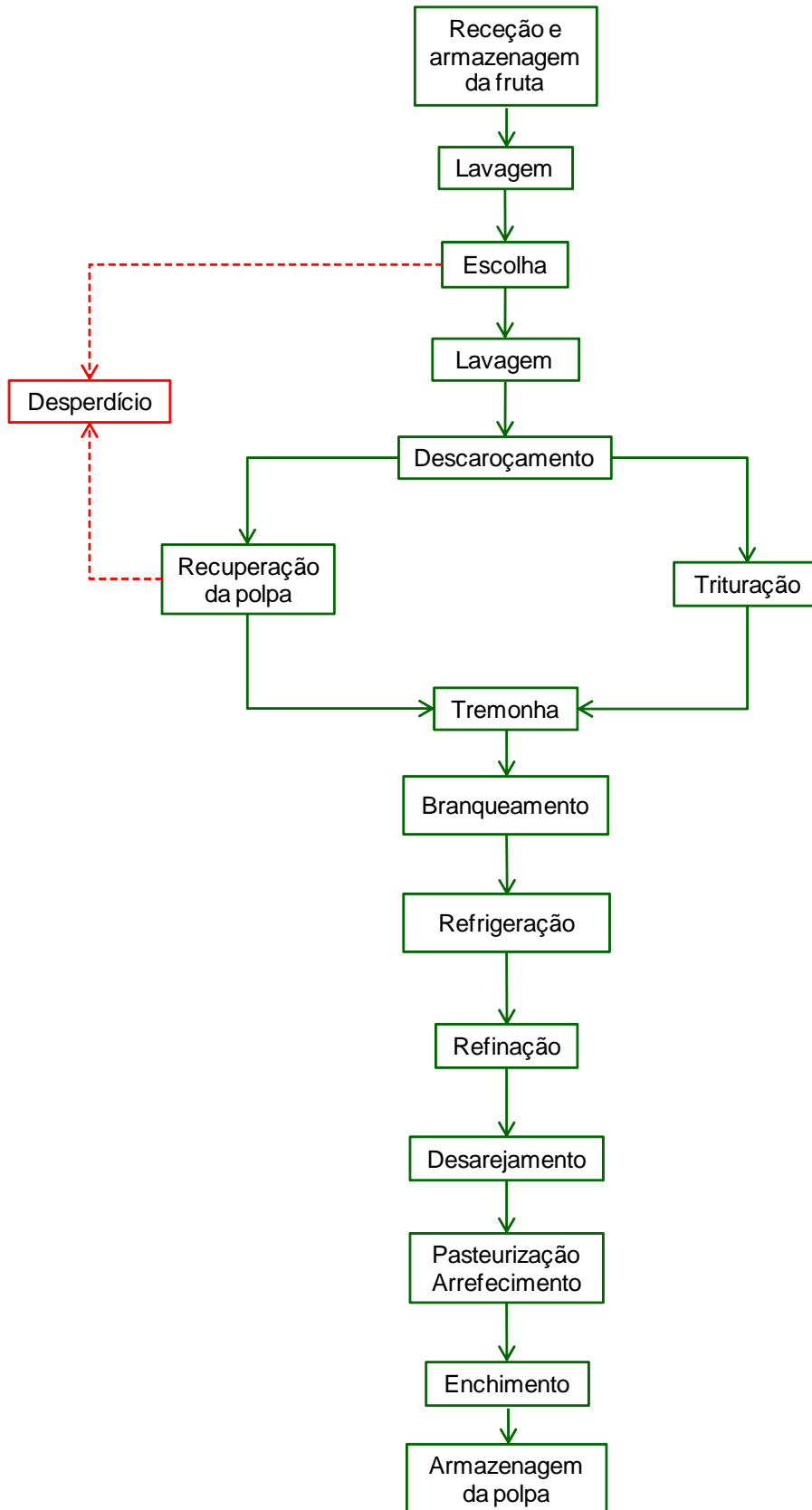


Figura 1 - Diagrama geral de produção de polpa de fruta

1.2.2. Composição da matéria-prima

Como o presente estudo incide sobre maçã, pera e pêssigo, apresenta-se, de forma resumida, a composição destas três frutas em natureza.

O principal componente dos frutos é a água, que se encontra presente numa percentagem elevada, seguida dos açúcares e restantes contituíntes em percentagens menores (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição média de maçã, pera e pêssigo (valores por 100 g de parte edível)

Fruto	Energia		Macroconstituintes							Vitaminas										
	Kcal	Kj	Água (g)	Proteína (g)	Total HC disponíveis (g)	Total HC expesso em monossacáridos (g)	Mono + dissacáridos (g)	Ácidos orgânicos (g)	Fibra alimentar (g)	A total (equivalentes retinol) (µg)	Caroteno (µg)	α-Tocoferol (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Equivalentes de niacina (mg)	Niacina (mg)	Triptofano/60 (mg)	B6 (mg)	C (mg)	Folatos (µg)
Maçã	54	226	83,8	0,2	12,7	12,8	12,7	0,2	1,9	4	25	0,27	0,02	0,03	0,2	0,1	0,1	0,04	5	5
Pera	41	170	85,1	0,3	9,4	9,5	9,4	0,1	2,2	2	9	0,5	0,02	0,02	0,2	0,2	0	0,02	3	2
Pêssego	38	159	87,5	0,6	8,1	8,4	8,1	0,5	2,3	67	400	0,97	0,03	0,03	1,1	1	0,1	0,02	4	3

HC – Hidratos de Carbono

(Adaptado de: Tabela de composição de alimentos, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2007))

Tal como se pode verificar no quadro 1, a maçã, a pera e o pêssigo são fontes de vitaminas, fibras e outros constituintes que não estando contemplados neste quadro também estão presentes, como por exemplo, sais minerais (como potássio, cálcio, fósforo e magnésio).

Os compostos fenólicos também fazem parte dos constituintes da fruta, tal como das hortícolas. São metabolitos secundários das plantas, que normalmente estão associados à defesa das radiações ultravioletas ou agressões por microrganismos patogénicos, e caracterizam-se pela presença de, pelo menos, um grupo fenólico, ou seja, um grupo hidroxilo associado a um anel aromático. Podem ser classificados em diferentes grupos, em função do número de anéis fenólicos que possuam e dos elementos estruturais que se ligam a esses anéis e entre eles. As distinções são, assim, feitas entre flavonóides e não flavonóides. Entre os flavonóides estão as antocianinas, isoflavonas, flavanonas, entre outros, e do grupo dos não flavonóides fazem parte os ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico ou hidroxicinâmico), estilbenos e lignanas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, estes têm sido alvo de interesse de investigadores devido às suas propriedades antioxidantes que se associam à prevenção de múltiplas doenças associadas ao *stress* oxidativo, como doenças cardiovasculares e cancro. Os compostos fenólicos influenciam, também, propriedades organolépticas como sabor, aroma, adstringência e cor (Lea e Arnold, 1978).

Contudo, sabe-se que os benefícios que os compostos fenólicos podem trazer, dependem da quantidade que é ingerida e da sua biodisponibilidade (Manach *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2007).

Dos frutos que neste trabalho são estudados, a pera pertence ao grupo de frutos com menor capacidade antioxidante (Prior e Cao, 2000), no entanto é sugerido que a casca desta é uma excelente fonte antioxidante (Sánchez *et al.*, 2003).

Para bactérias lácticas, tal como para leveduras, os açúcares são a principal fonte de carbono e energia pelo que é importante a quantidade de açúcares fermentescíveis presentes nos alimentos, neste caso nos frutos (Calderon Santoyo *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2006).

No quadro 2, é apresentada a composição em açúcares fermentescíveis de cada fruto utilizado no presente trabalho.

Quadro 2 - Conteúdo de açúcares fermentescíveis nos frutos (% de parte edível)

Fruto	Glucose	Frutose	Sacarose	TOTAL
Maçã	1,8	5,7	2,4	9,9
Pêssego	1,0	1,2	5,7	7,9
Pera	1,8	6,7	1,8	10,3

(Adaptado de: Belitz *et al.*, 2009)

De salientar que dos frutos em estudo, o pêssego é o que apresenta menor percentagem de açúcares totais, embora o teor em sacarose seja o mais elevado.

1.3. Bebidas fermentadas, processo fermentativo e parâmetros críticos

Já foram anteriormente enumeradas as vantagens do desenvolvimento de bebidas fermentadas e, por conseguinte, é extremamente importante compreender os processos fermentativos envolvidos.

São inúmeras as técnicas de fermentação, os microrganismos e os substratos de fermentação existentes (Blandino *et al.*, 2003). Contudo, embora haja esta diversificação, os processos fermentativos que se podem considerar principais são quatro: fermentação acética, alcalina, alcoólica e láctica (Steinkraus, 2002). Na fermentação acética, o álcool é convertido em ácido acético, na presença de excesso de oxigénio, através de espécies de *Acetobacter* e na fermentação alcalina, o processo biológico provoca um aumento de pH, sendo que a maioria das mudanças inclui a degradação de proteínas em aminoácidos livres. A fermentação láctica e alcoólica serão as estudadas no presente trabalho.

Para o desenvolvimento de um processo fermentativo adequado, existem alguns parâmetros críticos que têm de ser criteriosamente avaliados, tais como, o tipo de matriz alimentar, as culturas *starter* e as condições da fermentação.

Ao longo dos anos, a comunidade científica tem estudado vários produtos que são utilizados como base para alimentos fermentados. No quadro 3, é possível visualizar três exemplos de sumos de hortícolas fermentados e as respetivas culturas *starters*.

Quadro 3 – Sumos fermentados com diferentes matrizes e respetivas culturas

Fruto/Hortícola	Cultura <i>starter</i>	Referência bibliográfica
Tomate	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA39; <i>Lactobacillus casei</i> A4; <i>Lactobacillus delbruecki</i> D7; BC C3	Yoon <i>et al.</i> , 2004
Cenoura	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12; <i>Bifidobacterium bifidum</i> B7.1 e B3.2	Kun <i>et al.</i> , 2008
Beterraba	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDO1748	Rakin <i>et al.</i> , 2007

1.3.1. Fermentação láctica

A fermentação láctica ocorre através de bactérias lácticas, que representam uma pequena parte da microbiota autóctone de frutos e hortícolas crus, sendo que a diversidade desta microbiota, depende da própria matriz (Buckenhüskes, 1997; Di Cagno *et al.*, 2012) (Quadro 4).

Quadro 4 – Exemplos de espécies de bactérias lácticas, que foram isoladas de frutas e legumes crus ou fermentados espontaneamente

Espécie de bactéria láctica	Fonte	Referência bibliográfica
<i>BC</i>	Tomate, cenoura, pepino, ananás, couve, kiwi, papaia.	Plenghvidhya <i>et al.</i> , 2007; Di Cagno <i>et al.</i> , 2008, 2010, 2011
<i>BH</i>	Papaia, beringela, pepino, alcaparra.	Sánchez <i>et al.</i> , 2000; Di Cagno <i>et al.</i> , 2011; Pulido <i>et al.</i> , 2012
<i>BA</i>	Alcaparra, couve, tomate	Plenghvidhya <i>et al.</i> , 2007; Di Cagno <i>et al.</i> , 2008; Pulido <i>et al.</i> , 2012

(Adaptado de: Di Cagno *et al.*, 2012)

A microbiota difere conforme as condições de crescimento das plantas, sujeitas a flutuações das condições físicas e de nutrição, além da influência das condições em que os frutos/hortícolas são colhidos e das temperaturas a que são submetidos. Pode, assim, concluir-se que a microbiota é diferente de espécie para espécie, mas que cada espécie de planta proporciona uma microbiota constante (Yang *et al.*, 2000; Lindow *et al.*, 2003).

Em muitos casos, são recomendadas as culturas autóctones de cada matriz como *starters*, desde que estas culturas possam assegurar o aumento do tempo útil do alimento, a melhoria do seu perfil nutricional e das suas propriedades organoléticas, pois nem todas podem garantir a mesma performance durante o processo fermentativo (Di Cagno *et al.*, 2008; 2010; 2011).

Noutros casos, recorre-se ao uso de *starters* alóctones, uma vez que a composição da microbiota e o seu desenvolvimento são fatores cruciais que influenciam a fermentação e a qualidade do produto final (Rodríguez *et al.*, 2009).

De acordo com as suas características fermentativas, as bactérias lácticas dividem-se em espécies homofermentativas ou heterofermentativas, a última das quais pode, em adição ao ácido láctico, também produzir dióxido de carbono, etanol ou ácido acético (Barinov *et al.*, 2011).

Na figura 2, é possível visualizar as duas vias fermentativas gerais (homoláctica e heteroláctica), consoante se trate das espécies homo ou heterofermentativas.

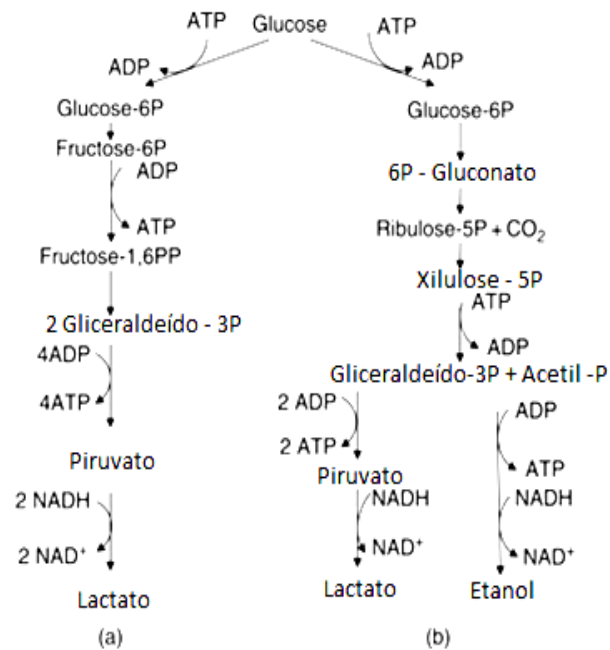


Figura 2 – Representação esquemática de uma fermentação geral homoláctica (a) e heteroláctica (b) (Adaptado de Ciani *et al.*, 2008)

Além de ácidos orgânicos, as bactérias lácticas podem produzir muitos compostos inibitórios com atividade antimicrobiana que atuam sobre outros microrganismos: bacteriocinas, ácido fenilático, péptidos e ácidos gordos são os que podem surgir em maior quantidade e podem ser interessantes relativamente à bioconservação (Corsetti *et al.*, 2012).

1.3.2. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual os açúcares (glucose e frutose) são convertidos em etanol e dióxido de carbono e ocorre, por exemplo, em vinho e cerveja (Figura 3).

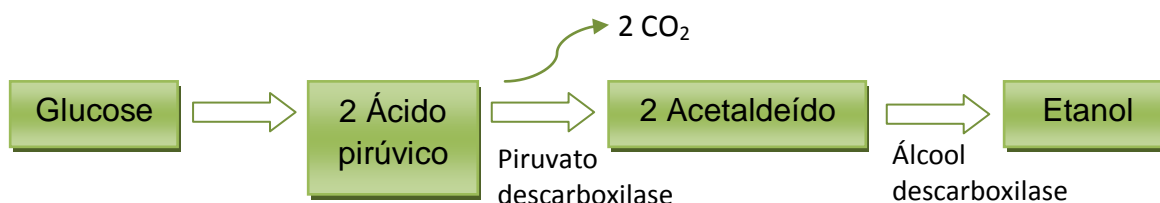


Figura 3 – Fermentação alcoólica (Adaptado de: Glazer et al, 2007)

As leveduras consomem os açúcares com o intuito de obter energia para manter as suas funções vitais, no crescimento e multiplicação, e tanto o etanol como o dióxido de carbono são subprodutos do metabolismo celular (Glazer *et al.*, 2007).

As características organolépticas que resultam da fermentação alcoólica, como aroma e sabor, são extremamente importantes uma vez que determinam a qualidade da bebida fermentada, contribuindo para o sabor característico desta, ou resultando em propriedades sensoriais negativas, o que não é, evidentemente, favorável. Para estas características contribuem, metabólitos secundários que são produzidos na fermentação e que serão especificados adiante (Buratti *et al.*, 2011).

1.4. Bactérias lácticas e leveduras

1.4.1. Bactérias lácticas

Os géneros de bactérias lácticas incluem *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (Mayo *et al.*, 2010). As bactérias do género *Lactobacillus* podem ser encontradas em diferentes ambientes, variando desde plantas e alimentos, abrangendo leite e produtos lácteos, vegetais, cereais, carne e produtos cárneos, até superfícies mucosas do corpo

humano, incluindo o trato gastrointestinal. Em conjunto com *Lactococcus* spp., são habitualmente utilizadas em diversos produtos fermentados tradicionais, tendo como objetivo a preservação dos alimentos, bem como o desenvolvimento do sabor e da textura da matriz alimentar. Estas bactérias representam uma parte importante nas bebidas fermentadas que são emergentes e que possuem algum tipo de benefício para a saúde dos consumidores (Mayo *et al.*, 2010; Barinov *et al.*, 2011; Bjorkroth *et al.*, 2011).

O género *Lactobacillus* é constituído por bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, com células de forma cilíndrica, pertencendo a um grupo heterogéneo de bactérias lácticas. São catalases negativas, estritamente fermentativas e são caracterizadas pela formação de ácido láctico como único, ou principal, produto final do metabolismo de glúcidos. O género *Sporolactobacillus* forma esporos (Mayo, *et al.*, 2010; Barinov, *et al.*, 2011). A principal fonte de energia para os microrganismos aeróbios é a respiração, durante a qual os eletrões, que são gerados durante o metabolismo do carbono, como por exemplo o ciclo do ácido cítrico, são transportados pela membrana citoplasmática através de uma série de proteínas transportadoras de eletrões. Estas estão dispostas de maneira a que o fluxo de eletrões seja no sentido de aumentar o potencial de oxidação-redução da célula.

1.4.2. Leveduras

As leveduras são utilizadas há milhares de anos, em processos que alteram a matriz original do alimento a nível organoléptico, físico e nutricional, produzindo vários produtos metabólicos. Estes produtos incluem enzimas, vitaminas, carotenóides, lípidos, glicolípidos, ácido cítrico, etanol e dióxido de carbono (Demain *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2006). São microrganismos cujo habitat natural é a superfície de frutas, plantas e flores. A maioria das leveduras é aeróbia, embora muitas sejam anaeróbias facultativas. As leveduras requerem apenas uma fonte de carbono, minerais, uma fonte de azoto e vitaminas. Os requisitos vitamínicos essenciais são biotina (vitamina H ou B7), ácido pantoténico (vitamina B5) e tiamina (vitamina B1) (Romano *et al.*, 2006). Como o oxigénio é necessário para as reações de desnaturação envolvidas na síntese dos lípidos, é necessário fornecer quantidades diminutas de oxigénio, mesmo quando a fermentação ocorre em condições anaeróbias.

Relativamente ao processo metabólico, as leveduras produzem uma enzima invertase, no interior do citoplasma, que hidrolisa a sacarose (glucose- α -1,4-frutose) em glucose e frutose, que são posteriormente fermentados pelas células das leveduras. As leveduras relacionadas podem metabolizar muitos outros açúcares como galactose, manose, maltose (glucose- α -1,4-glucose) e maltotriose. Os dissacáridos são hidrolisados e os monossacáridos transportados para o interior das células e posteriormente hidrolisados por enzimas intracelulares, sendo que a glucose é o substrato preferencial. Se está presente a glucose, as permeases para outros açúcares, como maltose ou maltotriose, não são induzidas até a glucose desaparecer. Como resultado, estas substâncias são fermentadas sequencialmente, em vez de simultaneamente. Os dissacáridos e os trissacáridos são hidrolisados pela enzima α -glucosidase (Glazer *et al.*, 2007).

As vias metabólicas do carbono são praticamente idênticas em diferentes espécies de leveduras o que leva a supor que estes microrganismos constituem um grupo metabólico homogéneo (Rodrigues *et al.*, 2006). As leveduras podem ser classificadas quanto ao tipo de produção de energia, utilizando a respiração ou a fermentação. Relativamente ao metabolismo dos açúcares, podem ser classificadas como não fermentativas, fermentativas facultativas e fermentativas obrigatórias.

As primeiras têm um metabolismo respiratório exclusivo e não são aptas a desenvolver fermentação alcoólica a partir de glucose, enquanto por outro lado as leveduras fermentativas obrigatórias apenas são capazes de metabolizar glucose através de fermentação alcoólica (Rodrigues *et al.*, 2006).

Mas a maioria das espécies de leveduras identificadas são fermentativas facultativas dependendo das condições de crescimento, do meio, da concentração de açúcares e/ou da disponibilidade de oxigénio.

Em certas condições, como na presença de determinados níveis de açúcares como a glucose, é induzido um metabolismo fermentativo em que a respiração é inibida e o piruvato é metabolizado, via acetaldeído, a etanol, sendo este efeito denominado de *Crabtree* (Rodrigues *et al.*, 2006; Díaz-Ruiz *et al.*, 2008).

Este efeito poderá ser devido ao efeito repressivo da glucose sobre a atividade das enzimas respiratórias ou, também, pela inibição da expressão génica de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato, que não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, seja transformada em etanol através da fermentação (Matos *et al.*, 2009).

Mas segundo Díaz-Ruiz *et al.* (2008), pode ocorrer uma competição por ADP livre e fosfato inorgânico entre mitocôndrias e enzimas glicolíticas. De facto, a respiração é

diminuída pelo consumo de ADP e, após adição de glucose, os níveis de ADP permanecem constantes ou mesmo aumentam.

Quando a glucose está ausente do meio de crescimento de leveduras, outras fontes de carbono podem ser utilizadas sendo que a galactose é um exemplo disto, além das hexoses, polímeros, pentoses, álcoois, ácidos gordos e ácidos orgânicos (Feldmann, 2005).

Relativamente a compostos bioativos que são sintetizados pelas leveduras, incluem antioxidantes e compostos aromáticos. Como antioxidantes, estão presentes a glutatona, hidroximetil e hidroxietil furanona, α -tocoferóis e outras formas de tocoferóis, riboflavina, resveratrol, entre outros. No que diz respeito a compostos aromáticos, estão presentes ácidos gordos, ésteres, compostos fenólicos, enxofre, lactonas, entre outros (Abbas, 2006).

Um outro ponto importante é a coloração do alimento. As leveduras, sendo reconhecidas como parte da microbiota de muitos alimentos, são consideradas seguras para ingestão e por esse motivo os carotenóides produzidos por elas têm sido utilizadas como fonte de obtenção de alguns corantes utilizados em alimentos, como β -caroteno, licopeno, luteína, toruleno, astaxantina e zeaxantina.

1.4.3. Interação entre bactérias lácticas e leveduras

A interação entre microrganismos pode ocorrer quando, no seu habitat, o domínio de uma estirpe é invadido, existindo dois tipos de interação. A interação direta é referente a competição, comensalismo, mutualismo, antagonismo e neutralismo, enquanto que a interação indireta é referente a predação e parasitismo. Contudo, no contexto da fermentação, a interação entre estirpes confere qualidades nutricionais e organolépticas, como resultado da atividade metabólica das diferentes estirpes existentes no meio (Viljoen, 2006).

Destas interações também resultam efeitos antimicrobianos que surgem devido a ácidos voláteis, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e a outros substratos que são derivados destes.

A relação entre bactérias lácticas-leveduras é importante na degradação da glucose, malato e citrato, que são as maiores fontes de carbono em frutos e sumos de frutos, durante a fermentação sob condições ácidas, sendo que neste caso a microbiota segue os princípios da fermentação vínica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Polpas de fruta

Foram utilizadas neste trabalho polpas de pera, pêsego e maçã (Figura 5) fornecidas pela empresa.

Não obstante as polpas terem sido pasteurizadas e caracterizadas previamente na empresa, em termos de pH e °Brix, atendendo a que as primeiras polpas utilizadas se encontravam contaminadas com leveduras (existência de colónias em 100 µL de polpa ao fim de 24 horas), todas as polpas foram pasteurizadas em banho de água durante 15 minutos antes de qualquer utilização. Os valores de pH e °Brix foram novamente determinados.



Figura 4 – Polpa de pera, pêsego e maçã, respetivamente (Fotografias por Viviana Monteiro)

2.2. Estirpes utilizadas

As estirpes utilizadas nos ensaios estavam disponíveis na CBISA - Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia e na Coleção de Leveduras do Instituto Superior de Agronomia.

As bactérias e as leveduras encontravam-se conservadas a -75 °C em meio de cultura MRS *Broth* e GYP, respetivamente, e com 15% (v/v) de glicerol. As estirpes utilizadas estão descritas no quadro 5.

Quadro 5 - Estirpes microbianas utilizadas

Referência	Espécie
CBISA 1;2;3	<i>BA</i>
CBISA 4	<i>BB</i>
CBISA 5;6	<i>BC</i>
CBISA 7	<i>BD</i>
CBISA 8	<i>BE</i>
CBISA 9	<i>BF</i>
CBISA 10	<i>BG</i>
CBISA 11	<i>BH</i>
CBISA 12	<i>BI</i>
CBISA 13	<i>BJ</i>
CBISA 14	<i>BK</i>
ISA 15	<i>LA</i>
ISA 16	<i>LB</i>
ISA 17	<i>LC</i>
ISA 18	<i>LD</i>

CBISA - Coleção Bactérias Instituto Superior Agronomia; **ISA** - Instituto Superior Agronomia

A segurança dos alimentos é uma das principais preocupações da Indústria Alimentar, sendo necessário garantir a inocuidade dos alimentos. Por este motivo, anualmente é atualizada uma lista, emitida pela EFSA (*European Food Safety Authority*) onde estão indicados os microrganismos que podem ser incluídos em alimentação de forma segura (*European Food Safety Authority, 2012*). De acordo com esta lista conclui-se que todos os microrganismos que foram utilizados nos ensaios, no presente trabalho, eram considerados seguros.

2.3. Meios de cultura e soluções utilizadas

2.3.1. MRS *Broth*

A composição do meio de cultura MRS *Broth* é apresentada no quadro 6.

Quadro 6 – Composição do meio de cultura MRS *Broth*

Reagente	g/l
Glucose	20
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Polipeptona	10
<i>Tween</i> 80	1,02
Fosfato de potássio	2
Acetato de sódio	2
Citrato de amónio	2
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de manganês	0,05

Após autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos, os tubos de ensaio contendo MRS *Broth* foram fervidos, durante cerca de 10 minutos, para remover o oxigénio do meio e deste modo favorecer o crescimento das estirpes de bactérias lácticas. O meio MRS *Broth* apresenta um valor de pH aproximado a 6,4. No caso de utilização em placas do meio MRS, é necessário acrescentar ao meio agar-agar na proporção de 20 g/L.

2.3.2. GYP (Glucose – Yeast – Peptone)

A composição do meio GYP é apresentada no quadro 7.

Quadro 7 - Composição do meio de cultura GYP

Reagente	g/l
Extrato de levedura	5
Peptona	5
Glucose	20

O meio foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C. O pH do meio GYP é de aproximadamente 6,5.

No caso de utilização em placas do meio GYP, é necessário acrescentar ao meio agar-agar na proporção de 20 g/L.

Para se proceder às contagens a partir de inóculos mistos de bactérias lácticas e leveduras em placas de GYP foi necessário acrescentar ampicilina ao meio, na concentração 50 µg/mL, de modo a inibir as bactérias.

2.3.3. Plate Count Agar (PCA)

A composição do meio PCA é apresentada no quadro 8.

Quadro 8 - Composição do meio de cultura PCA

Reagente	g/l
Peptona de caseína	5,0
Extrato de levedura	2,5
Glucose D (+)	1,0
Agar – Agar	14,0

O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

2.3.4. Solução de Ringer

A solução de Ringer que se utilizou é comercializada sob a forma de pastilhas (Oxoid), dissolvendo-se uma pastilha em 500 mL de água desionizada. Após solubilização, a solução foi autoclavada a 121 °C durante 15 minutos. A sua composição encontra-se descrita no quadro 9.

Quadro 9 - Composição da solução de Ringer

Reagente	g/l
Cloreto de sódio	2,25
Cloreto de potássio	0,105
Cloreto de cálcio hexahidratado	0,12
Bicarbonato de sódio	0,05

2.4. Manutenção e crescimento de estirpes

2.4.1. Coleção de trabalho

A partir das estirpes que se encontravam em *stock* a -75 °C, inocularam-se placas de MRS no caso das bactérias lácticas, e de GYP no caso das leveduras e incubaram-se a 30 °C e a 25 °C, respetivamente, durante 48 horas. Desta forma obtiveram-se colónias isoladas de bactérias, que posteriormente foram inoculadas por picada em tubos de MRS semi-sólido (0,7% de agar) com 1g/l de carbonato de cálcio. Colónias isoladas de leveduras foram riscadas em cunha de GYP. Incubou-se durante 24 horas a 30 °C e a 25 °C, respetivamente, tendo desta forma sido obtida a coleção de trabalho, que se manteve conservada em frigorífico a 4 °C.

2.4.2. Inóculos

Para a preparação dos inóculos, a partir de colónias isoladas em placas de meio apropriado, inocularam-se tubos com 10 mL de MRS *Broth*, no caso das bactérias, e com 10 mL de GYP no caso das leveduras, levando a incubar respetivamente a 30 °C e a 25 °C durante 24 horas. Nos ensaios de adaptação dos inóculos a valores de pH baixo, o meio MRS *Broth* foi acidificado com ácido málico 1 M, no caso da polpa de maçã e com ácido cítrico 1 M no caso da polpa de pêssigo.

2.5. Enumeração de microrganismos

2.5.1. Microrganismos totais a 30 °C

Para se proceder à contagem de microrganismos totais a 30 °C utilizou-se a norma ISO 4833:2003: inoculou-se por incorporação, respetivamente 1 mL de cada polpa em placas de meio PCA, incubando de seguida a 30 °C por 72 horas. Após este período procedeu-se à contagem do número de colónias que se desenvolveram e calcularam-se as unidades formadoras de colónias por mililitro de polpa (UFC/mL).

2.5.2. Bolores e leveduras

Para proceder a esta contagem utilizou-se a norma NP 3277-1/1987. Inocularam-se 100 μ L de polpa por espalhamento em placa de GYP, seguido de incubação a 25 ± 1 °C durante 120 horas, confirmando posteriormente os valores de contagem ao fim desse tempo.

2.5.3. Bactérias lácticas e leveduras em mono e em co-cultura

No caso das estirpes em mono-cultura, a contagem de bactérias lácticas e leveduras foi efetuada em placas com meio MRS e GYP, respetivamente. No caso das estirpes em co-cultura, para a contagem do número de células totais foram utilizadas placas de GYP e para a contagem do número de células de leveduras em co-cultura com bactérias lácticas utilizou-se GYP adicionado de ampicilina. A ampicilina é um antibiótico que vai inibir o crescimento das bactérias e deste modo em co-cultura é possível fazer a contagem do número de células totais e a contagem de leveduras, sabendo assim por diferença o número de células viáveis de bactérias lácticas.

2.6. Determinações químicas

2.6.1. pH

A determinação dos valores de pH das polpas foi efetuada, à temperatura ambiente (≈ 20 °C). Para isso utilizou-se um potenciómetro (Radiometer Copenhagen, modelo PHM 92 LAB pH meter) após a sua calibração.

2.6.2. Teor de sólidos solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis foi determinado à temperatura ambiente, recorrendo a um refratómetro *Pocket Refractometer* (Atago, Japan). As amostras foram filtradas através de gaze, e as leituras foram feitas após calibração do aparelho com água desionizada.

2.6.3. Teor em etanol

O etanol presente nas amostras foi determinado recorrendo a dois métodos, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou método químico.

Em termos muito gerais, o HPLC é uma técnica cromatográfica em coluna cuja fase móvel (eluente) é um líquido, que no presente estudo foi água ultra pura com 2,5 mM de ácido sulfúrico, que circula através da coluna onde se encontra a fase estacionária (Figura 6). Deste modo, existe uma interação entre as moléculas, que desempenha um papel muito importante na retenção dos compostos pretendidos.

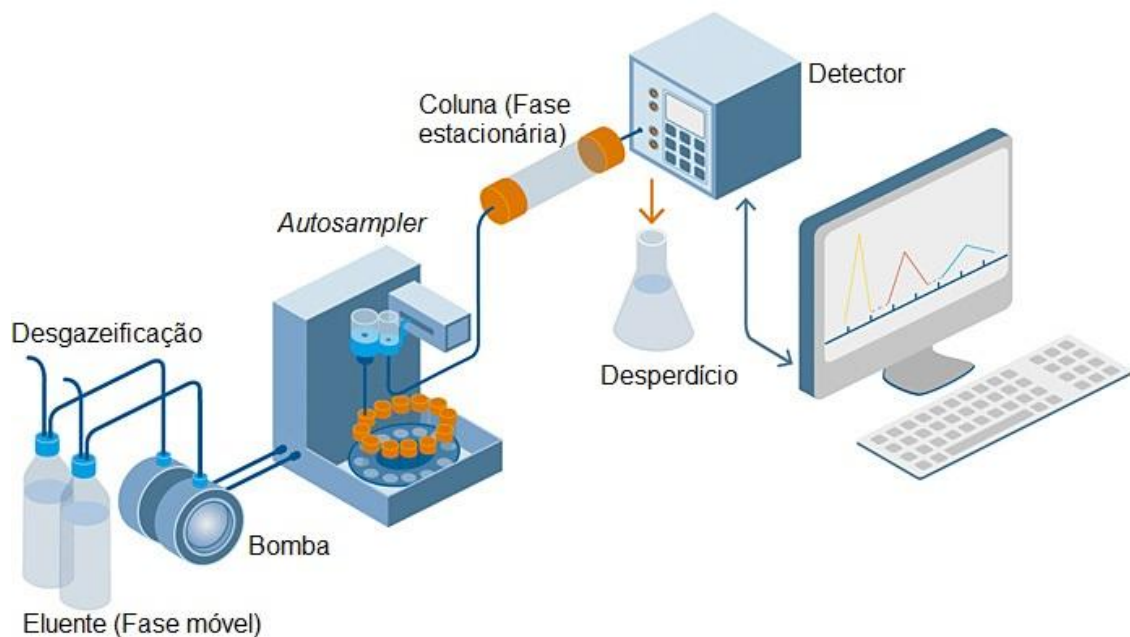


Figura 5 – Esquema geral de um sistema de HPLC (Adaptado de: Linde AG, 2008)

Para determinação da percentagem de etanol por HPLC foi feita uma curva de calibração (Figura 7) a partir de soluções de etanol comercial de 0,5% a 5% de etanol em eluente, com um fluxo de 0,6 mL/min.

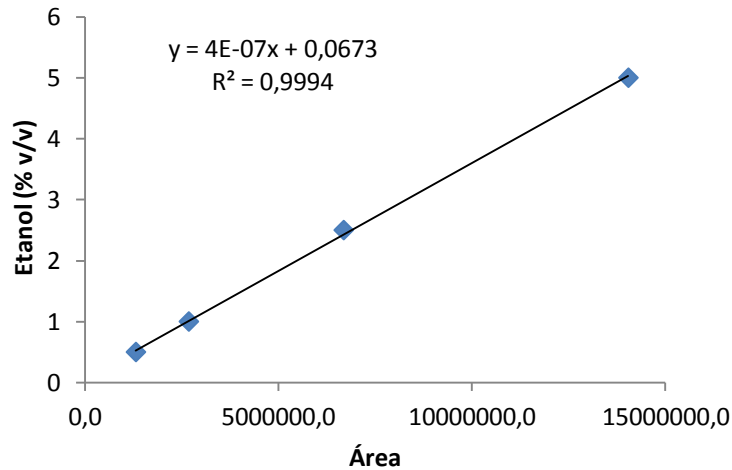


Figura 6 – Curva de calibração para o etanol

As amostras foram centrifugadas previamente a 13800 g (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 D), durante 15 minutos. Por se tratar de amostras muito polposas, realizou-se segunda centrifugação com o sobrenadante da primeira para retirar todos os sólidos em suspensão. Filtrou-se depois o sobrenadante com recurso a filtros de 0,5 μm de porosidade (Millipore) e transferiu-se para *vials* de HPLC devidamente identificados. As amostras foram injetadas em duplicado numa coluna (Schodex 1011) mantida a 60 °C, nas condições anteriormente descritas.

A separação dos constituintes foi conseguida por deteção por índice de refração (486 *Waters Corporation, Milford, MA*) tendo sido os resultados processados utilizando o *software* Empower Pro.

Pelo método químico (Recueil des méthodes internationales d'analyse des vines, 1962) destilou-se a polpa fermentada. Num balão, juntou-se uma solução de dicromato de potássio ($33,609 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$), ácido sulfúrico e o destilado. Esperou-se 30 minutos e titulou-se o excesso de dicromato com uma solução de sulfato ferroso amoniacal. Após titulação, determinou-se a percentagem de álcool (% v/v).

2.6.4. Teor de açúcares totais e redutores (Fenol-sulfúrico e DNS)

Para a determinação do teor de açúcares totais utilizou-se o método do fenol-sulfúrico. Este método permite dissociar os di ou polissacáridos em monossacáridos, pela ação do ácido sulfúrico concentrado.

Centrifugou-se 500 μL de polpa de pêssego, retiraram-se 200 μL e a estes juntaram-se 1800 μL de água ultra pura para atingir a concentração de açúcares entre 1 $\mu\text{g}/10$ μL .

Utilizou-se uma microplaca, onde em cada poço se adicionou 2 μL da amostra e 23 μL de água ultra pura. Em seguida, adicionou-se 25 μL de fenol a 40% (v/v), esperaram-se 5 minutos, e posteriormente adicionou-se 200 μL de ácido sulfúrico. A leitura das absorvâncias fez-se a 490 nm. Previamente foi feita uma curva de calibração com solução de glucose com uma concentração máxima de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). Baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico.

Adicionou-se 25 μL de amostra e 75 μL de água ultra pura. Após essa etapa, acrescentou-se 15 μL do DNS, agitou-se no vórtex e colocou-se num banho de água a 100 °C durante 10 minutos. Após este período arrefeceu-se rapidamente em gelo e leu-se a absorvância a 570 nm. Previamente foi feita uma curva de calibração com solução de glucose com uma concentração máxima de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.7. Análise sensorial

As polpas fermentadas foram selecionadas, ao longo do tempo, em termos de aroma e de sabor. De salientar que esta análise teve como objetivo ir eliminando as polpas fermentadas que apresentassem características organoléticas desagradáveis ou menos agradáveis. Não se recorreu a um painel de provadores pois essa prova será efetuada mais tarde, apenas em polpas selecionadas.

2.8. Ensaio de fermentação

O estudo para o desenvolvimento de polpas de fruta fermentada iniciou-se com a realização de vários ensaios prévios, com o objetivo de avaliar o comportamento das bactérias e/ou leveduras na fermentação das polpas inteiras e diluídas de 1:2.

2.8.1. Polpa de pera

Utilizou-se 150 mL de polpa de pera diluída em água na proporção de 1:2, com as concentrações aproximadas de bactérias lácticas $\approx 1,4 \times 10^7$ e leveduras $\approx 5 \times 10^4$ UFC/mL, para as estirpes selecionadas em co-cultura. Incubou-se a 25 °C em agitador orbital a 190 rpm.

Fizeram-se também ensaios com a polpa inteira, nas mesmas condições anteriores, a 25 °C em agitador orbital, com uma agitação de 190 rpm.

2.8.2. Polpa de maçã

2.8.2.1. Estirpes utilizadas em mono-cultura

A polpa de maçã diluída com água esterilizada numa proporção de 1:2, num total de 25 mL foi inoculada com 500 μ L de cultura de cada estirpe microbiana, no final da fase exponencial (bactérias lácticas $\approx 1,4 \times 10^7$ e leveduras $\approx 5 \times 10^4$ UFC/mL). Incubou-se a 28 °C em agitador orbital, com uma agitação de 120 rpm, durante 24 e 48 horas.

A temperatura de 28 °C foi utilizada nos primeiros ensaios. Em todos os outros, os ensaios foram realizados a uma temperatura de 25 °C.

2.8.2.2. Estirpes utilizadas em co-cultura

Testaram-se também combinações de estirpes de bactérias lácticas e leveduras em co-cultura.

Utilizou-se um volume final de inóculo de 500 μ L, na proporção de 100 μ L de cultura de levedura para 400 μ L de cultura de bactéria, ambas no final da fase exponencial de crescimento (bactérias lácticas $\approx 1,4 \times 10^7$ UFC/mL e leveduras $\approx 5 \times 10^4$ UFC/mL).

Fez-se um *scale up* utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de polpa de cada fruta, sendo que o volume de inóculo utilizado foi ajustado de modo a se atingirem as concentrações microbianas anteriores. Incubou-se a 25 °C em agitador orbital a 190 rpm.

Fizeram-se ensaios com a polpa inteira em condições idênticas às anteriores.

2.8.3. Polpa de pêssego

2.8.3.1. Estirpes utilizadas em mono-cultura

Utilizou-se a polpa de pêssego na proporção de 1:2 em 25 mL de volume total. Inoculou-se este volume com cada estirpe de modo a se obter uma concentração final de $1,4 \times 10^7$ UFC/mL de bactéria láctica. Incubou-se a 25 °C em agitador orbital, com uma agitação de 120 rpm, durante 24 e 48 horas.

2.8.3.2. Estirpes utilizadas em co-cultura

Utilizou-se um volume final de inóculo de 500 µL, na proporção de 100 µL de cultura de levedura para 400 µL de cultura de bactéria, ambas no final da fase exponencial de crescimento (bactérias lácticas $\approx 1,4 \times 10^7$ UFC/mL e leveduras $\approx 5 \times 10^4$ UFC/mL).

Fez-se um *scale up* utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de polpa de cada fruta, sendo que o volume de inóculo utilizado foi ajustado de modo a se atingirem as concentrações microbianas anteriores. Fizeram-se ensaios com a polpa inteira, nas mesmas condições anteriores, a 25 °C em agitador orbital, com uma agitação de 190 rpm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Fermentação de polpa de pera

De acordo com ensaios preliminares de fermentações que foram efetuados em polpa de pera com todas as estirpes inicialmente selecionadas e pertencentes à CBISA (Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia) e Coleção de Leveduras do Instituto Superior Agronomia, as estirpes que melhor se comportaram nesta polpa de acordo com o objetivo foram *BC* em co-cultura com *LB* e *BD* em co-cultura com *LB*.

A adequação dos meios de crescimento para as leveduras e para as bactérias lácticas foi feita, inicialmente, utilizando placas de meio MRS e GYP. Não tendo sido encontradas diferenças nas contagens de bactérias lácticas em meio MRS e em meio GYP, optou-se por utilizar os meios GYP e GYP+AMP no acompanhamento das populações microbianas, ao longo das fermentações. Foram recolhidas amostras dos fermentados em co-cultura ao longo do tempo. As leveduras foram enumeradas nas placas de GYP+AMP (Figura 8) e os microrganismos totais foram contados nas placas de GYP (Figura 9). Tal como está descrito nos materiais e métodos, as contagens de bactérias lácticas determinaram-se subtraindo os valores de leveduras aos de microrganismos totais.

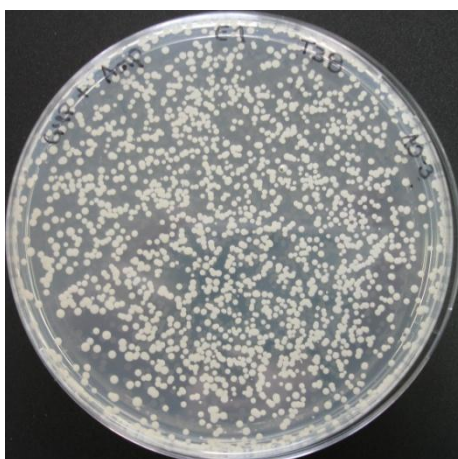


Figura 7 - Estirpe de levedura em GYP+AMP (Fotografia por Viviana Monteiro)

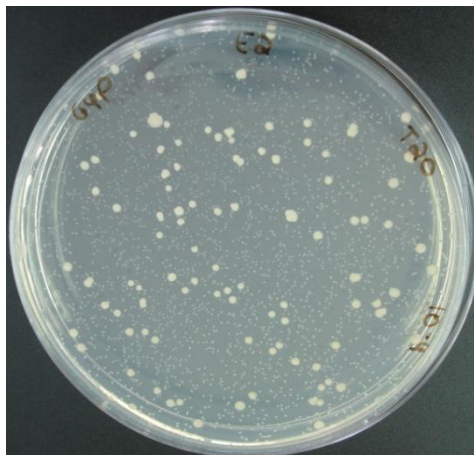


Figura 8 – Estripes de levedura e bactéria láctica em GYP (Fotografia por Viviana Monteiro)

Deste modo, na figura 10 pode-se observar o decorrer da fermentação de polpa de pera diluída a 1:2 com a proporção inicial de aproximadamente 8 Log UFC/mL (logaritmos de unidades formadoras de colônias por mililitro) de *BC* e 5,5 Log UFC/mL de *LB*.

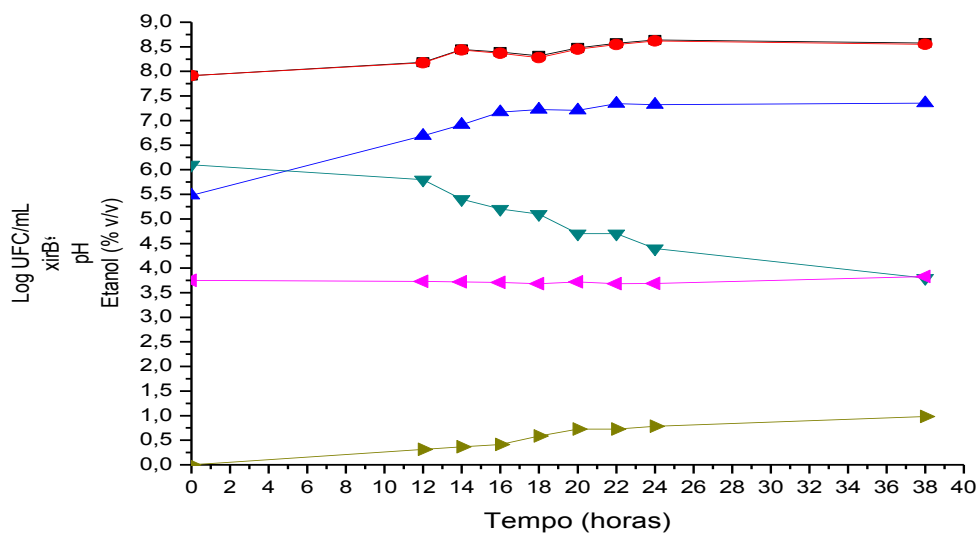


Figura 9 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB*.

BC (Log UFC/mL) (■); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL); (■), ° Brix (▼); pH (▲) e etanol (▲).

Durante a fermentação o °Brix desceu de 6,1 até 4,4 às 24 horas, e às 36 horas atingiu 3,8. Relativamente ao valor de pH, verificou-se que se manteve estável. O etanol ao fim de 38 horas atingiu cerca de 1% (v/v).

A fermentação iniciou-se com cerca de 8 Log UFC/mL de microrganismos totais, até 8,5 Log UFC/mL às 38 horas. A bactéria láctica (*BC*) representou a quase totalidade dos microrganismos presentes no meio.

No início da fermentação, *LB* apresentava um valor aproximado a 5,5 Log UFC/mL aumentando até 7,8 Log UFC/mL ao fim das 38 horas de fermentação.

Esta combinação conseguiu atingir o objetivo de baixar o °Brix e em termos sensoriais revelou-se agradável. Seguiu-se um ensaio de fermentação com a bactéria láctica *BD* e *LB*.

Na figura 11, observa-se a fermentação com concentrações iniciais de cerca de 8 Log UFC/mL de bactéria láctica e 5,5 Log UFC/mL de levedura.

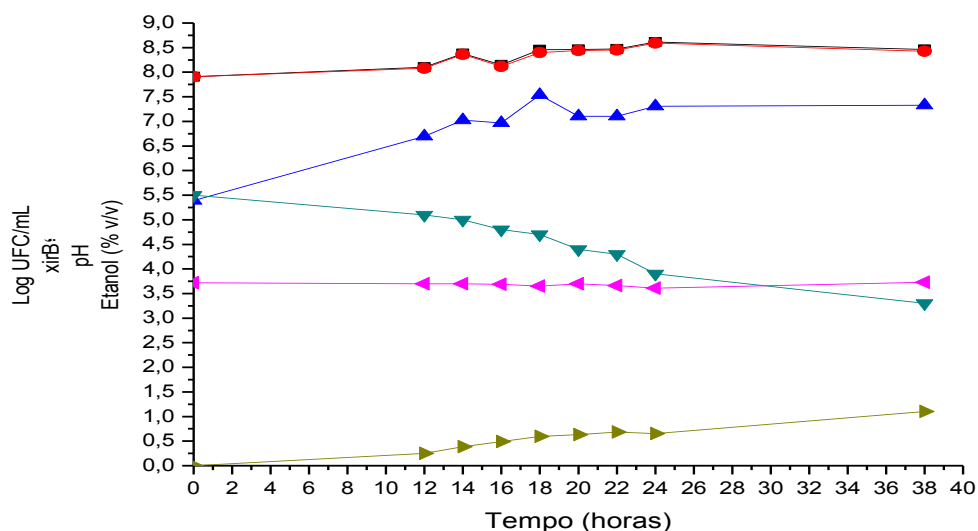


Figura 10 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de *BD* e *LB*.

L. buchneri (Log UFC/mL) (●); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL) (■), °Brix (▼); pH (◄) e etanol (►).

O °Brix desceu de 5,5 até 3,3 às 38 horas. Relativamente ao valor de pH, verificou-se que se manteve estável. O etanol no final do período de fermentação (38 horas) atingiu cerca de 1% (v/v).

Em termos organoléticos, esta combinação não se mostrou tão interessante como a anterior e por esse motivo, a levedura que prevaleceu para fermentação nesta polpa foi *BC*.

Seguidamente, procedeu-se à fermentação da polpa de pera inteira (Figura 12), utilizando aproximadamente 7,8 Log UFC/mL de bactéria láctica e 6 Log UFC/mL de levedura.

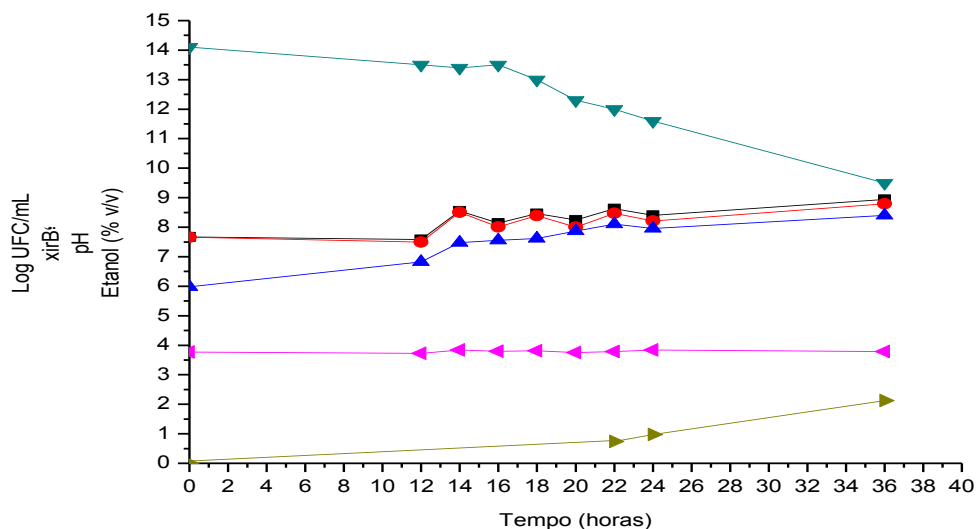


Figura 11 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pera inteira, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB*.

BC (Log UFC/mL) (●); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL); (■), °Brix (▼); pH (◀) e etanol (▶).

Durante a fermentação, os microrganismos totais foram aumentando até 8,9 UFC/mL às 36 horas.

Relativamente às leveduras aumentaram até 7,9 UFC/mL às 24 horas e até 8,4 UFC/mL às 36 horas.

O °Brix no início era 14,1, após 24 horas de fermentação estava em 11,6 e no final da fermentação às 36 horas era 9,5.

Concluiu-se que em polpa de pera, a fermentação ocorrida com a combinação de estirpes *BD* e *LB*, não tendo obtido valores de °Brix, pH e % etanol muito discrepantes relativamente à combinação da levedura com *BC*, não se revelou tão agradável sensorialmente.

Relativamente à melhor combinação, esta não chegou a atingir 50% de redução de °Brix e atingiu um valor cerca de 2% (v/v) de etanol.

3.2. Fermentação de polpa de maçã (Resultados preliminares)

3.2.1. Fermentação em mono-cultura

Na polpa de maçã testaram-se igualmente todas as estirpes de leveduras e de bactérias lácticas selecionadas inicialmente e pertencentes à CBISA (Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia) e Coleção de Leveduras do Instituto Superior Agronomia para verificar o comportamento das estirpes nesta polpa (Quadro 10).

Quadro 10 – Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2 (pH = 3,61 e °Brix = 6,1), fermentada por diferentes estirpes de leveduras e bactérias

Temperatura = 28 °C					
		24 h	48 h		
Referência CBISA/ ISA	Estirpe	Avaliação sensorial	Avaliação sensorial	pH	°Brix
15	LA	Cheiro a álcool	Cheiro muito intenso a álcool	3,34	3,7
17	LC	Cheiro intenso a álcool	Cheiro muito intenso a álcool	3,09	2,7
18	LD	Cheiro a maçã sem identidade, com álcool	Cheiro a ácido e a álcool	3,39	4,2
16	LB	Cheiro a álcool	Cheiro ácido e a álcool	3,52	3,9
1	BA	Cheiro a maçã sem identidade	Cheiro ligeiramente láctico, pouco intenso	3,42	5,4
8	BE	Cheiro pouco intenso, mas algo diferente do original	Cheiro pouco intenso, mas algo diferente do original	3,46	5,5
10	BG	Cheiro ácido intenso, não agradável	Cheiro ácido intenso, não agradável	3,30	4,9
7	BD	Cheiro alterado, algo ácido	Cheiro a maçã sem identidade, algo ácido	3,43	4,9
5	BC	Cheiro alterado, mas muito agradável	Cheiro alterado, mas muito agradável	3,45	5,5
4	BB	Cheiro a maçã sem identidade	Cheiro a maçã sem identidade	3,44	5,5
9	BF	Cheiro agradável	Cheiro agradável	3,40	5,2
13	BJ	Cheiro ligeiro a caramelo	Cheiro adocicado	3,89	5,1
11	BH	Cheiro pouco intenso, mas algo diferente do original	Agradável	3,47	5,1
6	BC	Cheiro alterado, mas muito agradável	Cheiro a maçã sem identidade, mas algo agradável	3,30	5,1
14	BK	Cheiro a maçã, mas ligeiramente láctico	Cheiro a maçã sem identidade	4,04	5,1
12	BI	Cheiro a maçã sem identidade	Cheiro a maçã sem identidade	3,82	5,5
2	BA	Cheiro a maçã sem identidade	Cheiro a maçã sem identidade	3,82	4,9
3	BA	Cheiro láctico agradável	Cheiro láctico agradável	3,68	5,5

Nesta polpa, atendendo às características organolépticas e ao valor final de °Brix, ao fim de 48 horas de fermentação eliminaram-se para ensaios futuros as estirpes: 1, 2, 4, 12 e 14. Na fermentação onde foram utilizadas as estirpes de leveduras obteve-se um produto com aroma pouco agradável e muito alcoólico, sendo que por essa razão se optou por não utilizar leveduras em mono-cultura.

Este ensaio decorreu a 28 °C numa tentativa de fornecer uma temperatura a que os microrganismos se desenvolvessem melhor, mas uma vez que não houve grandes diferenças optou-se pelos 25 °C, temperatura ambiente, mais vantajosa em termos energéticos.

Os resultados obtidos a 25 °C podem observar-se no quadro 11.

Quadro 11 - Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2 (pH = 4,37 e °Brix = 6,7), fermentada por diferentes estirpes de bactérias

Temperatura = 25 °C					
Referência CBISA	Estirpe	24 h	48 h	pH	°Brix
		Avaliação sensorial	Avaliação sensorial		
8	BE	Algum cheiro original com pico ácido	Ligeiro cheiro a “erva seca”	3,59	6,10
10	BG	Algum cheiro original com pico ácido	Cheiro agradável com pico ácido	3,72	6,70
7	BD	Algum cheiro original com pico ácido	Cheiro agradável com pico ácido	3,48	6,40
5	BC	Algum cheiro original com ligeiro pico ácido	Cheiro agradável com pico ácido	3,50	6,40
9	BF	Algum cheiro original com pico ácido	Cheiro agradável com pico ácido	3,54	6,10
13	BJ	Algum cheiro original com pico ácido	Cheiro agradável com pico ácido	3,93	5,90
11	BH	Muito desagradável	Muito desagradável	-	-
6	BC	Cheiro ligeiramente desagradável	Cheiro a “erva seca”	3,47	6,10
3	BA	Cheiro ligeiramente desagradável	Cheiro a “erva seca”	3,94	6,30

Observando aos resultados, excluiu-se a utilização nos ensaios seguintes das estirpes 11, 6 e 3 em polpa de maçã. Estes fermentados ficaram com um cheiro muito pouco agradável, em alguns casos a fazer lembrar erva seca o que não era, de todo, o pretendido.

Constatou-se também que às 48 horas, as características relativas ao aroma das polpas se tornavam, de modo geral, mais desagradáveis e os valores de °Brix e pH não se alteravam apreciativamente. Optou-se então por efetuar os ensaios seguintes, apenas durante 24 horas.

Uma vez que as bactérias lácticas não reduziram apreciavelmente os valores de °Brix de modo a atingir o objetivo do trabalho testaram-se combinações de bactérias lácticas com leveduras. Uma vez que, para as leveduras a matriz da fruta é a ideal, estas fermentaram com muita facilidade a polpa sobrepondo-se às bactérias lácticas e fazendo com que o °Brix descesse de forma mais apreciável.

3.2.2. Fermentação em co-cultura

No quadro 12 podem observar-se os resultados da combinação da levedura *LD* com as diferentes bactérias lácticas, respetivamente.

Quadro 12 – Resultados de pH, °Brix e teor de etanol de polpa de maçã diluída a 1:2 (pH = 4,34 e °Brix = 6,7), fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LD*

Temperatura = 25 °C		24 h			
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 18	pH	°Brix	Etanol (%)	
8	<i>BE</i>	3,75	6,2	ND	
10	<i>BG</i>	3,74	5,9	0,18	
7	<i>BD</i>	3,78	6,3	ND	
5	<i>BC</i>	3,71	5,8	0,25	
9	<i>BF</i>	3,82	6,2	ND	
13	<i>BJ</i>	4,05	5,7	ND	

ND – Não Determinado

No ensaio referido no quadro 12 verificou-se que as combinações que apresentaram uma maior descida de °Brix foram aquelas com as bactérias *BG* e *BC*. No entanto, entre as duas combinações, a que se apresentou mais apelativa em termos sensoriais foi a combinação de *LD* e *BC*.

No quadro 13 podem também observar-se os resultados da combinação da levedura *LC* com as diferentes bactérias lácticas.

Quadro 13 – Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LC*

Temperatura = 25 °C		24 h
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 17	Avaliação sensorial
8	<i>BE</i>	
10	<i>BG</i>	A avaliação sensorial revelou não haver nenhuma combinação que resultasse num fermentado com características apelativas.
7	<i>BD</i>	
5	<i>BC</i>	
9	<i>BF</i>	
13	<i>BJ</i>	

Neste ensaio não houve nenhuma opção que fosse sensorialmente agradável e que levasse a optar por alguma combinação com a levedura *LC*. Deste modo, esta levedura foi excluída de ensaios futuros.

No quadro 14 podem também observar-se os resultados da combinação da levedura *LB* e as diferentes bactérias lácticas.

Quadro 14 – Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LB*

Temperatura = 25 °C		24 h
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 16	Avaliação sensorial
8	<i>BE</i>	A avaliação sensorial revelou haver apenas uma combinação que resultou num fermentado com características apelativas: (<i>LB</i> com <i>BC</i>)
10	<i>BG</i>	
7	<i>BD</i>	
5	<i>BC</i>	
9	<i>BF</i>	
13	<i>BJ</i>	

A única combinação que resultou num fermentado com características sensoriais agradáveis foi *LB* em co-cultura com *BC*.

No quadro 15 podem observar-se os resultados da combinação da levedura *LA* com as diferentes bactérias lácticas.

Quadro 15 - Resultados da avaliação sensorial de polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LA*

Temperatura = 25 °C		24 h
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 15	Avaliação sensorial
8	<i>BE</i>	A avaliação sensorial revelou haver apenas uma combinação que resultou num fermentado com características apelativas: (<i>LA</i> com <i>BC</i>)
10	<i>BG</i>	
7	<i>BD</i>	
5	<i>BC</i>	
9	<i>BF</i>	
13	<i>BJ</i>	

Após a análise dos resultados dos ensaios em co-culturas de bactérias lácticas e leveduras, concluiu-se que *BC* (5), é a estirpe de bactéria láctica que melhor se adequa ao objetivo do trabalho e, por esse motivo, foi a escolhida para os ensaios seguintes com as leveduras com as quais se obtiveram os resultados mais interessantes *LD*, *LA* e *LB* (Quadro 16).

Quadro 16 - Resultados de pH e °Brix de polpa de maçã diluída a 1:2 (pH = 4,34 e °Brix = 6,7), fermentada por diferentes estirpes de leveduras e a bactéria *BC*

Temperatura = 25 °C		24 h	
Referência ISA	Estirpe de L adicionada a CBISA 5	pH	°Brix
18	<i>LD</i>	3,6	5,5
15	<i>LA</i>	3,58	4,9
16	<i>LB</i>	3,95	4,0

Posteriormente, verificou-se que a combinação que melhor se enquadrou no pretendido foi a de *BC* com *LB*, resultando num fermentado com características organolépticas muito agradáveis.

Deste modo, na figura 13 podem-se observar os valores de pH e °Brix no decorrer da fermentação com concentração de inóculo 1 (concentração inicial de cerca de 8 Log UFC/mL de bactéria láctica e 5,5 Log UFC/mL de levedura).

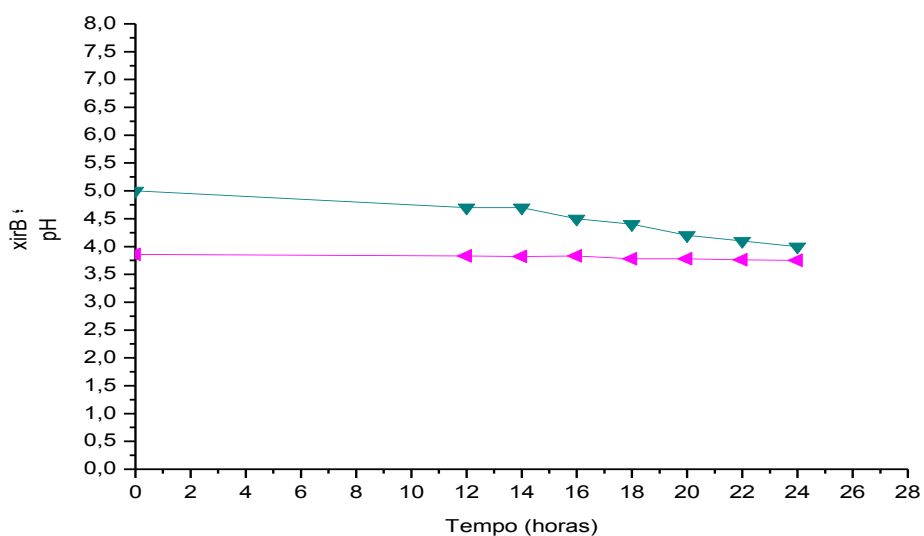


Figura 12 - Evolução dos valores de °Brix e pH em polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB*.

° Brix (▼); pH (◄).

Ao longo da fermentação o °Brix baixou de 5,0 até 4,0 às 24 horas. Relativamente ao valor de pH, verificou-se que se manteve relativamente estável, baixando de 3,86 até 3,75 das 0 às 24 horas.

Na figura 14 observam-se também os valores de pH e °Brix na fermentação de polpa de maçã, inteira, até as 24 horas.

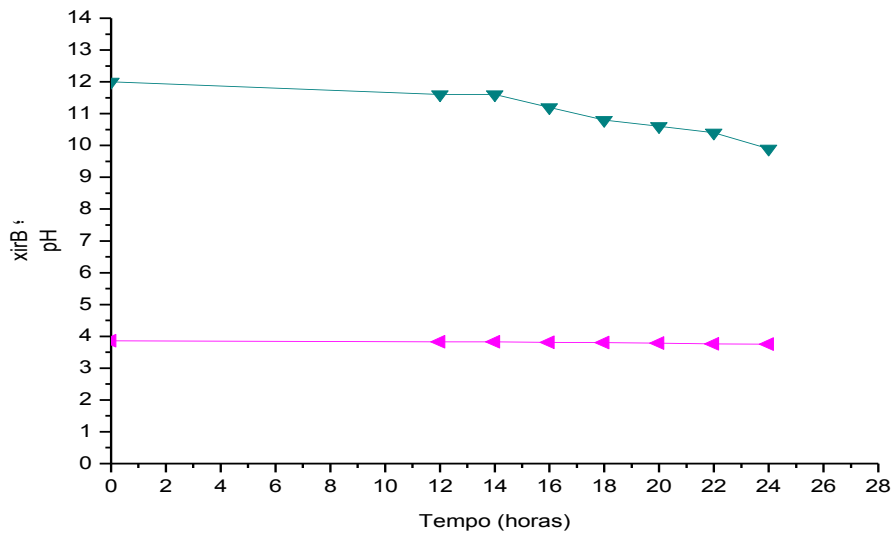


Figura 134 - Evolução dos valores de °Brix e pH em polpa de maçã diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de BC e LB.

° Brix (▼); pH (◄).

A fermentação iniciou-se com °Brix de 12,0 tendo baixado até 9,9, às 24 horas. Relativamente ao valor de pH, alterou de 3,86 para 3,73 às 24 horas.

Concluiu-se que na polpa de maçã a combinação mais apelativa organoleticamente foi a combinação com as estirpes em co-cultura de BC e LB. Contudo, esta combinação não conseguiu atingir o objetivo do trabalho pois o °Brix não desceu de modo a atingir 50% de redução de °Brix.

3.3. Fermentação de polpa de pêssego (Resultados preliminares)

3.3.1. Fermentação em mono-cultura

O quadro 17 contém o resultado das fermentações em polpa de pêssego, com as estirpes de bactérias lácticas em mono-cultura.

Quadro 17 – Resultados da avaliação sensorial, pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2 (com °Brix = 6,7 e pH = 4,37), fermentada por diferentes estirpes de bactérias

Temperatura = 25 °C							
Referência CBISA	Estirpe	24 h			48 h		
		Avaliação sensorial	pH	°Brix	Avaliação sensorial	pH	°Brix
3	BA	Cheiro doce	3,86	5,2	Cheiro muito ácido não agradável	3,79	5,0
5	BC	Cheiro doce	3,54	4,9	Cheiro doce e algo ácido	3,49	5,0
6	BC	Cheiro doce	3,48	4,8	Cheiro muito ácido não agradável	3,34	5,0
7	BD	Cheiro doce	3,46	5,0	Cheiro doce e algo ácido	3,55	4,8
8	BE	Cheiro doce	3,49	5,0	Cheiro doce e algo ácido	3,47	5,0
9	BF	Cheiro doce	3,60	4,9	Cheiro mais ácido, ligeiramente doce	3,59	4,8
10	BG	Cheiro doce	3,48	4,8	Cheiro mais ácido, ligeiramente doce	3,47	5,0
13	BJ	Cheiro doce	3,95	4,5	Cheiro mais ácido, ligeiramente doce	3,67	5,1
11	BH	Cheiro muito desagradável	-	-	Cheiro muito desagradável	-	-

Com base nos resultados apresentados no quadro 17, na fermentação de polpa de pêsego excluiu-se a estirpe 11, devido à ocorrência de cheiro desagradável às 24 horas, bem como as estirpes 3 e 6 porque às 48 horas além de não terem resultados promissores em termos de redução de °Brix, também o aroma não era agradável. Confirma-se, assim, a incapacidade das estirpes de bactérias lácticas em proporcionar uma descida considerável de °Brix.

3.3.2. Fermentação em co-cultura

Nos quadros 18, 19, 20 e 21 apresentam-se os valores de °Brix e de pH resultantes dos ensaios de fermentação utilizando bactérias lácticas selecionadas, até esta fase, em co-cultura com cada uma das leveduras em estudo.

No quadro 18 encontram-se os resultados das fermentações com combinações de diferentes bactérias lácticas com a levedura *LA*, respetivamente.

Quadro 18 - Resultados de pH, °Brix e teor de etanol de polpa de pêsego diluída a 1:2 (com pH = 3,83 e °Brix = 5,3), fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LA*

Temperatura = 25 °C		24 h		
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 15	pH	°Brix	Etanol% (v/v)
5	<i>BC</i>	3,64	2,7	0,73
7	<i>BD</i>	3,63	2,9	0,80
8	<i>BE</i>	3,59	2,5	0,76
9	<i>BF</i>	3,67	2,7	ND
10	<i>BG</i>	3,75	2,8	0,77
13	<i>BJ</i>	3,83	2,0	0,72

ND – Não Determinado

O ensaio com a levedura *LA* (Quadro 18) mostra que, embora o °Brix desça de forma apreciável em todas as combinações e os teores de etanol se mantenham abaixo de 1% (v/v), sensorialmente os fermentados não são agradáveis, à exceção da combinação com a estirpe de *BE*.

No quadro 19 apresentam-se os resultados relativos a combinações de bactérias lácticas com a levedura *LB*.

Quadro 19 - Resultados de pH, °Brix e teor de etanol de polpa de pêssego diluída a 1:2 (com pH = 3,83 e °Brix = 5,3), fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura *LB*

Temperatura = 25 °C		24 h		
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 16	pH	°Brix	Etanol (%)
5	<i>BC</i>	3,64	4,5	0,86
7	<i>BD</i>	3,57	4,5	0,87
8	<i>BE</i>	3,63	4,5	0,81
9	<i>BF</i>	3,65	4,4	0,83
10	<i>BG</i>	3,68	4,4	ND
13	<i>BJ</i>	3,93	4,3	ND

ND – Não Determinado

No geral, no ensaio referido no quadro 19, não houve nenhuma combinação que reduzisse apreciavelmente o °Brix, mas tendo em conta as características organolépticas, considerou-se que as combinações da levedura *LB* com as bactérias *BC* e *BF*, respetivamente, eram bastante apelativas.

No quadro 20 apresentam-se os resultados relativos a combinações de bactérias lácticas com a levedura *LC*.

Quadro 20 - Resultados de pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2 (com pH = 3,83 e °Brix = 5,3), fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura LC

Temperatura = 25 °C		24 h	
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 17	pH	°Brix
5	BC	3,97	3,7
7	BD	3,93	3,8
8	BE	3,95	3,6
9	BF	3,96	3,5
10	BG	3,96	3,6
13	BJ	3,77	3,7

Relativamente ao ensaio referido no quadro 20 com a levedura *LC*, nenhuma das combinações foi considerada apelativa atendendo às características organoléticas, o que excluiu estas combinações.

No quadro 21 apresentam-se os resultados relativos a combinações de bactérias lácticas com a levedura *LD*.

Quadro 21 - Resultados de pH e °Brix de polpa de pêsego diluída a 1:2 (com pH = 3,83 e °Brix = 5,3), fermentada por diferentes estirpes de bactérias com a levedura LD

Temperatura = 25 °C		24 h	
Referência CBISA	Estirpe de BL adicionada a ISA 18	pH	°Brix
5	BC	3,73	4,7
7	BD	3,69	5,1
8	BE	3,73	5,2
9	BF	3,78	5,1
10	BG	3,73	5,1
13	BJ	3,88	5,2

Atendendo aos resultados obtidos nos quatro ensaios anteriores, considerou-se que as estirpes de leveduras que funcionaram melhor em co-cultura com as bactérias lácticas foram: *LB*, *LA* e *LD*.

Repetiram-se assim os ensaios com as estirpes em co-cultura (Quadro 22).

Quadro 22 - Resultados de pH e °Brix de polpa de pêssego diluída a 1:2 (com pH = 3,83 e °Brix = 5,3), fermentada por diferentes estirpes de bactérias e leveduras

Temperatura = 25 °C		24 h	
Referência CBISA/ISA	Estirpe	pH	°Brix
9 + 16	<i>BF + LB</i>	3,67	4,1
8 + 15	<i>BE + LA</i>	3,63	2,2
8 + 18	<i>BE + LD</i>	3,58	4,9
5 + 16	<i>BC + LB</i>	3,40	3,73

Verificou-se que, nestes ensaios, os valores de °Brix, pH e até características organoléticas se alteraram ligeiramente em relação aos anteriores.

Isto pode ser explicado pelo facto de, até esta altura, ter sido utilizada polpa de um determinado lote e no ensaio descrito no quadro 22 ter sido utilizado outro lote de polpas.

A combinação *BC* e *LB* foi a que apresentou melhores resultados em termos de descida de °Brix e características organoléticas e, portanto, foi a escolha da combinação de estirpes a usar para a fermentação da polpa de pêssego.

Na figura 15 é possível observar o comportamento das estirpes na fermentação da polpa de pêssego diluída a 1:2, com uma concentração inicial de cerca de 8 Log UFC/mL de bactérias lácticas e 5,5 Log UFC/mL de leveduras (Inóculo 1).

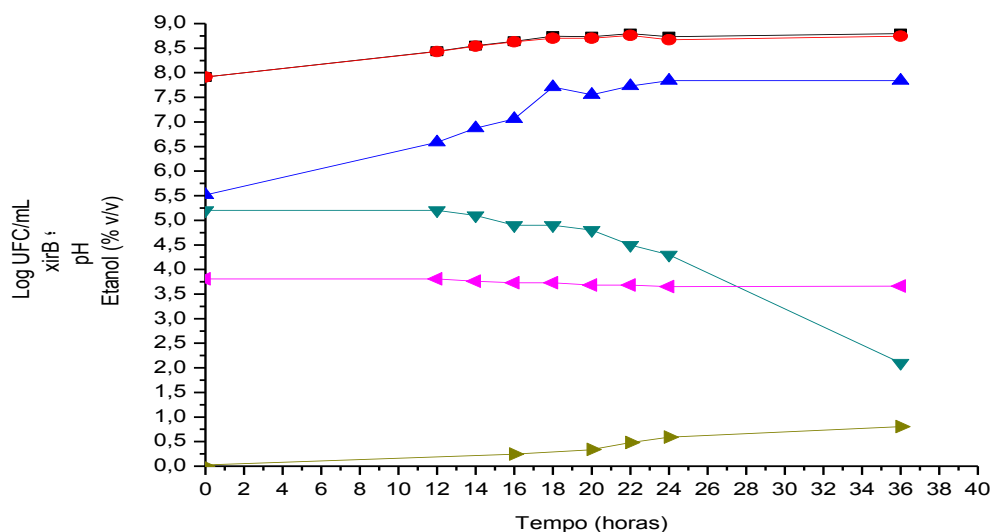


Figura 14 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB* com proporção de inóculo 1.

BC (Log UFC/mL) (●); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL) (■), °Brix (▼); pH (◀) e etanol (▶).

Ao longo da fermentação, o °Brix baixou de 5,2 até 4,3 às 24 horas tendo atingido 2,1 às 36 horas. No que diz respeito ao valor de pH, verificou-se que se manteve relativamente estável, baixando apenas de 3,81 para 3,66, às 36 horas. O etanol, ao fim deste período de fermentação, não ultrapassou cerca de 1% (v/v). A fermentação iniciou-se com 8 Log UFC/mL de microrganismos totais, e evoluiu até 9 Log UFC/mL ao fim de 38 h.

BC representou a quase totalidade dos microrganismos presentes no meio.

No início da fermentação, a levedura (*LB*) apresentava um valor de 5,5 Log UFC/mL tendo aumentado para até 7,8 Log UFC/mL ao fim das 36 horas de fermentação.

De notar que a levedura foi a que apresentou um crescimento mais acentuado, devido ao facto de se encontrar num meio que, naturalmente, é favorável ao seu crescimento, enquanto o mesmo não aconteceu com a bactéria láctica. Seguidamente testaram-se duas outras proporções de inóculos.

Na figura 16, pode-se observar o decorrer da fermentação utilizando no tempo zero cerca de 6,2 Log UFC/mL de levedura e 6,9 Log UFC/mL de bactérias lácticas (Inóculo 2).

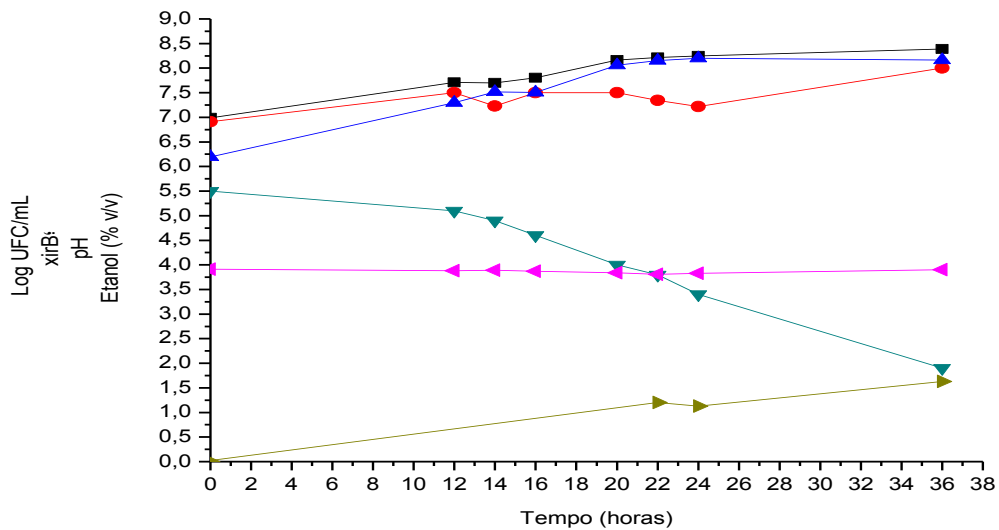


Figura 15 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB* com proporção de inóculo 2.

BC (Log UFC/mL) (●); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL) (■), °Brix (▼); pH (◀) e etanol (▶).

Neste ensaio, relativamente ao anterior, aumentou-se a concentração de levedura de 5,5 Log UFC/mL para 6,2 UFC/mL, tendo atingido 8,2 UFC/mL às 36 horas. Isto teve impacto no °Brix que era 5,5 inicialmente e que se reduziu a 1,9 no final da fermentação.

Em relação ao valor de pH, verificou-se que se manteve relativamente estável. O etanol ao fim deste período de fermentação atingiu 1,6 % (v/v).

A figura 17 representa o decorrer da fermentação com a proporção de 7,7 Log UCF/mL de bactéria láctica e 6 Log UFC/mL de levedura (Inóculo 3).

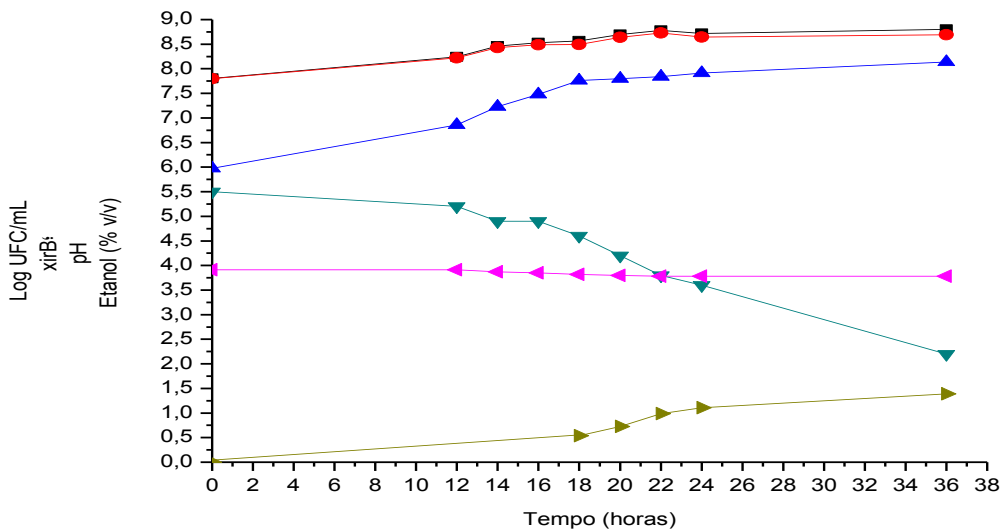


Figura 16 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêssgo diluída a 1:2, fermentada por co-cultura de BC e LB com proporção de inóculo 3.

BC (Log UFC/mL) (●); LB (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL) (■); °Brix (▼); pH (◄) e etanol (►).

Tendo em conta os resultados obtidos, concluiu-se que, em polpa de pêssgo diluída a 1:2, a proporção de inóculo 1 (Figura 15) foi a mais adequada, uma vez que foi a que proporcionou uma bebida fermentada mais apelativa em termos organoléticos e ao mesmo tempo o valor de °Brix desceu consideravelmente.

Na proporção de inóculo 2 (Figura 16), por um lado o °Brix baixou em valores superiores a 50% o que se revelou interessante para os objetivos do trabalho, mas por outro lado a bebida apresentava um aroma muito intenso a fermentado e que não era de modo algum agradável.

Na proporção de inóculo 3 (Figura 17), não houve maior redução em termos de °Brix e em termos organoléticos não se revelou tão interessante como a combinação de inóculo 1.

Foram também testadas as estirpes, em separado, com as concentrações utilizadas de cada uma em co-cultura de inóculo 1 (Figura 15).

Na figura 18 apresenta-se o ensaio com BC com concentração inicial de cerca de 8 Log UFC/mL.

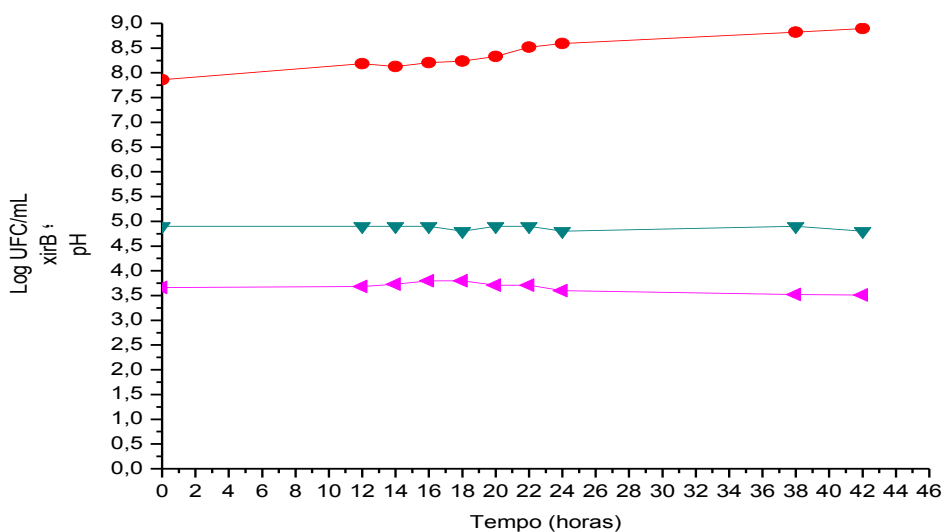


Figura 17 - Evolução dos valores de °Brix, pH e Log UFC/mL em polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por cultura de *BC*.

BC (Log UFC/mL) (●); °Brix (▼); pH (◄).

A figura mostra claramente que a estirpe de *BC* quase não altera o valor de °Brix na polpa, embora lhe confira características apelativas em termos de aroma. A concentração de bactéria láctica no início da fermentação era cerca de 8 Log UFC/mL e aumentou até 8,8 Log UFC/mL, mas isso não resultou numa redução apreciável do °Brix, que praticamente não variou ao fim de 38 horas.

Seguidamente testou-se a estirpe de levedura em cultura pura (Figura 19).

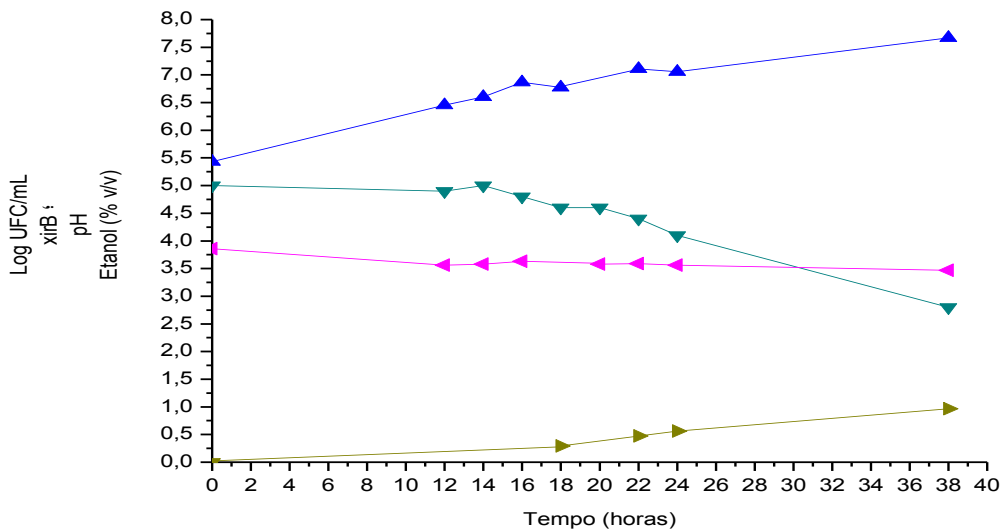


Figura 18 - Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêsego diluída a 1:2, fermentada por cultura de *LB*.

LB (Log UFC/mL) (▲); °Brix (▼); pH (◆) e etanol (▶).

A concentração de *LB* no início da fermentação foi de cerca de 5,4 Log UFC/mL e ao fim de 38 horas aumentou para 7,6 Log UFC/mL, que levou a que o °Brix descesse de 5 até 2,8. O etanol não ultrapassou 1% (v/v). Concluiu-se que embora os valores de °Brix evoluíssem de forma a ir de encontro ao nosso objetivo, em termos organoléticos ficou muito aquém das expectativas. Confirmou-se assim a importância da contribuição das bactérias lácticas neste tipo de fermentação.

A etapa seguinte consistiu na fermentação da polpa não diluída utilizando uma proporção de inóculo de cerca de 8 Log UFC/mL de bactéria láctica e 5,5 Log UFC/mL de levedura (Inóculo 1) (Figura 16). Analisando os resultados, verificou-se que até às 24 horas de fermentação os microrganismos não conseguiram utilizar os açúcares da polpa de forma eficaz. Uma maior redução do °Brix verificou-se apenas entre as 24 e 36 horas de fermentação. Ao utilizar uma concentração superior de levedura, investigou-se a possibilidade da redução de açúcar ocorrer mais cedo e se conseguir atingir 50% do teor de sólidos solúveis iniciais até às 24 horas. A figura 21 apresenta a evolução desta fermentação.

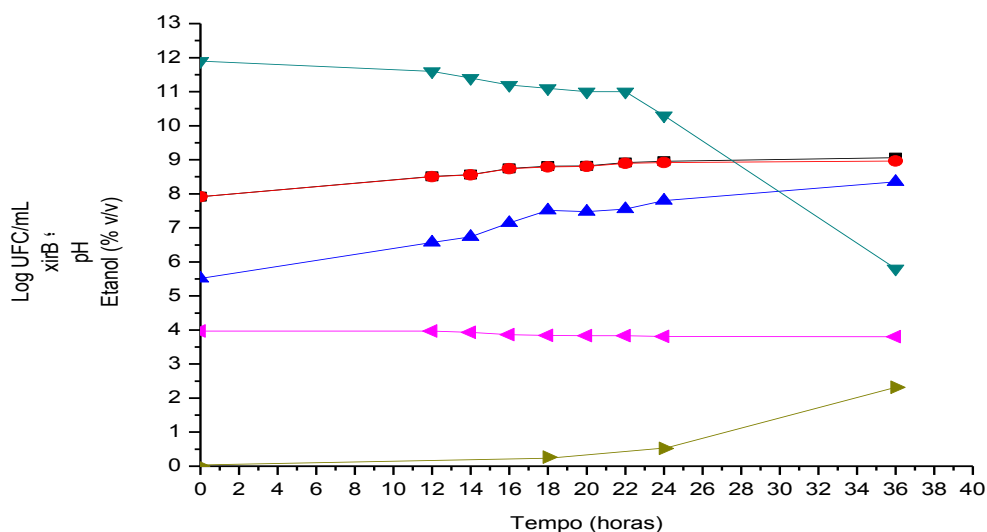


Figura 19 – Evolução dos valores de °Brix, pH, teor de etanol e Log UFC/mL em polpa de pêsego inteira, fermentada por co-cultura de *BC* e *LB*.

BC (Log UFC/mL) (●); *LB* (Log UFC/mL) (▲); microrganismos totais (Log UFC/mL); (■), ° Brix (▼); pH (◀) e etanol (▶).

Pode observar-se que, no início da fermentação, a concentração de microrganismos totais é de 8 Log UFC/mL, sendo que 7,8 Log UFC/mL corresponde a *BC* e 5,5 Log UFC/mL a *LB*.

Durante a fermentação, as contagens de microrganismos totais correspondiam em larga medida às bactérias lácticas, terminando a fermentação com 9,0 Log UFC/mL. Relativamente às leveduras, aumentaram para 7,8 Log UFC/mL às 24 horas e para cerca de 8,3 Log UFC/mL às 36 horas.

Tal como na figura 16, em polpa de pêsego diluída a 1:2 e com proporção de inóculo 1, observa-se uma descida mais acentuada de °Brix no período de fermentação entre as 24 e as 36 horas, até ao valor de 5,8 atingindo a meta de descida de 50% de °Brix.

Da fermentação de polpa de pêsego concluiu-se assim que a combinação melhor resultante, em termos de redução de valor de °Brix e melhores características organoléticas, foi *BC* e *LB*. Desta combinação resultou um fermentado com um aroma bastante apelativo e uma descida de °Brix na ordem dos 50% o que foi de encontro ao objetivo do trabalho. O único senão foi o etanol que atingiu cerca de 2% (v/v), mas que não era possível evitar, uma vez que nestas condições é induzida nesta levedura a fermentação alcoólica (efeito *Crabtree*).

Durante o trabalho, foi previsto monitorizar os açúcares dos fermentados com recurso à determinação do °Brix, que indica o teor de sólidos solúveis e que, nos sumos de frutos, são fundamentalmente glucose, frutose e sacarose. No entanto, esta medição é quantitativa dos solutos totais, não dando qualquer informação acerca do tipo de açúcares presentes (Silva *et al.*, 1999). Por este motivo, utilizaram-se dois outros métodos de doseamento de açúcares na polpa de pêsego: doseamento dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Método de DNS) e método do fenol sulfúrico para açúcares totais. Isto aconteceu na sequência de dúvidas surgidas, uma vez que durante a fermentação, o °Brix não baixava proporcionalmente ao aumento da concentração de etanol e, portanto, este esclarecimento tornou-se fundamental. Concluiu-se que na polpa de pêsego inteira, com valor de °Brix igual a 11,5, os açúcares totais correspondiam a 132,1 g/L e os açúcares redutores (glucose e frutose) a 46,4 g/L. No decurso da fermentação, quando o °Brix baixava para 11,2, os açúcares totais reduziram-se a 109,4 g/L e os açúcares redutores a 22,8 g/L, com uma diferença de °Brix de 0,3. Já no final da fermentação, quando o valor do °Brix atingiu 5,5, os açúcares totais apresentavam um valor de 17,6 g/L e os redutores 6,4 g/L.

Isto significa que, tal como é referido na revisão feita por Baskar *et al.* (2012), no metabolismo dos açúcares em leveduras, a preferência de consumo inicial é pelos açúcares redutores, o que explica os resultados descritos, em que o abaixamento de 0,3 °Brix resultou num decréscimo de metade dos açúcares redutores. No final da fermentação, quando o °Brix se reduziu a metade (5,5 °Brix) do valor inicial (11,5 °Brix), os açúcares totais já só representavam pouco mais de 10% dos açúcares totais presentes na polpa não fermentada.

Isto quer dizer que mesmo não alcançando os 50% de redução em termos de °Brix pretendido, alcançaram-se reduções de açúcares totais muito superiores a 50%. O mesmo poderá passar-se nas polpas de pera e de maçã. É, portanto, claro que é possível produzir uma polpa de fruta fermentada com a redução de teor de açúcar pretendida inicialmente, contudo, esta questão terá de ser melhor esclarecida. O tempo exato de paragem de fermentação deverá ser de igual forma determinado em função da redução de açúcar e da produção de etanol pretendidos.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologias para produção de bebidas fermentadas não alcoólicas, ou pouco alcoólicas, com baixo, ou nulo, teor de açúcar, a partir de polpas de pêsego, maçã e pera.

Assim, foram feitos despistes sucessivos de estirpes de bactérias lácticas e leveduras em ensaios de fermentação das diferentes polpas e em diferentes concentrações. Os fermentados foram caracterizados de modo mais ou menos detalhado, em termos de °Brix, pH, teor alcoólico e acompanhamento do crescimento das estirpes nos fermentados, ao longo do tempo.

Os ensaios efetuados mostraram não ser possível reduzir de forma apreciável o °Brix apenas pela ação de bactérias lácticas. As bactérias lácticas são um grupo de microrganismos que requer, na maioria das vezes, um meio de crescimento enriquecido e que apresenta um valor de pH mínimo no caso de *Lactobacillus* spp. de 3,5 (Kashket, 1987). A polpa de fruta (neste caso, pH entre 3,8 e 4,4) não apresenta as condições ideais para que o desenvolvimento das bactérias lácticas ocorra da melhor forma. Abaixo do valor de pH mínimo, as funções celulares das bactérias lácticas ficam comprometidas e, por esse motivo, as leveduras têm vantagem, uma vez que crescem num meio que lhes é favorável, particularmente em termos de pH. A partir de concentrações de açúcar acima de 3-30 g/L, e, dependendo da estirpe de levedura, a via fermentativa é adotada. As concentrações de açúcares presentes nas polpas de fruta (ex. 132,1 g/L na polpa de pêsego analisada) permitem a ocorrência do efeito de *Crabtree* com produção de álcool (Kashket, 1987). Nestas condições a fermentação alcoólica é, pois, inevitável. Nos fermentados onde apenas se utilizaram leveduras foi possível alcançar a redução pretendida de °Brix, mas apresentaram características sensoriais muito pouco apelativas.

Conclui-se também que o °Brix é uma boa abordagem para ter noção do teor de açúcares que poderão estar presentes na polpa não fermentada, mas que a partir do momento em que a fermentação se inicia são necessários métodos mais rigorosos para a determinação dos açúcares.

Para as três polpas, as estirpes em co-cultura *BC* e *LB* foram as que se apresentaram mais interessantes. Na polpa de pera e de maçã, aquelas estirpes foram as que se mostraram mais apelativas em termos sensoriais, mas o objetivo inicial de redução de 50% de °Brix não foi atingido.

Foi na polpa de pêssego que se obtiveram os melhores resultados, pois o fermentado, além de muito agradável sensorialmente, conseguiu reduzir 50% do °Brix inicial e, deste modo, esta foi a melhor escolha. Relativamente ao etanol, este não atingiu níveis muito superiores a 2% (v/v). Contudo, sendo este produto destinado a comercialização, existem regras referentes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios que indicam que a referência ao teor alcoométrico adquirido deverá ser relatada para valores superiores a 1,2 (DL nº560/99). No caso de se atingirem valores superiores a este, será necessário retirar o etanol da bebida fermentada até atingir um limite aceitável para esta ser considerada não alcoólica, recorrendo, por exemplo, à pervaporação.

Deste modo, concluiu-se que é possível obter fermentados de polpa de fruta com redução do teor inicial de °Brix e baixa concentração de etanol, com bactérias lácticas e leveduras em co-cultura, obtendo uma bebida fermentada muito agradável.

Em termos de perspetivas futuras nas polpas de pera e de maçã, deverá ser testada uma gama mais alargada de microrganismos, de modo a atingir-se, simultaneamente, uma maior redução de açúcares e um aroma mais promissor.

Na polpa de pêssego, a evolução dos açúcares presentes deverá ser, como já foi referido, determinado de forma mais sensível, para calcular, com exatidão, o tempo de fermentação. Seguidamente, deverá proceder-se a um aumento de escala, em fermentador, onde as condições de temperatura, oxigénio, agitação, pH e tempo serão controladas de modo a obter uma polpa fermentada em circunstâncias perfeitamente reproduzíveis. Após estes ensaios em escala piloto, o passo seguinte prender-se-á, então, com a implementação de uma unidade de fermentação na indústria, em fermentadores industriais, onde as condições serão otimizadas.

O trabalho aqui apresentado indica que o fermentado de polpa de pêssego poderá ser comercializável, pois apresenta características sensoriais muito agradáveis, uma redução bastante apreciável dos açúcares, baixa concentração de etanol e, por esse motivo, revela-se muito apelativo a um nicho de mercado com preocupação de redução de consumo de açúcar e apreciador de uma bebida fermentada e com características muito particulares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, C. A. (2006). Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours and Vitamins by Yeasts. Em: Querol, A. e Fleet, G. (eds), *Yeasts in Foods and Beverages*. Springer. Heidelberg.
- Antara, N.S., Sujaya, I.N., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F. (2004). Effects of indigenous starter cultures on the microbial and physicochemical characteristics of Urutan, a Balinese fermented sausage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **98**: 92-98.
- Ankolekar, C., Pintoa, M., Greeneb, D., Shettya, K. (2012). In vitro bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **13**: 221-230.
- Baki, I., Shütt, D., Bader, J., Gerlach, E. M., Garbe, L. A., Stahl, U. (2011). Functional, fermented beverages based on malted cereals and fruit compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. **22**: 15-152.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V. (2012). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **154**: 152-161.
- Barinov, A., Bolotin, A., Langella, P., Maguin, E. e Van De Guchte, M. (2011). *Genomics of the Genus Lactobacillus*. Em: Sonomoto, K. e Yokota, A. (eds) *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria, Current Progress in Advanced Research*. Caister Academic Press, pp. 3-4.
- Baskar, C., Baskar, S. e Dhillon, R.S. (2012). *Biomass Conversion, The Interface of Biotechnology, Chemistry and Materials Science*. Springer.
- Belitz, H.-D, Grosch, W. e Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4ª Edição, Springer.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M. J., Pagán, M. J., García, M. J., Gras, M. L., Martínez-Monzó, J., Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal Food Engineering*. **56**: 273-277.

- Bjorkroth, J. e Koort, J. (2011). *Taxonomy and Biodiversity. Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2ª Edição.
- Blandino, A., Al-Aseeria, M.E., Pandiellaa, S.S., Canterob D. e Webba, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. **36**: 527-543.
- Bringel, F., Curk, M.C., Hubert, J.C. (1996). Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a BC pyrDFE probe. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **46**: 588–594.
- Buckenhüskes, H. J. (1997). *Fermented vegetables*. Em: Doyle, P. D., Beuchat, L.R., Montville, T. J. (eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2ª Edição. ASM Press.
- Buratti, S., Ballabio, D., Giovanelli, G., Zuluanga Dominguez, C.M., Moles, A., Benedetti, S., Sinelli, N. (2011). Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*. **697**: 67-74.
- Calderon Santoyo, M., Loiseau, G., Rodriguez Sanoja, R., Guyot, J. P. (2003). Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and alpha-amylase production at pH 4.0. *International Journal of Food Microbiology*. **80**: 77-87.
- Chelule, P.K., Mbongwaa, H.P., Carriesa, S. e Gqaleni, N. (2010). Lactic acid fermentation improves the quality of amahewu, a traditional South African maize-based porridge. *Food Chemistry*. **122**: 656-661.
- Ciani, M., Comitini, F. e Mannazzu, I. (2008). *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press.
- Corsetti, A e Valmorri, S. (2011). *Lactobacillus spp.: BC*. (ed) Em: John W. Fuquay, Patrick F. Fox e Paul. L.H. McSweeney. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2ª edição. Elsevier.
- Decreto-Lei nº 560/99 de 18 de Dezembro. Diário da República Nº 293 – I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

- Demain, A.L., Phaff, H.J. e Kurtzman, C.P. (1998). The industrial and agricultural significance of yeasts. Em: Kurtzman, C.P. e Fell, J.W. (eds). *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*. **127**: 220–228.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbib, E., Lazzi, C., Bernini, V., Nevian, E., Gobbetti, M. (2010). Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing BC isolates from raw vegetables and fruits. *International Journal of Food Microbiology*. **143**: 246–253.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., Angelis, M. De e Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*. **28**: 1062-1071.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. e Gobbetti, M. (2012). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*. **33**: 1-10.
- Díaz-Ruiz, R., Ave, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal e S., Devin, A. (2008). Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Regulated by Fructose 1,6-Bisphosphate . *The Journal of Biological Chemistry*. **283**: 26948-26955.
- European Food Safety Authority. (2012). *Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update)*. Hazards, Panel on Biological. Parma, Itália.
- Feldmann, Horst. (2005). *Yeast molecular biology*. Adolf-Butenandt-Institute. University of Munich.
- Glazer, A. N., Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*. 2ª Edição. Cambridge University Press.
- Hutkins, Robert W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell publishing. USA.

- Instituto Nacional Saúde Ricardo Jorge. (2007). Tabela da composição de alimentos. Lisboa.
- ISO 4833:2003 (2003). Contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*. **46**: 233-244.
- Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., Hoschke, A. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains. *Process Biochemistry*. **43**: 816-821.
- Lea, A. G. H., Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **29**: 478-483.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. **15**: 67-78.
- Lindow, S. E., Brandi, M. T. (2003) Mini review: microbiology of the phyllosphere. *Environmental Microbiology*. **69**: 1875-1885.
- Ludwig, D.S., Peterson, K.E., Gortmaker, S.L. (2001). Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *The Lancet*. **357**: 505-508.
- Madigan, Michael T. e Martinko, John M. (2006). *Biology of Microorganisms*. 11ª Edição. Pearson Prentice Hall. Illinois.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.
- Matos, G. F., Teixeira, J. A., Silva, D. P., Vicente, A. A., Felipe, M. G. A., Silva, J. B. A. e Carvalho, G.B.M. (2009). Análise da Fermentação em Bioreatores Cilindrocônicos de Bancada na Elaboração de Cerveja com Adjunto de Banana. *XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Natal, Brasil.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P. e Bardowski, J. (2010). *Updates in the metabolism of lactic acid bacteria*. Em: Mozzi, F., Raya, R. R. e Vignolo, G. M. (eds). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications*. Wiley-Blackwell.

- Nout, M. J. (2009). Rich nutrition from the poorest - cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiology*. **26**: 685-692.
- NP 3277-1 (1987). Norma Portuguesa para contagem de bolores e leveduras a 25 °C. Lisboa
- Office International de la Vigne et du Vin. (1962). Recueil des Méthodes Internationales D'Analyse des Vins. Paris.
- Owczarek, L., Jasinska, U. T. e Misiewicz, A. (2012). Method of production of fermented, pro-healthy fruit beverages. Patente WO 2012/036575 A1.
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C. e Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. **44**: 1276-1283.
- Plenghvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., Fleming, H.P. (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 7697–7702.
- Prior, R. L., Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticulture Science*. **35**: 588-592.
- Pulido, R.P., Benomar, N., Cañamero, M.M., Abriouel, H., Gálvez, A. (2012). Fermentation of caper products. Em: Hui, Y.H. (ed). *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*. CRC Press.
- Rakin, M., Baras, J., Vukasinovic, M. (2004). The influence of brewers yeast autolysate and lactic acid bacteria on the production of a functional food additive based on beetroot fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. **42**: 105-109.
- Rodbotten, M., Martinsen, B. K., Borge, G. I., Mortvedt, H. S., Knutsen, S. H., Lea, P., Naes, T. (2008). A cross-cultural study of preference for apple juice with different sugar and acid contents. *Food Quality and Preference*, **20**: 277-284.
- Rodrigues, F., Ludovico, P. e Leão, C. (2006). *Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism*. Em: Carlos R. e Gábor P. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer.

- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **132**: 79-90.
- Romano, P., Capece, A. e Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. Em: Querol, A. e Fleet, G. (eds), *Yeasts in Foods and Beverages*. Springer.
- Sánchez, I., Palop, L., Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Almagro” eggplants. *International Journal of Food Microbiology*. **59**: 9–17.
- Sánchez, A. C. G., Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I. (2003). Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **83**: 995-1003.
- Schulze, M. B., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Hu, F. B. (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *Journal of the American Medical Association*. **292**: 927-934.
- Shen, L., Ji, H. F., Zhang, H. Y. (2007). How to understand the dichotomy of antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **362**: 543-545.
- Silva, B. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Oliveira, M. B. e Ferreira, M. A. (1999). Adulteração por adição de açúcares. *Ciência e Tecnologia Alimentos*. **2**: 184-191.
- Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **1**: 23-32.
- Vega Leal-Sánchez, M., Ruíz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R., Garrido, A. (2003). Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using BC LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*. **20**: 421–430.
- Viljoen, Bennie C. (2006). *Yeast Ecological Interactions. Yeast-Yeast, Yeast-Bacteria, Yeast-Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents*. Em: Querol, A. e Fleet, G. (eds), *Yeasts in Foods and Beverages*. Springer. Heidelberg.

Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2000). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Microbial Ecology*. **98**: 3889-3894.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E. e Hang, Y. D. (2004). Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Microbiology*. **42**: 315-318.

ANEXO

Anexo 1 – Exemplo de cromatograma obtido na análise por HPLC ao etanol

