

**Universidade do Algarve**  
**Instituto Superior de Engenharia**

**“Propriedades biotecnológicas de  
microrganismos isolados de processos  
fermentativos”**

**Susana Patrícia Gonçalinho e Silva Barros**

**Trabalho realizado para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Doutora Célia Maria Brito Quintas**

**Faro, 2014**

**Universidade do Algarve**  
**Instituto Superior de Engenharia**

**“Propriedades biotecnológicas de  
microrganismos isolados de processos  
fermentativos”**

**Susana Patrícia Gonçalinho e Silva Barros**

**Trabalho realizado para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Doutora Célia Maria Brito Quintas**

**Faro, 2014**

# **“Propriedades biotecnológicas de microrganismos isolados de processos fermentativos”**

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Susana Patrícia Gonçalves e Silva Barros)

**©2014 Susana Patrícia Gonçalves e Silva Barros**

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

A realização deste trabalho apenas se tornou possível graças ao apoio, disponibilidade e incentivo de várias pessoas que de algum modo contribuíram para a realização desta dissertação.

Pela orientação prestada, atenção, disponibilidade e dedicação, à Doutora Célia Quintas, que sem o seu apoio não seria possível a realização deste projeto, com a sua persistente motivação, simpatia e encorajamento.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia, Sílvia Madeira e Neusa Rodrigues, por toda a disponibilidade e ajuda prestada.

À minha colega de Mestrado e amiga Joana Lopes, pela compreensão e toda a generosa ajuda durante a realização do projeto, pela amizade e companhia, apoio e paciência ao longo desta etapa.

A todos meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante esta fase, em especial a Carla Alves, a Beatriz Alvelos, o Luís Coelho e a Maria Inês Martins muito obrigada pela paciência, conforto e amizade em todos os momentos.

À Ana Lopes, pelo apoio, incentivo, compreensão e preocupação durante esta etapa.

À minha família pela ajuda, carinho e apoio incondicionais, especialmente ao meu irmão, ao meu pai, aos meus avós e às minhas tias.

*A todos Muito Obrigada!*

## Resumo

---

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na caracterização da microbiota isolada em processos fermentativos e na identificação de estirpes com propriedades fisiológicas com potencial para aplicações biotecnológicas. O objetivo do presente trabalho foi detetar a produção de enzimas extracelulares e estudar a atividade antimicrobiana de microrganismos obtidos de fermentações industriais de azeitona de mesa. Utilizaram-se 41 isolados dos géneros *Candida*, *Citeromyces*, *Zygotoruspora*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium* os quais foram testados relativamente à sua capacidade de produzir pectinases, amilases, celulases, xilanases, lipases, proteases, tanases e  $\beta$ -glucosidases, usando meios de cultura específicos. A atividade antimicrobiana em relação a bactérias patogénicas de origem alimentar (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Listeria* spp. e *Staphylococcus aureus*) e em relação a leveduras, foi também estudada. O isolado da espécie *A. pullulans* foi o único em que foi detetada capacidade de produzir as enzimas pesquisadas. Todos os isolados revelaram capacidade de degradar o peróxido de oxigénio. Nenhuma das espécies inibiu *E. coli*, *Salmonella* sp. e *C. sakazakii*. Contudo, *A. pullulans* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Listeria* spp., nas condições testadas. A capacidade de inibição de leveduras não foi detetada em nenhum dos isolados mas, alguns deles, revelaram-se sensíveis a toxinas *killer* referenciadas (K2, K5, K8, K9 e K10).

Este estudo revelou o potencial de *A. pullulans*, enquanto produtor de enzimas extracelulares e como inibidor de bactérias patogénicas de origem alimentar, para aplicação na indústria alimentar ou noutras indústrias. No caso da produção de azeitona de mesa, a adição de estirpes com um perfil biotecnológico específico aos processos fermentativos poderá ter consequências benéficas nas características organolépticas, nutricionais e de segurança microbiológica do produto final.

Palavras-chave: Leveduras, Propriedades biotecnológicas, Enzimas extracelulares, Atividade antimicrobiana

## Abstract

---

In recent years there has been increasing interest in characterizing the microbiota of fermentation processes and in the identification of strains with physiological properties and potential for biotechnological applications. The objective of this study was to detect the production of extracellular enzymes and the antimicrobial activity of isolates from table olives' industrial fermentations. Forty one isolates of the genera *Candida*, *Citeromyces*, *Zygorulaspora*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium* were screened for their ability to produce pectinases, amylases, cellulases, xylanases, lipases, proteases, tannases and  $\beta$ -glucosidases using specific culture media. The antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Listeria* spp., and *Staphylococcus aureus*) and against yeast, was also studied. *A. pullulans* was the sole microorganism demonstrating ability to produce the extracellular enzymes studied. However, all the isolates showed ability to degrade oxygen peroxide. None of the isolates inhibited *E. coli*, *Salmonella* sp. and *C. sakazakii*. However, *A. pullulans* showed antibacterial activity against *S. aureus* and *Listeria* spp., under the conditions tested. The ability to inhibit yeast was not detected in any of the isolates, but some of them were sensitive to known "killer" toxins (K2, K5, K8, K9 and K10).

This study revealed the potential of *A. pullulans* as a producer of extracellular enzymes and as an inhibitor of foodborne pathogenic bacteria and its application in the food industry or in other industries. In the case of table olives' production, the utilization of strains with specific biotechnological characteristics in the fermentation processes may certainly have beneficial impact on the organoleptic, nutritional and microbiological safety of the final product.

Keywords: Yeast, biotechnological properties, extracellular enzymes, antimicrobial activity

## Índice de figuras

Figura 2.1 - Utilização de oleuropeína como fonte única de carbono e energia. ....	31
Figura 2.2 - Hidrólise de arbutina.....	32
Figura 2.3 - Resultado positivo para a atividade de catalases. ....	32
Figura 2.4 - Produção de amilases.....	33
Figura 2.5 - Hidrólise da pectina .....	34
Figura 2.6 - Atividade esterásica .....	35
Figura 2.7 - Atividade proteasica no meio de cultura de caseína .....	37
Figura 2.8 - Atividade proteasica no meio de cultura de gelatina.....	37
Figura 2.9 - Produção de fenolases.....	38
Figura 2.10 - Produção de celulases .....	39
Figura 2.11 - Atividade killer de leveduras .....	41
Figura 3.1 - Sequência ilustrativa da reação de catalases positivas.....	44
Figura 3.2 - A – Meio de amido revelando atividade amilásica positiva a) e negativa b); B – Meio de celulose revelando atividade celulásica positiva a) e negativa b); C – Meio de pectina revelando atividade pectinásica positiva a) e negativa b); D – Meio de xilano revelando atividade xilanásica positiva a) e negativa b). ....	46
Figura 3.3 – A – Meio de Tween 80 revelando atividade esterásica positiva; B – Meio de azeite revelando atividade lipásica positiva; C – Meio de caseína revelando atividade proteásica positiva; D – Meio de gelatina revelando atividade proteásica positiva. ....	46
Figura 3.4 - A – Meio de arbutina revelando atividade glucosidásicapositiva a) e negativa b); B – Meio de oleuropeína revelando atividade positiva a) e negativa b); Meio de ácido tânico revelando atividade tanásica positiva; D – Meio de sais de bÍlis apresentando crescimento microbiano.....	47
Figura 3.5 - Inibição de <i>L. monocytogenes</i> na presença de concentrações crescentes de NaCl.....	54
Figura 3.6 - Sensibilidade dos microrganismos de fermentação industrial em relação a toxinas <i>killer</i> de referência .....	58
Figura 3.7 - Sensibilidade de <i>Candida boidinii</i> às leveduras K5, K8 e K10 em meio sem adição de NaCl e com 4 % de NaCl .....	59

## Índice de tabelas

Tabela 1.I - Síntese dos métodos de produção de azeitonas de mesa.....	4
Tabela 1.II - Processamento da azeitona verde britada .....	5
Tabela 1.III - Condições que afetam o crescimento de BAL .....	8
Tabela 1.IV - Aspectos positivos das leveduras nas azeitona de mesa .....	12
Tabela 1.V - Aspectos negativos das leveduras nas azeitona de mesa.....	14
Tabela 2.I – Microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitonas verdes britadas .....	29
Tabela 2.II - Bactérias utilizadas .....	29
Tabela 2.III - Leveduras sensíveis.....	30
Tabela 2.IV – Leveduras produtoras de toxinas específicas (K) com capacidade <i>killer</i> conhecida.....	30
Tabela 3.I - Atividades enzimáticas dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitonas (Amilases, Pectinases, Xilanases, Celulases). .....	43
Tabela 3.II - Atividades enzimáticas dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitonas (Lipases, esterases, proteases e catalases) .....	44
Tabela 3.III - Atividades enzimáticas dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitonas ( $\beta$ -glucosidases, fenolases) .....	45
Tabela 3.IV - Utilização de oleuropeína como fonte única de carbono e energia e crescimento na presença de sais de bÍlis .....	45
Tabela 3.V - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (sem adição de NaCl) .....	52
Tabela 3.VI - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (4 % (p/v) de NaCl).....	53
Tabela 3.VII - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (6 % (p/v) de NaCl).....	53
Tabela 3.VIII - Atividade <i>killer</i> e sensibilidade dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada .....	56
Tabela 3.IX - Atividade <i>killer</i> e sensibilidade dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada (4 % (p/v) de NaCl) .....	57

# Índice de conteúdos

Declaração de autoria de trabalho .....	iii
Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Alimentos fermentados .....	1
1.2. Azeitonas .....	2
1.3. Azeitonas de mesa .....	3
1.3.1. Processos de produção de azeitonas de mesa .....	3
1.4. Microrganismos no processo fermentativo das azeitonas de mesa.....	5
1.4.1. Bactérias ácido-láticas.....	6
1.4.2. Leveduras .....	10
1.4.3. Importância das leveduras nas azeitonas de mesa.....	12
1.4.4. Propriedades biotecnológicas das leveduras .....	14
1.4.5. Interação entre leveduras e bactérias ácido-láticas em azeitonas de mesa...	23
1.5. Qualidade microbiológica das azeitonas de mesa.....	24
1.6. Objetivos do trabalho .....	28
2. Materiais e métodos.....	29
2.1. Microrganismos .....	29
2.2. Produção de enzimas extracelulares .....	31
2.3. Propriedades antimicrobianas .....	39
3. Resultados e discussão .....	43

3.1. Produção de enzimas extracelulares .....	43
3.2. Propriedades antimicrobianas .....	52
3.2.1. Atividade antimicrobiana sobre bactérias .....	52
3.2.2. Atividade antimicrobiana sobre leveduras sensíveis e sensibilidade em relação a leveduras com capacidade <i>killer</i> conhecida .....	56
4. Conclusões e perspectivas futuras .....	60
4.1. Conclusões .....	60
4.2. Perspectivas futuras .....	61
5. Referências bibliográficas .....	62
6. Anexo .....	71

# 1. Introdução

---

## 1.1. Alimentos fermentados

A produção de alimentos fermentados tem por objetivo a sua conservação, assim como o desenvolvimento de aromas, texturas, sabores ou outras características com vista à satisfação dos consumidores (Alves, 2010).

Os produtos de origem vegetal, por serem facilmente perecíveis e se degradarem rapidamente, levam à necessidade da sua conservação para que a sua durabilidade aumente. Ao longo do século XX foram desenvolvidas diversas técnicas, como a refrigeração, o congelamento ou a utilização de conservas com vista a aumentar o tempo de vida útil dos alimentos. Devido à inacessibilidade de muitas populações a este tipo de tecnologias, a forma de preservação alternativa centrou-se em processos naturais como a fermentação ácida ou utilização de salmoura. Estes processos levam a alterações organoléticas e, em geral, a uma melhoria das características nutricionais dos alimentos (Nguyen *et al*, 2013).

Os alimentos fermentados apresentam-se como substratos alimentares que contêm microrganismos cujas enzimas (amilases, proteases, lipases entre outras) hidrolisam polissacáridos, proteínas e lípidos que se convertem em propriedades organoléticas apreciadas (aromas, texturas) pelos consumidores. No entanto podem resultar em propriedades que levam à deterioração dos alimentos ou aromas e texturas indesejáveis (Hutkins, 2006).

Segundo Hutkins (2006), as fermentações podem ser classificadas da seguinte forma:

- Fermentações que levam à produção de proteína vegetal produzidos a partir de misturas de legumes ou cereais;
- Fermentações ácido-láticas, nas quais se incluem algumas azeitonas de mesa;
- Fermentações alcoólicas nas quais se incluem o vinho ou a cerveja;
- Acetificação, onde se inclui a produção de vinagre de vinho ou vinagre de cidra.

Embora existam diversos métodos produzir alimentos fermentados de origem vegetal, este tipo de processamento recorre à utilização de salmouras para a imersão dos vegetais, como por exemplo na produção de azeitonas (Alves, 2010).

## **1.2. Azeitonas**

As azeitonas, provenientes da espécie *Olea europaea*, apresentam-se como frutos com elevado teor de gordura, baixa concentração de açúcares, apresentando na sua composição compostos fenólicos como a oleuropeína, que confere amargor ao produto. Estas características levam a que as azeitonas não possam ser consumidas após a colheita, necessitando de várias fases de processamento para que se tornem aptas para o consumo (Arroyo-López *et al*, 2012; Silva *et al*, 2011).

Segundo o International Olive Oil Council (IOOC, 2004) as azeitonas são definidas como “produto obtido a partir de cultivares de oliveiras adequados, processado para a remoção da sua amargura natural recorrendo a fermentação natural, tratamento térmico ou conservantes, com ou sem salmoura” (Arroyo-López *et al*, 2012).

Este fruto caracteriza-se como uma drupa devido à sua morfologia (pele, polpa e caroço), podendo apresentar variações tanto físicas como físico-químicas. A colheita da azeitona decorre, em geral, desde o início de Setembro até ao início do Inverno, sendo que a sua maturação apresenta variações consoante o cultivar ou as características pretendidas para o produto final. A sua coloração pode variar desde o verde até ao “negro-púrpura” dependendo do estado de maturação. O tamanho dos frutos pode apresentar variações influenciadas por diversos fatores tais como a disponibilidade de água, a temperatura ou fatores genéticos variáveis entre os cultivares (Nogueira, 2012).

O azeite e as azeitonas de mesa são dois produtos muito importantes na dieta mediterrânica que apresentam reconhecidos benefícios no combate às doenças do foro cardiovascular, na prevenção do cancro do cólon e pelas suas propriedades anti-inflamatórias. Estes benefícios têm sido relacionados com os compostos fenólicos e antioxidantes presentes no azeite (Spadafora *et al*, 2008).

### **1.3. Azeitonas de mesa**

A maioria da produção de azeitonas tem como principal destino o processamento para produção de azeite, sendo que 7-10 % são utilizados como azeitona de mesa (Alves, 2010), que se apresentam como um dos mais importantes vegetais fermentados a nível mundial. Estas são largamente apreciadas como acompanhamento de bebidas, condimento de saladas ou pizzas, assim como complemento da dieta mediterrânica. As suas características sensoriais e nutricionais apresentam-se como as principais razões para que seja tão apreciada em tão diversas culturas e mercados (Tofalo *et al*, 2013).

A elaboração de azeitonas de mesa é tradicionalmente baseada na fermentação espontânea das azeitonas imersas em salmoura (Hernandez *et al*, 2007). Atualmente as azeitonas de mesa são um dos principais vegetais fermentados da indústria alimentar. Segundo o IOOC (2012) as azeitonas de mesa atingiram uma produção estimada de 2,440,000 toneladas a nível mundial em 2010/2011. A maioria das azeitonas de mesa são produzidas nos países mediterrânicos, com Espanha, Turquia, Egipto, Grécia e Itália a apresentarem uma contribuição mais elevada. Os Estados Unidos da América, a Argentina, o Peru e a Austrália também apresentam produções de azeitonas de mesa relevantes (Arroyo-López *et al*, 2012).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2013 foram produzidas em Portugal cerca de 634,209 toneladas de azeitonas. A região que apresentou maior produção foi o Alentejo com 421,842 toneladas de azeitonas produzidas seguida de Trás-os-Montes com 89,156 sendo a região do Douro e do Minho a que apresentou menor produção com 2,706 toneladas. A região do Algarve apresentou-se como a segunda que menos produziu com 5,825 toneladas de produção total.

#### **1.3.1. Processos de produção de azeitonas de mesa**

O principal objetivo do processamento de azeitonas é a remoção do amargor naturalmente presente nas azeitonas não processadas por hidrólise ou por diluição dos compostos fenólicos (Aponte *et al*, 2010). A oleuropeína é um dos principais compostos presentes em *Olea europaea* e nos seus derivados (azeitonas de mesa, azeite ou subprodutos da indústria do azeite). Este é o biofenol mais abundante e o maior composto bioativo nas folhas de oliveira e ao qual têm sido atribuídas importantes

propriedades bioativas, assim como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, entre outras (Aouidi *et al*, 2012).

Os processos de produção de azeitona de mesa são variáveis de região para região (Arroyo-López *et al*, 2012). Independentemente do método de produção utilizado, a produção de azeitonas de mesa deve-se à atividade dos diversos grupos de microrganismos envolvidos na fermentação. As bactérias ácido-láticas, as leveduras e as bactérias do género *Enterobacteriaceae* apresentam-se como os grupos predominantes no processo de produção de azeitonas de mesa (Bautista-Gallego *et al*, 2011).

Inicialmente, o processo fermentativo das azeitonas é efetuado pela microbiota presente, nomeadamente as bactérias ácido-láticas que efetuam a conversão de substratos fermentescíveis – açúcares – em ácidos orgânicos que são libertados para a salmoura. A presença de ácidos orgânicos e a sua acumulação leva a uma diminuição do pH da salmoura. Os baixos valores de pH, em combinação com os elevados teores de sal presentes levam a uma garantia da qualidade microbiológica do produto final, fornecendo em simultâneo os atributos sensoriais desejados pelos consumidores (Doulgeraki *et al*, 2013).

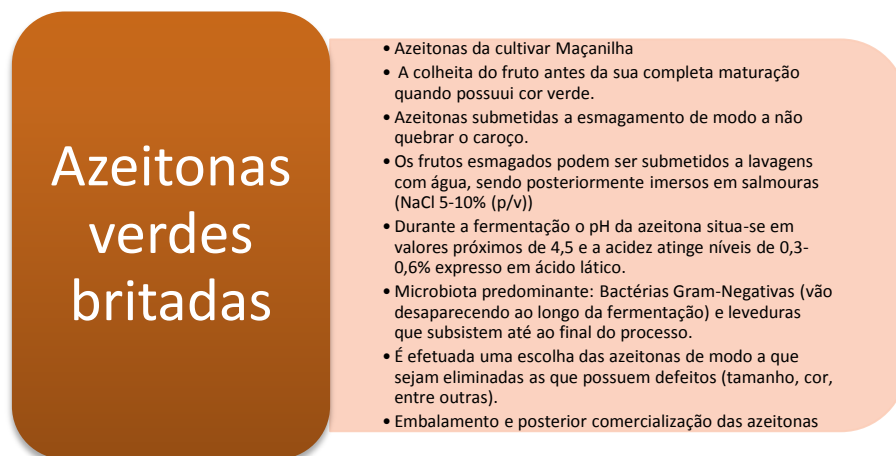
A produção industrial de azeitonas de mesa com maior expressão económica baseia-se essencialmente em três tipos de processamento: método Grego, método Espanhol e método Californiano, que se encontram resumidos na tabela 1.I (Adaptada dos autores Arroyo-López *et al*, 2008; Alves, 2010; Nogueira, 2012).

**Tabela 1.I - Síntese dos métodos de produção de azeitonas de mesa**

<p><b>Estilo Grego (Fermentação natural)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Após a colheita as azeitonas são lavadas e colocadas em salmoura com uma concentração entre 8% e 10% (p/v).</li> <li>• Fermentação das azeitonas sem pré-tratamento com NaOH</li> <li>• A remoção dos compostos fenólicos é efetuada por hidrólise e difusão.</li> <li>• População microbiana: leveduras, bactérias ácido-láticas e também bactérias Gram negativas, (que são inibidas pela presença de compostos fenólicos ao longo do processo).</li> <li>• Os produtos finais: ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico e ácido málico. O pH e a acidez finais rondam 4,5 e 0,6% respetivamente.</li> <li>• No produto final subsistem leveduras e bactérias ácido-láticas.</li> <li>• As azeitonas são expostas ao ar após a fermentação por um período não superior a 48 horas.</li> <li>• Processo de fermentação dura entre 8 a 12 meses para que ocorra a difusão dos compostos fenólicos e a hidrólise da oleuropeína.</li> <li>• Azeitonas de cor negra, brilhantes, não oxidadas.</li> </ul>
<p><b>Estilo Espanhol</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Após a colheita, que ocorre quando os frutos ainda estão verdes e possuem uma cor verde-amarelada as azeitonas são tratadas com NaOH durante 4 a 12 horas. o tratamento tem como objetivo promover a remoção de compostos fenólicos (hidrólise da oleuropeína) e consequentemente o amargor natural das azeitonas.</li> <li>• O excesso de NaOH é removido com recurso a lavagens sucessivas, para a posterior colocação das azeitonas em salmoura (6-8%)</li> <li>• Ocorre uma fermentação ácido-lática.</li> <li>• População microbiana: ocorrência de bactérias Gram-negativas (principalmente <i>Enterobacteriaceae</i>), crescimento de bactérias ácido-láticas e leveduras (com decréscimo de bactérias Gram-negativas), crescimento de <i>Lactobacillus</i>.</li> <li>• Produto final: ácido láctico</li> <li>• O processo de dura entre 3 a 7 meses após os quais as azeitonas são colocadas numa nova solução de salmoura ligeiramente acidificada de modo a serem comercializadas.</li> <li>• Azeitonas de cor verde.</li> </ul>
<p><b>Estilo Californiano</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Após a colheita, com diferentes estados de maturação (desde o verde ao negro), as azeitonas são armazenadas em soluções de 2 a 6% de NaCl durante 2-6 meses. São efetuadas lavagens sucessivas com NaOH, entre as quais são colocadas em tanques com injeção de ar líquido para um escurecimento natural e homogêneo das azeitonas.</li> <li>• A presença de oxigénio leva ao escurecimento das azeitonas devido à polimerização dos compostos fenólicos. São utilizados compostos para uniformizar e estabilizar o escurecimento das azeitonas: gluconato de ferro ou lactato de ferro</li> <li>• A produção de azeitonas pretas oxidadas baseia-se em 3 etapas principais: tratamento alcalino, armazenamento em salmoura e tratamento térmico</li> <li>• As azeitonas são escolhidas e embaladas em salmoura, que pode conter ainda alguma concentração de soluções com sais de ferro de forma a prevenir a perda da cor negra das azeitonas.</li> <li>• A conservação do produto final pode ser feita através do processo de esterilização, pasteurização ou adição de ácidos para a manutenção dos valores de pH.</li> <li>• Azeitonas pretas oxidadas</li> </ul>

Para além dos métodos acima descritos, existem outras metodologias de preparação de azeitonas de mesa características de determinadas regiões. Em Portugal existem diferentes formas de processamento e apresentação de azeitonas de mesa tais como a azeitona galega mista, as “alcaparras” produzidas na zona de Trás-os-Montes, a azeitona madura desidratada em camadas de sal e a azeitona verde britada, ambas características da região do Algarve (tabela 1.II) (Adaptada dos autores Alves, 2010; Nogueira, 2012).

**Tabela 1.II - Processamento da azeitona verde britada**



**Azeitonas verdes britadas**

- Azeitonas da cultivar Maçanilha
- A colheita do fruto antes da sua completa maturação quando possui cor verde.
- Azeitonas submetidas a esmagamento de modo a não quebrar o caroço.
- Os frutos esmagados podem ser submetidos a lavagens com água, sendo posteriormente imersos em salmouras (NaCl 5-10% (p/v))
- Durante a fermentação o pH da azeitona situa-se em valores próximos de 4,5 e a acidez atinge níveis de 0,3-0,6% expresso em ácido láctico.
- Microbiota predominante: Bactérias Gram-Negativas (vão desaparecendo ao longo da fermentação) e leveduras que subsistem até ao final do processo.
- É efetuada uma escolha das azeitonas de modo a que sejam eliminadas as que possuem defeitos (tamanho, cor, entre outras).
- Embalamento e posterior comercialização das azeitonas

A formação do aroma e da textura características das azeitonas de mesa estão diretamente relacionados com os microrganismos e a sua dinâmica durante o processo fermentativo. O equilíbrio entre os compostos voláteis formados e a microbiota das azeitonas confere as características que as tornam alimento num dos produtos fermentados mais consumidos mundialmente.

#### **1.4. Microrganismos no processo fermentativo das azeitonas de mesa**

A fermentação que ocorre na produção das azeitonas de mesa apresenta-se como um processo natural e “espontâneo” que resulta da atividade da microbiota nativa – leveduras e bactérias ácido-láticas – com uma variedade de microrganismos que contaminam o produto e provêm de diversas fontes (Abriouel *et al*, 2011). Embora a fermentação das azeitonas se apresente como um processo “espontâneo”, este é em simultâneo um método de preservação do alimento. A comercialização de azeitonas de mesa e a constante melhoria das tecnologias de processamento levam à necessidade de um pré-tratamento para a remoção de compostos fenólicos, adição de culturas *starter* e

o controle dos parâmetros da fermentação como a concentração de sal, a temperatura e o grau de anaerobiose de forma a prevenir a contaminação das azeitonas por microrganismos deterioradores/patogênicos (Marquina *et al*, 1992).

A qualidade das azeitonas de mesa, assim como as suas características organolépticas estão fortemente relacionadas com os microrganismos envolvidos no processo fermentativo deste alimento. Os principais grupos de microrganismos presentes e com maior relevância para o produto final desejado são as leveduras, as bactérias ácido-láticas e as bactérias pertencentes ao grupo *Enterobacteriaceae* (Bautista-Gallego *et al*, 2011).

### **1.4.1. Bactérias ácido-láticas**

As bactérias ácido-láticas (BAL) são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e que dependem do seu metabolismo fermentativo para obtenção de energia, uma vez que não possuem cadeias respiratórias completas. Estas bactérias apresentam-se como um grupo de grande diversidade genética que abrange bactérias em forma de bastonete (lactobacilos) e cocos (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Pediococcus*). As bactérias ácido-láticas fermentam os açúcares convertendo-os em ácido láctico. Estas bactérias estão naturalmente presentes em meios ricos em produtos orgânicos como alimentos ou no trato intestinal dos mamíferos. Nos últimos anos tem sido comum utilizar BAL em alimentos nas fermentações de laticínios, carne ou legumes - pepino, azeitonas, entre outros (Hurtado *et al*, 2012).

A fermentação das azeitonas é uma das principais etapas no processamento de azeitonas de mesa. Numa primeira fase, a fermentação é iniciada pela população de bactérias ácido-láticas inicialmente existentes nas azeitonas e também na salmoura, que levam a cabo a bio-transformação dos substratos (principalmente açúcares redutores) em ácidos orgânicos que são libertados para a salmoura (Doulgeraki *et al*, 2013). De um modo geral o principal objetivo dos métodos de processamento de azeitonas não se resume exclusivamente a remover a amargura causada pela oleuropeína, mas também visa garantir a conservação das azeitonas pela ação das BAL, a manutenção das características e a melhoria do produto final (Hurtado *et al*, 2008).

Vários estudos têm vindo a demonstrar que estas bactérias têm uma influência acentuada no aroma das azeitonas de mesa contribuindo para o desenvolvimento das

características organolépticas das azeitonas de mesa (Sabatini e Marsilio, 2008). As BAL têm sido associadas à produção de outros compostos como substâncias antimicrobianas, além de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetilo, péptidos antifúngicos, bacteriocinas, entre outros (Abriouel *et al*, 2013).

A população inicial de bactérias ácido-láticas em azeitonas é diversa, mas existe uma predominância de espécies do gênero *Lactobacillus* durante a fermentação, no entanto *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Pediococcus* são gêneros que estão presentes nos frutos e na salmoura, porém em menores concentrações (Randazzo *et al*, 2012; Hurtado *et al*, 2012).

Segundo Hurtado *et al* (2012), as espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* são predominantes nas fermentações de azeitonas. Existem fatores que podem determinar a presença de diferentes lactobacilos como a distribuição geográfica, a cultivar ou o método de processamento que podem exercer uma influência diferente de modo a poderem surgir outras BAL. O número de isolados de *L. plantarum* fazia desta a espécie predominante mas após uma re-identificação dos isolados verificou-se que *L. pentosus* era a espécie preponderante. Estes autores defendem que o tratamento com NaOH é um fator que determina a diferença entre a variedade de BAL nas azeitonas tradicionais, existindo uma maior diversidade microbiana nestas comparativamente ao procedimento de produção industrial com tratamento alcalino.

A principal ação das BAL é a produção de ácido-lático, diminuindo o pH das azeitonas e da salmoura. Esta é de elevada importância uma vez que permite inibir o crescimento de outras bactérias que podem deteriorar as azeitonas (Hurtado *et al*, 2012; Panagou *et al*, 2008). Estas bactérias podem possuir um metabolismo homofermentativo em que ocorre produção, fundamentalmente de ácido láctico ou heterofermentativo, que se caracteriza pela produção de ácido láctico e pequenas quantidades de etanol e outros compostos voláteis que influenciam o aroma final das azeitonas (Doulgeraki *et al*, 2013).

Para que a fermentação decorra nas melhores condições é necessário que o crescimento destas bactérias seja rápido e dentro das condições necessárias para o seu melhor desenvolvimento. As condições iniciais da fermentação devem ser controladas, sendo fundamental assegurar um crescimento estável das BAL. Como tal, existem diversos fatores que influenciam o seu desenvolvimento (tabela 1.III) e que devem ser controlados durante o processo. A quantidade de NaCl e a acidez total e livre são dois

dos parâmetros mais importantes que são controlados durante o processo de fermentação das azeitonas.

Tabela 1.III - Condições que afetam o crescimento de BAL (Hurtado *et al*, 2012)

Acidez (total e livre) e pH dos frutos e da salmoura.

Concentração de NaCl da salmoura.

Temperatura da fermentação.

Tamanho e tipo de cubas onde decorrem as fermentações.

Origem das azeitonas (cultivar e suas condições).

Conteúdo de polifenóis.

Disponibilidade de nutrientes.

A **acidez total e livre** são regularmente controladas de modo a avaliar o sucesso da fermentação. No processo de fermentação natural de azeitonas são regularmente adicionados ácidos orgânicos que permitem estabilizar o pH ótimo de desenvolvimento das bactérias ácido-láticas neste meio (< 4,5). A fermentação ácido-lática de azeitonas de mesa baseia-se na capacidade das BAL produzirem ácido lático, propiciando a diminuição do pH e o aumento da acidez livre. A produção deste ácido torna-se de vital importância uma vez que permite a inibição do crescimento de outras bactérias que podem causar a decomposição e contaminação das azeitonas (Hurtado *et al*, 2012; Abriouel *et al*, 2012). A **concentração de NaCl** é um dos parâmetros mais importantes a controlar de modo a que a fermentação decorra corretamente, assim como para avaliar a sua evolução e em caso de necessidade ajustar os seus valores na salmoura. De um modo geral os valores de NaCl na salmoura variam entre 4-15 % consoante a origem das azeitonas. As concentrações baixas de NaCl na salmoura podem promover o crescimento de BAL e valores mais elevados podem favorecer o desenvolvimento de leveduras (Hurtado *et al*, 2012). A combinação do efeito da diminuição do pH devido à acumulação de ácidos na salmoura com o conseqüente aumento da acidez e o teor de sal

presente na salmoura permitem a garantia de segurança alimentar do produto, além de proporcionar atributos sensoriais desejáveis para o consumidor (Doulgeraki *et al*, 2013). O controle da **temperatura** do processo fermentativo assume igualmente grande importância para que esta decorra com sucesso (Hurtado *et al*, 2012). O uso de temperaturas superiores a 18 °C pode estar relacionado com fermentações mais bem-sucedidas uma vez que a temperaturas baixas o crescimento microbiano é inibido. No estudo efetuado por Tassou *et al* (2002), no qual foram aplicadas várias gamas de temperaturas de fermentação de azeitonas, a temperaturas de 18 e 25 °C verificou-se uma contagem mais elevada de bactérias ácido lácticas nas azeitonas e na salmoura. O aumento da temperatura de fermentação favorece a difusão de nutrientes na salmoura, especialmente durante o período inicial da fermentação. O controle da temperatura e da concentração de NaCl na salmoura são parâmetros importantes que em conjugação garantem uma fermentação bem-sucedida com o crescimento de BAL e a sua manutenção no processo.

As **condições de cultivo** variam de acordo com as práticas locais de produção de azeitonas. Neste sentido a colheita do produto ocorre em estados de maturação diferentes de região para região. A maturação das azeitonas tem influência no crescimento de BAL uma vez que consoante o seu grau o conteúdo em açúcares e polifenóis disponíveis apresenta variações, assim como a permeabilidade da parede celular. As azeitonas de fermentação natural não são submetidas a tratamento alcalino, o que implica a ausência de influência na permeabilidade da parede celular dos frutos e na hidrólise de polifenóis. Embora certos microrganismos possuam a capacidade de degradar a oleuropeína e metabolizar certos compostos, um elevado **conteúdo de polifenóis** nas azeitonas poderá inibir o crescimento de BAL (Hurtado *et al*, 2012).

A **disponibilidade de nutrientes** nas azeitonas podem condicionar a fase inicial da fermentação e o crescimento de microrganismos nela envolvidos (Hurtado *et al*, 2012; Tassou *et al*, 2002).

### 1.4.2. Leveduras

As leveduras são microrganismos eucariontes unicelulares que possuem uma grande importância na indústria alimentar. Encontram-se classificadas no reino Fungi, com aproximadamente 1500 espécies descritas (Arroyo-López *et al*, 2012).

Estes microrganismos são caracterizados por uma ampla dispersão em habitats naturais, sendo no entanto o seu isolamento feito maioritariamente de ambientes ricos em açúcares. Contudo, diversas espécies de leveduras apresentam capacidade de adaptação em ambientes diversificados provenientes da atividade humana. A fermentação de açúcares por parte das leveduras é uma antiga e conhecida tecnologia onde os carboidratos são convertidos em diferentes compostos como água, etanol, dióxido de carbono, entre outros. São muitas as espécies envolvidas na fermentação de alimentos como vinho, cerveja, pão, vegetais, entre outros. Neste sentido, os microrganismos da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são os predominantes, existindo no entanto outras que se afiguram como importantes para as fermentações de alimentos (Arroyo-López *et al*, 2008).

A produção de compostos voláteis para desenvolvimento de aromas desejáveis, biodegradação de compostos fenólicos ou produção de compostos antioxidantes são alguns dos aspetos benéficos das leveduras na fermentação de alimentos. As leveduras também produzem compostos secundários como vitaminas ou antioxidantes (Silva *et al*, 2011).

As leveduras podem, porém, ser microrganismos deterioradores de alimentos ou bebidas com valores baixos de pH, concentrações elevadas de sal e baixas temperaturas, como por exemplo em azeitonas de mesa (Arroyo-López *et al*, 2008). A deterioração microbiológica dos alimentos apresenta-se como algo difícil de definir quando os metabolitos produzidos pelos microrganismos têm contribuição no aroma, sabor e gosto dos alimentos. Das espécies de leveduras conhecidas, apenas algumas são consideradas como deterioradoras dos alimentos. Estas leveduras podem persistir nos alimentos, apresentando incapacidade de crescer e afetar as características dos alimentos, sendo designadas por “acidentais ou inocentes”. No entanto existem leveduras que afetam as características sensoriais dos alimentos tornando-as indesejáveis para o produto final, designadas por leveduras deterioradoras (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Um dos aspetos mais importantes na fermentação de azeitonas de mesa é a sua preservação pela produção de ácido láctico, permitindo que o produto final tenha um pH baixo (<4,3). Esta característica permite a segurança alimentar do produto final uma vez que impede a germinação de esporos de *Clostridium botulinum*, assim como o crescimento por períodos de tempo alargados de *Enterobacteriaceae* (Arroyo-López *et al*, 2012).

As espécies de leveduras mais frequentemente encontradas e identificadas em azeitonas de mesa são *Pichia anomala* (recentemente classificada como *Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia membranaefaciens*, *Candida boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto outras espécies como *Pichia galeiformis*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii* foram identificadas durante todo o processo de fermentação das azeitonas (Tofalo *et al*, 2012; Arroyo-López *et al*, 2012). Em azeitonas pretas maduras, Arroyo-López *et al* (2006) procederam à identificação de leveduras em processos com e sem tratamento alcalino seguindo o método espanhol de produção. Neste sentido, no primeiro processo sem tratamento alcalino, foram identificadas principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia occidentalis* e *Geotrichum candidum*. Em azeitonas tratadas estes autores identificaram maioritariamente *Candida boidinii* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

*Wickerhamomyces anomalus*, *Candida boidinii* e *Debaryomyces etchellsii* revelaram-se predominantes em azeitonas pretas francesas de fermentação natural (Coton *et al*, 2006).

O processamento de azeitonas de mesa Arbequina revelou a presença de *Candida boidinii*, *Candida sorsoba*, *Candida diddensiae*, *Candida membranaefaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranaefaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kluyveri* e *Rhodotorula glutinis* (Hurtado *et al* 2008, 2009). A fermentação espontânea de azeitonas pretas Gregas efetuada por Nisiotou *et al* (2010) revelou a presença predominante de *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces hansenii* e *Aureobasidium pullulans*. Foi também encontrada neste estudo uma nova espécie associada a azeitonas com este tipo de fermentação: *Candida olivae*. Para além dos autores acima referidos outros efetuaram identificação de leveduras em azeitonas de mesa com métodos de produção diferentes recorrendo a análises de RFLP. *C. tropicalis*, *P. galeiformis*, *W. anomalus*, *Debaryomyces etchellsii* entre outras foram isoladas de azeitonas Manzanilla e Gordal e produzidas segundo o método Espanhol (Arroyo-López *et al*, 2012).

Relativamente a trabalhos efetuados em Portugal, Silva *et al* (2011) estudaram a população microbiana em azeitonas verdes salmouradas, identificaram maioritariamente *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida oleophila*. O trabalho efetuado com azeitonas verdes britadas da cultivar Manzanilla revelou uma grande diversidade de leveduras no processo fermentativo no qual as espécies predominantes no final da fermentação foram *Citeromyces matritensis*, *Zygorulaspóra mrakii* e *S. cerevisiae*. Foram também identificadas no decorrer deste trabalho as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida oleophila* e *Candida quercitrusa* (Alves *et al*, 2012).

### 1.4.3. Importância das leveduras nas azeitonas de mesa

As leveduras podem desempenhar um papel positivo durante o processamento da azeitona de mesa (tabela 1.IV), contribuindo para o desenvolvimento de um produto com as características pretendidas. Contudo, a sua atividade pode também ter consequências negativas (tabela 1.V) conferindo ao produto final características indesejáveis.

Tabela 1.IV - Aspectos positivos das leveduras nas azeitona de mesa (Arroyo-López *et al*, 2012)

Aspectos positivos						
Melhoria de características organolépticas das azeitonas	Produção de compostos produtores de aromas	Ação antioxidante e degradação de polifenóis	Atividade antimicrobiana	Propriedades probióticas	Biodegradação de fitatos, biofortificação com folatos e vitaminas	Diminuição dos níveis de colesterol, produção de compostos bioativos e antioxidantes naturais, Biodegradação/ bioabsorção de micotoxinas

A presença de leveduras no processo de fermentação das azeitonas pode conduzir a diversos benefícios levando à melhoria do processo tecnológico da sua produção.

Os aromas desejáveis provêm da produção de compostos tais como glicerol, etanol, álcoois, ésteres e outros compostos voláteis, que podem também ter uma função

importante no aroma das azeitonas. A formação destes compostos, que derivam da degradação de ácidos gordos polinsaturados e de muitos outros, tem sido associada à presença de leveduras no processo de fermentação de azeitonas de mesa (Arroyo-López *et al*, 2012). A degradação de polifenóis é também um fator relevante na presença de leveduras no processamento de azeitonas de mesa. Neste contexto, a degradação da oleuropeína é importante, uma vez que a sua remoção das azeitonas é levada a cabo com hidróxido de sódio de forma a remover o amargor presente nos frutos.

A atividade antioxidante e a função de biocontrolo através da produção de etanol e proteínas ou glicoproteínas com ação tóxica – fator *killer* – de modo a inibir microrganismos indesejáveis (fungos ou bactérias) nos alimentos são outros dos benefícios das leveduras.

As leveduras, para além dos benefícios nas características dos alimentos têm sido reportadas por apresentarem vantagens relativamente à saúde dos consumidores, tais como propriedades probióticas, capacidade de inibição de bactérias patogénicas, biofortificação de vitaminas e folatos (vitamina B9), que permitem a redução de risco de doenças cardiovasculares. A redução dos níveis de colesterol (que constituem um dos maiores fatores de risco de doenças coronárias), a produção de antioxidantes naturais e compostos bioativos e a biodegradação de micotoxinas convertendo-as em compostos não tóxicos são outras das vantagens da presença de leveduras nas azeitonas de mesa (Arroyo-López *et al*, 2012).

Contudo, o crescimento excessivo de leveduras no processo fermentativo de azeitonas pode provocar efeitos indesejáveis (tabela 1.V) durante a fermentação. A sua presença em quantidade superior às BAL pode levar à produção excessiva de CO<sub>2</sub>, que penetra nos frutos originando bolhas de gás. Este efeito denomina-se por “Alambrado”. O uso de quantidades elevadas de NaCl (> 8 %) pode levar ao crescimento excessivo de leveduras em detrimento das BAL durante a fermentação.

Tabela 1.V - Aspectos negativos das leveduras nas azeitona de mesa (Arroyo-López *et al*, 2012)

Aspectos negativos				
Diminuição da produção de ácido quando estão maioritariamente presentes nos processos fermentativos	Produção excessiva de CO <sub>2</sub> danificando os frutos com a formação de bolhas de gás	Produção de enzimas causadoras de amolecimento das azeitonas	Produção de pigmentos, e formação de películas na salmoura	Produção de gás nas embalagens, provocando acumulação de CO <sub>2</sub>

O crescimento de leveduras pode ser mais prejudicial durante o armazenamento das azeitonas de mesa. Apesar dos valores baixos de pH e da elevada concentração de sal nas azeitonas embaladas pode ocorrer o crescimento de leveduras se existirem açúcares residuais ou outros nutrientes que possam propiciar o seu desenvolvimento. Outro aspecto negativo resultante da atividade de leveduras é a capacidade de consumirem o ácido acético ou láctico produzido durante a fermentação (ou adicionados como conservantes) em condições aeróbias, pois não são capazes de utilizar estes ácidos na ausência de oxigénio (Arroyo-López *et al*, 2012).

Para além deste efeito as leveduras podem também provocar aromas e odores desagradáveis e a formação de películas que provocam a turvação da salmoura (Rodríguez-Gómez *et al*, 2010). O amolecimento das azeitonas após a fermentação pode ser causado pela presença de enzimas extracelulares: proteases, xilanases e pectinases (Arroyo-López *et al*, 2012). Este efeito provocado resulta da degradação dos polissacarídeos – atividade polissacarolítica - da parede celular das azeitonas, danificando assim os seus tecidos provocando o amolecimento destas (Hernández *et al*, 2007).

#### 1.4.4. Propriedades biotecnológicas das leveduras

O estudo das propriedades tecnológicas das leveduras tem sido realizado por diversos autores. Estes microrganismos são tidos como possuidores de diversas propriedades com interesse tecnológico e podem ser utilizados no processamento de azeitonas de

mesa, no desenvolvimento de características organoléticas desejáveis ou para outras aplicações industriais (Bautista-Gallego *et al*, 2011; Bevilacqua *et al*, 2009).

Neste contexto, diversos estudos têm sido efetuados, nomeadamente no que se refere à utilização de leveduras como culturas *starter*, tendo por base a capacidade de produção de enzimas extracelulares e as suas propriedades antimicrobianas. As atividades enzimáticas das leveduras isoladas de azeitonas de mesa têm sido amplamente investigadas principalmente no que se refere à atividade de lipases, catalases, pectinases,  $\beta$ -glucosidases e assimilação de oleuropeína. As capacidades antimicrobianas (propriedades *killer*) de diversas espécies de leveduras também têm sido estudadas para o seu uso como potenciais culturas *starter* (Bautista-Gallego *et al*, 2011; Hernández *et al*, 2007; Silva *et al*, 2011).

#### **1.4.4.1. Produção de enzimas extracelulares**

As leveduras têm necessidades nutricionais simples, sendo supridas completamente com uma fonte de carbono, principalmente carboidratos e em especial hexoses como monossacarídeos (glicose, frutose, galactose ou manose) ou dissacarídeos (maltose ou sacarose), apesar de uma grande variedade de outras fontes de carbono (como álcoois e ácidos orgânicos) poder ser utilizada em condições aeróbias. As condições necessárias ao seu desenvolvimento são: uma fonte de nitrogénio (como sal de amónio, nitrato, aminoácidos, peptídeos, ureia, purinas e pirimidinas), fosfato, sulfato, baixas concentrações de potássio, magnésio, cálcio, ferro e zinco e, na maioria dos casos, vitaminas, como biotina, tiamina ou ácido pantoténico (Hatoum *et al*, 2012).

A produção de enzimas extracelulares por parte das leveduras tem vindo a assumir-se de grande importância nos últimos anos. Segue-se uma breve descrição dos diferentes grupos de enzimas e da sua importância no que diz respeito aos alimentos, especificamente às azeitonas de mesa.

##### **a) Lipases e Esterases**

A presença de lipases e esterases têm sido observadas em diversas espécies de leveduras. A produção destas enzimas pode ajudar a melhorar o aroma das azeitonas de mesa fermentadas uma vez que aumentam o conteúdo em ácidos gordos livres que

podem ser precursores de diversos compostos aromáticos tal como o propanol (Arroyo-López *et al*, 2012; Bautista-Gallego *et al*, 2011).

As esterases, em conjunto com as lipases, representam um importante grupo de enzimas associado ao metabolismo e à hidrólise dos lípidos e estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais e em células microbianas. Denominam-se lipases as enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos gordos livres. As esterases são enzimas que atuam em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lípidos, como as acil-hidrolases, colesterol-esterases e tioesterases. Estas enzimas têm grande importância fisiológica, sendo essenciais nos processos metabólicos, como o transporte dos ácidos gordos e a sua oxidação e na síntese de glicéridos e fosfolípidos (Gonçalves, 2007).

Apesar dos elevados custos de produção, estas enzimas têm sido utilizadas principalmente, na adição em detergentes com utilidade doméstica e industrial, na gestão de resíduos, no fabrico de produtos farmacêuticos e pesticidas, no processamento de couros e peles, na remoção de triglicérides e ceras da madeira, na área de química fina, em reações de biotransformações e sínteses orgânicas e para obtenção de monoglicérides, ácidos gordos, agentes biotensioativos, compostos de aroma e sabor e lípidos biomodificados (Vakhlu e Kour, 2006).

#### **b) Hidrólise de oleuropeína**

A hidrólise da oleuropeína, efetuada normalmente recorrendo a tratamentos com NaOH (Métodos Espanhol e Californiano de produção de azeitonas), é importante de modo a ser removido o amargor presente nas azeitonas. A hidrólise deste composto fenólico por parte de leveduras durante o processo de fermentação pode ser relevante uma vez que esta característica indesejável poderá ser removida com recurso a menores quantidades de tratamento alcalino. As leveduras que apresentam esta capacidade (hidrólise da oleuropeína) podem ser utilizadas em culturas *starter* (Bautista-Gallego *et al*, 2011; Psani e Kotzekidou, 2006).

### c) $\beta$ -glucosidase

$\beta$ -glucosidases são enzimas que hidrolisam as ligações  $\beta$ -glucosídicas entre a glucose e grupos aglicona. Estas enzimas encontram-se presentes em frutos como azeitonas ou uvas e apresentam potencial aplicação tecnológica uma vez que podem contribuir para melhorar o perfil sensorial dos alimentos como vinho, cerveja ou sumos de frutas (Barbosa *et al*, 2010).

A atividade positiva de  $\beta$ -glucosidases é importante pois a presença da mesma pode ser utilizada pelas leveduras para a hidrólise da oleuropeína. Estas enzimas têm sido estudadas uma vez que estão relacionadas com a degradação progressiva da oleuropeína e com a libertação de moléculas de glucose (Mazzuca *et al*, 2006).

### d) Catalase

De acordo com os autores Arroyo-López *et al* (2012), Bautista-Gallego *et al* (2011), Silva *et al* (2011) e Hernández *et al* (2007), as leveduras que possuem catalases contribuem para a preservação das azeitonas contra a oxidação de ácidos gordos insaturados e a formação de peróxidos. Diversas espécies de leveduras têm demonstrado esta propriedade em azeitonas de mesa, tais como *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *P. membranaefaciens*, *P. galeiformis*, *P. fermentans*, *K. lactis*, entre outras.

### e) Celulases

As celulases são enzimas que, agindo sinergicamente, hidrolisam a celulose gerando açúcares redutores de baixo peso molecular (Sciessere *et al*, 2011).

As hemiceluloses constituem um grupo de polissacáridos que está associado com a celulose na parede celular das células vegetais. Estes polímeros complexos de carboidratos podem conter xilano como seu componente maioritário e  $\beta$ -1,4-xilano que é maioritariamente encontrado nas paredes celulares secundárias das plantas. A degradação da hemicelulose é efetuada por diversas enzimas e contribuem para enaltecer aromas - por exemplo do vinho (Strauss *et al*, 2001).

Para a que a sua hidrólise seja completa são necessárias as ações de um complexo de três enzimas: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase. Em condições aeróbias os microrganismos segregam uma combinação destas enzimas para o ambiente na presença

dos substratos (Sciessere *et al*, 2011). As endoglucanases ou carboximetil-celulases (CMCase) iniciam a quebra de ligações do início das fibras de celulose. Celobiohidrolase ou exoglucanase são o maior componente presente no sistema de celulases fúngicas constituindo 40-70 % das proteínas de celulases e conseguem hidrolisar a celulose cristalina (Abdel-Fatah *et al*, 2012).

#### **f) Tanases**

Os taninos correspondem a um grupo de polifenóis muito difundido na natureza, sendo abundantes em frutos, folhas e sementes. São considerados metabolitos secundários e diferem de outros compostos pois têm a capacidade de precipitar as proteínas formando complexos fortes, sendo que reagem também com outras macromoléculas como amido, celulose e minerais. Os taninos têm apresentado efeitos tóxicos em animais e apresentam capacidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos. Apesar das propriedades antimicrobianas evidenciadas, muitos fungos, bactérias e leveduras apresentam resistência aos taninos e têm vindo a apresentar mecanismos da sua degradação em ambientes naturais (Pepi *et al*, 2010).

As tanases são enzimas que catalisam a hidrólise dos taninos em moléculas hidrossolúveis tais como o ácido tânico, o galato de metilo, o n-propilo e o galatato de isoamilo. A hidrólise do ácido tânico resulta em ácido gálico e glucose.

Neste sentido, as tanases poderiam ser utilizadas a nível industrial para a degradação de taninos industriais contidos em resíduos industriais, reduzindo os riscos de contaminação ambiental. As fábricas de produção de azeitonas produzem efluentes contendo um grande número de compostos fenólicos incluindo taninos hidrolisáveis e taninos condensados que exigem tratamentos adequados (Pepi *et al*, 2010).

#### **g) Amilases**

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido originando diversos produtos como por exemplo a dextrina e polímeros de menores dimensões constituídos por glucose. Estas enzimas assumem uma grande importância a nível industrial, principalmente na indústria alimentar, mas também com aplicações na indústria de fabrico de papel. Apesar de poderem ser de origem vegetal ou animal, as amilases microbianas são as mais utilizadas industrialmente. Atualmente existem diversas

amilases microbianas disponíveis para utilização industrial apresentando-se como substitutos da hidrólise química do amido na indústria de processamento do amido. Existem dois tipos de amilases: as endoamilases e as exoamilases. As primeiras catalisam a hidrólise de um modo aleatório no interior da molécula de amido, provocando a formação de oligossacáridos lineares e ramificados com vários comprimentos de cadeia. As segundas hidrolisam o amido a partir de uma extremidade não redutora resultando em produtos finais de cadeia curta. Atualmente um grande número de enzimas é conhecido por hidrolisarem a molécula de amido em diversos produtos, sendo necessária uma ação combinada de várias enzimas para a hidrólise completa. As  $\alpha$ -amilases são uma das mais importantes e mais usadas enzimas a nível industrial e apresentam-se amplamente distribuídas em organismos animais, microrganismos e plantas. A utilização de microrganismos para a produção de amilases apresenta-se vantajosa na medida em que a capacidade de produção em massa é económica. Estas derivam de fungos filamentosos, leveduras, bactérias, mas a utilização industrial tem preferido a origem bacteriana ou fúngica desta enzima. A sua aplicação industrial é ampla e alargada aos mais diversos setores industriais tais como a indústria alimentar, têxtil, química ou farmacêutica entre outras (Gupta *et al*, 2003).

#### **h) Xilanses**

O xilano e o xiloglucano são os componentes maioritários presentes nas hemiceluloses das plantas seguidos da celulose. O xilano é um polissacárido heterogéneo que consiste em resíduos de  $\beta$ -1,4 D-xilosil, mas contém também arabinose, ácido glucurónico e ácidos arabinoglucurónico ligados a D-xilose. Devido à sua complexa estrutura, o xilano requer duas enzimas para que a sua hidrólise seja completa, a xilanase ou endoxilanase e a  $\beta$ -xilosidase que é responsável pela hidrólise da maior parte da cadeia. As xilanses são utilizadas em diversas indústrias como a conversão de xilano em xilose, clarificação de sumos, extração de café, óleos vegetais, melhoria da digestibilidade de ração animal, entre outras aplicações. Constituem a maior proporção de hemicelulases e têm um mercado mundial de cerca de 200 milhões de dólares. As xilanses de origem microbiana são induzidas principalmente por xilanos, o que faz com que o custo de produção da enzima seja elevado (Umsza-Guez *et al*, 2011).

### **i) Pectinases**

As pectinas são heteropolissacáridos que representam o maior componente presente na parede celular das plantas. Existe um grande número de enzimas conhecidas por hidrolisarem as pectinas. Estas enzimas são produzidas pelas plantas e por diversos microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras. As pectinases são também conhecidas por enzimas pécticas ou pectinolíticas e estão largamente distribuídas nas plantas. São várias as pectinas produzidas por microrganismos, havendo um crescente interesse nos últimos anos pela produção desta enzima por parte das leveduras. Apenas algumas leveduras apresentam capacidade de produzir esta enzima, destacando-se quatro leveduras pectinolíticas: *Saccharomyces gragilis*, *Torulopsis kefir*, *Candida pseudotropicalis* e *Saccharomyces thermantitonum*. A capacidade das pectinases degradarem as paredes celulares tem sido usada no processamento de vinho e sumos durante as ultimas sete décadas, sendo estas também muito utilizadas na indústria alimentar e outras indústrias transformadoras. Contudo, as preparações enzimáticas de pectinas para uso industrial nunca são puras e contêm diversos contaminantes provenientes de enzimas (celulases, hemicelulases, proteases, esterases e glicosidasas). Estes contaminantes têm efeitos negativos na qualidade dos produtos finais (Alimardani-Theuil *et al*, 2011).

No que diz respeito às azeitonas de mesa, a produção destas enzimas pode resultar em efeitos negativos porque induzem o amolecimento dos tecidos dos frutos, sendo esta uma atividade enzimática indesejável no que concerne à textura das azeitonas e consequentemente à sua qualidade (Arroyo-López *et al*, 2012).

### **j) Proteases**

As proteases, também designadas por peptidases ou enzimas proteolíticas, pertencem a um grupo alargado que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. A quebra total das ligações leva à degradação completa das proteínas em aminoácidos, mas pode ocorrer uma rutura com fins específicos levando à quebra seletiva da proteína. As proteases estão presentes em todos os organismos incluindo vírus, bactérias, protistas, fungos, plantas e animais e são enzimas de alto valor comercial, para as quais se encontram aplicações em diversas indústrias como alimentar, farmacêutica e de produção

dedetergentes e são ferramentas importantes no estudo da estrutura das proteínas e polipeptídeos (Sabotič e Kos, 2012).

As proteases de origem microbiana são as que oferecem uma gama mais ampla de aplicações biotecnológicas, sendo que as proteases alcalinas têm sido utilizadas na indústria de detergentes há mais de 50 anos, permitindo aplicações potenciais na gestão de resíduos domésticos e de indústrias processadoras de alimentos. Na indústria alimentar são usadas na produção de queijo, preparação de hidrolisados de proteínas, criação de dietas ricas em proteínas e amaciamento de carne. Na indústria farmacêutica são usadas como agentes terapêuticos e como aditivos nas preparações farmacêuticas de liberação lenta (Sabotič e Kos, 2012).

#### **1.4.4.2. Ação probiótica de leveduras**

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando são administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao nível da saúde do hospedeiro. Estes microrganismos devem ser seguros para quem os consome e metabolicamente ativos no trato gastrointestinal. O estudo de estirpes de leveduras que apresentam tolerância aos sais de biliar em quantidades elevadas e a baixos valores de pH tem vindo a ser investigada (Arroyo-López *et al*, 2012). A resistência dos microrganismos aos sais de biliar é importante uma vez que para a sua passagem no trato gastrointestinal é necessária a resistência a estes sais (Silva *et al*, 2011).

#### **1.4.4.3. Leveduras: agentes de biocontrolo de alimentos**

As características sensoriais dos alimentos assumem cada vez mais importância na indústria alimentar. A associação de microrganismos como as leveduras à obtenção de propriedades desejáveis, por exemplo nas azeitonas de mesa, tem levado à tentativa de obtenção de culturas *starter* para que os produtos finais possuam uma melhor qualidade. Neste sentido, leveduras como *Candida krusei* e *Pichia membranaefaciens*, que não sendo leveduras causadoras de deterioração no processo de fermentação de azeitonas têm sido consideradas como potenciais constituintes de culturas *starter* a serem aplicadas no processamento industrial de azeitonas de mesa (Hernández *et al*, 2008).

Nos processos fermentativos de alimentos podem surgir leveduras que causam a sua deterioração, pelo que existe a necessidade de efetuar o seu controlo. Os métodos tradicionais para o controlo destes microrganismos, baseiam-se na verificação regular dos valores de pH, acidez e teor de sal. No entanto e devido à sua ineficácia têm surgido variados estudos acerca de métodos alternativos de controlo destas leveduras. Vários autores têm chegado à conclusão que a utilização de leveduras em culturas *starter* poderia conferir proteção mais eficaz contra o efeito negativo de outras leveduras nos processos fermentativos de alimentos (Hernández *et al*, 2008).

O conceito de leveduras *killer* foi reportado pela primeira vez para leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, tendo sido posteriormente alargado a outros géneros e espécies de leveduras provenientes de vários ambientes (Sangorrín *et al*, 2001). As leveduras *killer* (K) produzem uma proteína ou glicoproteína extracelular – fator *killer* – que tem capacidade de matar outras leveduras - leveduras sensíveis. As leveduras neutras apresentam resistência ao fator *killer*, sendo que não o produzem. As estirpes *killer* sensíveis são imunes às suas próprias toxinas mas podem ser sensíveis a outras toxinas de estirpes de leveduras *killer* (Sangorrín *et al*, 2001; Hernández *et al*, 2008).

As leveduras que apresentam fator *killer* são afetadas pelas condições ambientais tais como pH, temperatura e quantidade de sal na salmoura (Hernández *et al*, 2008; Arroyo-López *et al*, 2012). A presença de leveduras *killer* no processamento de azeitonas pode resultar na redução dos requisitos de sal e conservantes necessários, assegurando a estabilidade das embalagens, o que resulta em produtos finais mais saudáveis para os consumidores (Arroyo-López *et al*, 2012).

A produção de vinho é também um processo que é influenciado pela população de leveduras naturalmente presentes no mosto. De modo a melhorar a qualidade do vinho produzido, são em muitos casos adicionadas culturas puras de *S. cerevisiae* isoladas de vinhos produzidos em várias regiões. A seleção das culturas *starter* na produção de vinhos é influenciada por vários fatores, sendo a existência de fenótipo *killer* um deles. Estas leveduras devem fornecer vantagens relativamente às leveduras convencionais utilizadas na produção de vinho, sendo o principal objetivo da sua aplicação neste processo a eliminação de leveduras “selvagens” indesejáveis (Sangorrín *et al*, 2001).

A atividade *killer*, que inicialmente foi apenas associada a leveduras, pode ser aplicada a uma grande variedade de organismos eucarióticos e procarióticos. As propriedades *killer* de leveduras foram alargadas à sua aplicação em controlo de bactérias patogénicas (Meneghim *et al*, 2010). As propriedades probióticas das leveduras têm vindo a ser

amplamente estudadas e a inibição de bactérias patogênicas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, *Escherichia. coli*) por parte de leveduras tem sido observada *C. oleophila*, *K. lactis*, *D. hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *S. cerevisiae* e *P. membranaefaciens* (Arroyo-López *et al*, 2012).

#### **1.4.5. Interação entre leveduras e bactérias ácido-láticas em azeitonas de mesa**

A produção de azeitonas salmouradas em Portugal recorrendo a métodos tradicionais é baseada na fermentação levada a cabo pela microbiota das azeitonas, principalmente as BAL e leveduras que, muitas vezes, permanecem no produto final (Silva *et al*, 2011).

A grande diversidade microbiana presente nas azeitonas tem consequências na segurança, na qualidade e no aroma final das azeitonas de mesa. Arroyo-López *et al*, (2012) afirmam que a microbiota predominante nas azeitonas de mesa pertence aos grupos *Enterobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, bactérias ácido-láticas e leveduras. Os dois primeiros grupos de microrganismos quando presentes por um longo período de tempo são considerados indesejáveis podendo comprometer tanto a qualidade como a segurança das azeitonas.

No sentido contrário as BAL, que têm sido amplamente estudadas nos últimos anos, produzem ácido láctico e substâncias antimicrobianas que originam uma rápida acidificação das azeitonas aumentando a sua qualidade e segurança como produto final. Alguns autores defendem que estas bactérias apresentam capacidade de degradar a oleuropeína, reduzindo o amargor das azeitonas. As leveduras desempenham atividades que podem beneficiar as características organolépticas e nutricionais das azeitonas mas também as podem deteriorar (Arroyo-López *et al*, 2012).

As azeitonas de mesa representam um habitat complexo onde existe uma co-interação entre estes dois grupos de microrganismos e que é desenvolvido durante o processo de fermentação (Tofalo *et al*, 2013). Apesar de ser reconhecido que as leveduras têm um papel de menor relevância, especialmente nas azeitonas submetidas a tratamento alcalino, estas apresentam um efeito benéfico no desenvolvimento de aromas e no desenvolvimento do crescimento de BAL. No caso de serem adicionadas leveduras como cultura *starter* pode verificar-se a inibição de leveduras que contaminam o

produto final e também de microrganismos patogénicos, favorecendo o crescimento e desenvolvimento de BAL. A adição de BAL como *starter* para produção de azeitonas de mesa permite uma competição destas com leveduras selvagens, como verificado na produção de azeitonas pretas. Tem sido observado, por exemplo, que *Lactobacillus pentosus* apresenta um melhor desenvolvimento quando em associação com *S. cerevisiae* na produção de azeitonas de mesa verdes, no qual a produção de ácido láctico aumentou ligeiramente. Numa fase inicial da fermentação o metabolismo das leveduras pode produzir fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento de BAL (Hurtado *et al*, 2012).

Arroyo-López *et al*, (2008) observaram a melhoria do crescimento de *L. plantarum* quando inoculada com *D. hansenii* em sumo de azeitona. As leveduras são microrganismos que produzem substâncias como vitaminas, aminoácidos e purinas e quebram as ligações complexas dos carboidratos, atividades fundamentais para o crescimento de organismos do género *Lactobacillus*. Por outro lado, as BAL segregam ácido láctico que provoca a diminuição do pH inibindo o crescimento de microrganismos patogénicos, promovendo por outro lado o crescimento das leveduras, pelo que a interação destes dois grupos de microrganismos pode exercer uma importante função na qualidade e preservação do produto final.

## **1.5. Qualidade microbiológica das azeitonas de mesa**

Relativamente à qualidade microbiológica das azeitonas de mesa como produto final não existem critérios definidos, nem parâmetros especificamente determinados para a sua avaliação. Contudo, foi criada legislação em que foram estabelecidos valores mínimos relativos à higiene das azeitonas de mesa. Neste sentido o produto final deve apresentar-se isento de microrganismos e parasitas em quantidades que possam apresentar riscos para a saúde do consumidor ou substâncias provenientes de microrganismos possivelmente patogénicos (IOOC, 2004).

Segundo o IOOC 2004 as azeitonas de mesa produzidas em salmoura podem conter no produto final bactérias ácido-láticas ou leveduras que são fundamentais no processo de fermentação. Os valores destes microrganismos em meio seletivo podem ser até  $10^9$  ufc/mL de salmoura ou ufc/g de azeitonas. As azeitonas podem ser também preservadas com recurso à esterilização térmica (azeitonas pretas oxidadas) que deverá

ser suficientemente eficaz, tanto em tempo de esterilização como em temperatura, para que se proceda à eliminação de esporos de *Clostridium botulinum*. Esta bactéria configura-se como um dos principais riscos microbiológicos nas azeitonas de mesa sendo por isso necessária a eliminação das células e dos esporos. A contaminação por *C. botulinum*, apesar de ser considerada para limites de segurança microbiológica, tem apresentado poucas incidências (Pereira *et al*, 2008). Uma das principais preocupações relativamente à contaminação de alimentos concentra-se na presença de microrganismos patogénicos que apresentem capacidade de sobreviver no produto final, o que no caso das azeitonas de mesa é contrariado pela presença de sal, valor de pH e pela acidez. No entanto alguns microrganismos podem resistir a estas condições tal como é o caso de *E. coli* O157:H7. Esta bactéria é responsável pela incidência de colites hemorrágicas e pelo síndrome hemolítico urémico e tem sido estudada por apresentar resistência às condições ácidas dos alimentos fermentados de origem vegetal e em molhos de saladas, por exemplo. Têm sido encontradas evidências de contaminação por este microrganismo em vegetais frescos maioritariamente provenientes de produção com fertilizante animal, e em águas contaminadas. Tem sido também encontrada em saladas, sumos de fruta e sobrevive ao fluido gástrico e alimentos ácidos (Spyropoulou *et al*, 2001).

No trabalho realizado por Pereira *et al* (2008), no qual analisaram azeitonas comercializadas em Portugal, verificaram que relativamente a microrganismos indicadores de contaminação foram detetados coliformes totais apenas em amostras de azeitonas em salmoura provenientes do mercado tradicional. A sua presença é indicadora de condições de higiene deficitárias, havendo incumprimento das boas práticas de higiene na produção. A presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores, assim como a presença dos microrganismos patogénicos *Salmonella* e *S. aureus* foram também parâmetros estudados pelos autores. Relativamente aos primeiros foram detetados na maioria das amostras apresentando-se ainda em amostras esterilizadas e pasteurizadas. A sua presença em azeitonas pasteurizadas deve-se às fermentações em condições anaeróbicas ou à resistência dos esporos ao processamento térmico. Contudo, os seus esporos podem ser destruídos recorrendo a um processo de esterilização adequado. Nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação com *Salmonella*. A presença de *S. aureus* foi detetada em pequenas quantidades na salmoura de algumas amostras.

No trabalho efetuado por Medina *et al* (2013), os autores estudaram a sobrevivência de bactérias patogénicas em azeitonas de mesa sob condições controladas tais como acidez, pH, temperatura (temperatura ambiente ou de refrigeração:  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), percentagem de sal (NaCl), disponibilidade de oxigénio (condições de aerobiose diferentes), entre outras. *L. monocytogenes* resistiu mais tempo que as restantes, porém, nem todas revelaram conter *L. monocytogenes* verificando-se a possibilidade de existência de mais organismos pertencentes ao género *Listeria*, tal como *Listeria innocua* (Scifò *et al*, 2009).

Quando a fermentação das azeitonas decorre com sucesso e o produto final possui valores dentro dos parâmetros estabelecidos, as azeitonas de mesa não apresentam necessidade de utilização de conservantes ou de tratamento térmico (Argyri *et al*, 2013). No entanto a fermentação tradicional das azeitonas é um processo que poderá conter alguns microrganismos indesejáveis e propiciar o aparecimento ou a resistência de algumas bactérias que podem causar doenças de origem alimentar (Medina *et al*, 2013; Argyri *et al*, 2013).

A fermentação em condições adequadas de higiene, além do controlo dos parâmetros fundamentais do processo fermentativo, leva a uma fermentação bem-sucedida e sem ocorrência de perigos microbiológicos. No entanto tem sido pouco estudada a ocorrência de contaminações por microrganismos patogénicos na fase pós processamento, após o embalamento das azeitonas. Um estudo efetuado em azeitonas pretas submetidas a fermentação natural embaladas sem salmoura foi efetuado por Grounta *et al* 2013. Estes autores defendem que a ausência da salmoura, de modo a facilitar o consumo das azeitonas por parte dos consumidores pode constituir um fator de risco acrescido para a contaminação das azeitonas por microrganismos patogénicos. Após a realização do estudo concluíram que as azeitonas pretas não apresentam condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus* (Grounta *et al*, 2013).

Argyri *et al*, (2013) concluiu no seu estudo que alguns microrganismos patogénicos podem sobreviver em ambientes com valores de pH  $< 4,2$  durante períodos de tempo alargados. A presença deste tipo de microrganismos em produtos como as azeitonas de mesa pode ser reduzida ou eliminada com recurso a Boas Práticas de Fabrico de modo a reduzir o risco de contaminações cruzadas durante o processo de produtivo. Juntamente com um processo fermentativo bem sucedido com o devido controlo dos parâmetros principais já referidos, as azeitonas de mesa apresentam-se como um alimento seguro

constituindo um ambiente inapropriado para o crescimento de microrganismos patogénicos, passíveis de causarem doenças de origem alimentar.

## 1.6. Objetivos do trabalho

---

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em conhecer a população microbiana de processos fermentativos e caracterizá-la no que diz respeito a diversas propriedades fisiológicas com potencial para aplicação tecnológica na indústria alimentar ou em outras indústrias.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de produção de enzimas extracelulares e a capacidade antimicrobiana de um grupo de 41 microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitona de mesa verde britada da variedade Maçanilha, tendo-se definido os seguintes objetivos específicos:

- a) Detetar a capacidade de produção de enzimas extracelulares, especificamente, lipases, esterases, amilases, pectinases, celulases, glicosidasas, proteases e fenolases, através da realização de um rastreio primário utilizando os isolados obtidos;
- b) Detetar a capacidade dos isolados inibirem o crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Cronobacter sakazakii*;
- c) Determinar a capacidade dos microrganismos isolados inibirem o crescimento de outras leveduras (atividade *killer*).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Microrganismos

O material biológico utilizado no presente trabalho consistiu em isolados de microrganismos provenientes de processos fermentativos destinados à produção industrial de azeitonas verdes britadas da cultivar Maçanilha (Alves *et al*, 2012), que se encontram descritos na tabela 2.I. Estes microrganismos pertencem à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Alimentar da Universidade do Algarve.

Tabela 2.I – Microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitonas verdes britadas

Microrganismos	Nº de isolados obtidos
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2
<i>Candida boidinii</i>	3
<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
<i>Citeromyces matritensis</i>	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1
Isolado Não Identificado	1
<b>Total</b>	<b>41</b>

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos microrganismos da tabela 2.I em relação a bactérias, utilizaram-se os microrganismos referidos na tabela 2.II.

Tabela 2.II - Bactérias utilizadas [ATCC – American Type Culture Collection]

Bactéria	Origem
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 2593
<i>Listeria innocua</i>	Universidade do Algarve
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC BAA 284
<i>Listeria monocytogenes</i>	Universidade do Algarve

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitona em relação a outras leveduras utilizaram-se as espécies *Zygorulaspóra mrakii*, *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 2.III).

A sensibilidade a toxinas *killer* foi testada utilizando estirpes referenciadas por produzirem toxinas específicas – K2, K5, K8, K9 e K10 (tabela 2.IV).

Tabela 2.III - Leveduras sensíveis

Levedura	Referência de origem
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC 1006
<i>Saccharomyces bayanus</i>	PYCC 4456
<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	129 – Universidade do Algarve

Tabela 2.IV – Leveduras produtoras de toxinas específicas (K) com capacidade *killer* conhecida

Levedura	Referência de origem
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K2)	NCYC 738
<i>Pichia anomala</i> (K5)	NCYC 434
<i>Pichia anomala</i> (K8)	NCYC435
<i>Williopsis saturnus</i> (K9)	NCYC 500
<i>Kluyveromyces lactis</i> (K10)	NCYC K10

### 2.1.1. Preparação dos inóculos

- Leveduras

Os isolados de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida boidinii*, *Zygorulaspóra mrakii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Citeromyces matritensis* e *Aureobasidium pullulans* cresceram em meio de cultura Yeast Malt agar (YM) e foram incubadas a 25 °C durante 48-72 h. Este procedimento repetiu-se, sempre que necessário, de modo a obter culturas microbianas com 24-48 h. O meio de cultura YM agar apresentou a seguinte composição: 0,5 % peptona de carne, 0,3 % extrato de levedura, 0,3 % de extrato de malte, 1 % (p/v) de glucose e 2 % (p/v) de agar. O meio de cultura preparado foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- Bactérias

O crescimento das bactérias foi efetuado em meio de Tryptic Soy Agar (TSA) com a composição seguinte: proteína de caseína (15,0 g/L), peptona de soja (5,0 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e agar (15,0 g/L) com um valor de pH de 7,3. O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

As bactérias (tabela 2.II) foram repicadas para o meio TSA e incubadas a 37 °C durante 24 h sempre que necessário.

## 2.2. Produção de enzimas extracelulares

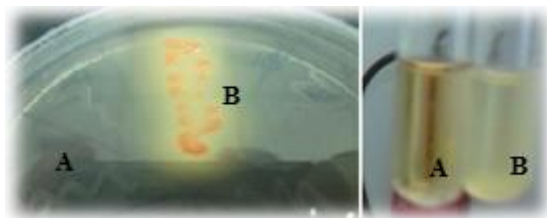
A primeira etapa do presente trabalho experimental consistiu no estudo da capacidade de produção de determinadas enzimas extracelulares por parte dos microrganismos isolados da fermentação industrial com vista à produção de azeitonas de mesa. Para tal, foram utilizados meios de cultura de constituição específica de modo a averiguar a presença (+) ou ausência (-) de atividade enzimática. Todos os ensaios foram repetidos 3 vezes.

### 2.2.1. Utilização de Oleuropeína

A capacidade dos isolados microbianos utilizarem a oleuropeína como única fonte de carbono e energia foi estudada num de meio de cultura suplementado com oleuropeína, com a seguinte composição: YNB (0,67 % (p/v)), oleuropeína (0,5 % (p/v)) e agar (2 % (p/v)), com um valor de pH  $5 \pm 0,2$  (Psani e Kotzekidou, 2006).

Para a preparação do meio, pesou-se o agar e diluiu-se em água desmineralizada. Aqueceu-se com agitação até à fervura e esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

A oleuropeína (0,5 g/100 mL de meio) foi diluída em YNB, esterilizado por filtração (0,45  $\mu$ m), e adicionada ao agar previamente esterilizado. Efetuou-se a junção dos componentes e distribuiu-se o meio em caixas de Petri, que foram inoculadas e incubadas a 25 °C durante um período de 8-10 dias. O crescimento das leveduras no meio de cultura indica que os isolados conseguem utilizar a oleuropeína como única fonte de carbono e energia (Figura 2.1). Este ensaio foi também realizado em meio de cultura líquido.



**Figura 2.1 - Utilização de oleuropeína como fonte única de carbono e energia: A – resultado negativo; B – resultado positivo.**

### 2.2.2. Produção de $\beta$ glucosidase

A produção de  $\beta$ -glucosidases foi estudada num meio de cultura com arbutina o qual apresentou a seguinte composição: YNB (0.67 % (p/v)), arbutina (0,5 % (p/v)) e agar (2 % (p/v)), com um valor de pH  $5\pm 0,2$ .

O agar e a arbutina foram misturados e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e adicionados ao YNB esterilizado por filtração. Posteriormente, preparou-se uma solução de citrato de ferro amónia (1 % (p/v)) que foi esterilizada por filtração (0,45  $\mu$ m). Por cada 100 mL de meio de cultura adicionaram-se 2 ml de solução. Após a inoculação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 25 °C durante um período de 5-8 dias. O aparecimento de um halo castanho escuro (Figura 2.2) indica a presença de  $\beta$ -glucosidases (Bautista-Gallego *et al*, 2011).

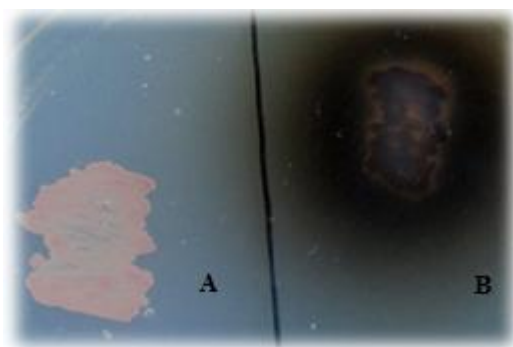


Figura 2.2 - Hidrólise de arbutina: A – resultado negativo; B – resultado positivo.

### 2.2.3. Catalases

A presença de catalases nos microrganismos em estudo foi detetada pela adição de peróxido de hidrogénio a 3 % (v/v) diretamente sobre as células colocadas numa lâmina.

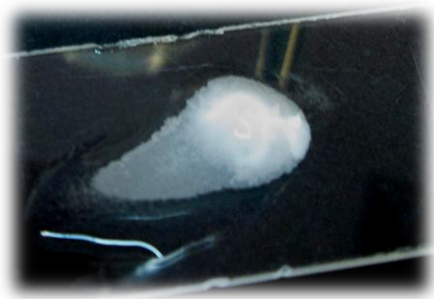


Figura 2.3 - Resultado positivo para a atividade de catalases.

Este procedimento foi efetuado segundo o método descrito por Bautista-Gallego (2011), baseado no método de Whittenbury (1964).

A presença de catalases é evidenciada pela libertação de bolhas de oxigénio (Figura 2.3), tendo sido os resultados expressos como presença (+) ou ausência (-) destes enzimas.

#### 2.2.4. Xilanases

A produção de xilanases foi detetada num meio de cultura com a seguinte composição: YNB (0,67 % (p/v)), xilano (0,5 % (p/v)), peptona (0,5 % (p/v)), agar (2 % (p/v)) com um valor de pH  $5\pm 0,2$ .

Efetou-se a junção dos componentes desidratados em água desmineralizada e esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Adicionou-se o YNB esterilizado por filtração e distribuiu-se o meio em caixas de Petri.

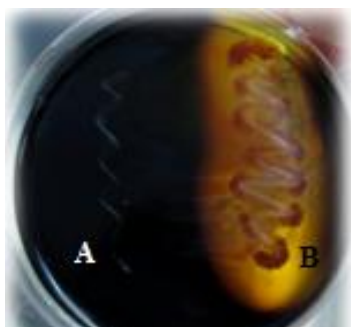
As placas de Petri foram inoculadas com culturas jovens (48 horas) e colocadas em estufa a 25 °C durante cerca de 10 dias. A atividade das xilanases identifica-se com a presença de um halo transparente em torno das colónias (Hernández *et al*, 2007).

#### 2.2.5. Amilases

A produção de amilases foi detetada num meio de cultura com a seguinte composição: YNB (0,67 % (p/v)), amido solúvel (0,2 % (p/v)), agar (2 % (p/v)), com um valor de pH  $5\pm 0,2$ .

Efetou-se a junção dos componentes desidratados em água desmineralizada e esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Adicionou-se o YNB esterilizado por filtração e distribuiu-se o meio completo em caixas de Petri.

As placas foram inoculadas e incubadas a 25 °C durante 5 dias. Após o crescimento das culturas, estas foram inundadas com uma solução de Lugol durante 1-2 minutos, que foi posteriormente escorrida. A presença de halos amarelados em torno das colónias indica a produção de amilases (Figura 2.4) (Voronovsky *et al*, 2009).



**Figura 2.4 - Produção de amilases: A – resultado negativo; B – resultado positivo.**

### 2.2.6. Pectinases

A produção de pectinases foi detetada num meio de cultura que apresentou a seguinte composição: YNB (0,67 % (p/v)), pectina (0,5 % (p/v)), agar (2 % (p/v)), com um valor de pH  $5,0 \pm 0,2$ , baseado no método referenciado por Hernández *et al* (2007).

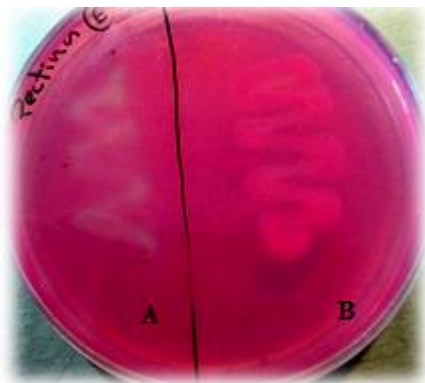


Figura 2.5 - Hidrólise da pectina: A – resultado positivo; B – resultado negativo

O agar e a pectina foram diluídos em água desmineralizada e esterilizados em autoclave separadamente a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se o YNB, esterilizado por filtração, e distribuiu-se o meio em caixas de Petri.

As placas foram inoculadas com as culturas jovens (48 horas) e incubadas a 25 °C durante 5-8 dias. Após

o crescimento microbiano, as placas foram inundadas com solução de vermelho de ruténio (0,05 %) e colocadas a 4 °C durante 2 horas. Depois de escorrer a solução corante, observou-se a presença de descoloração ou intensificação de cor à volta das colónias. A presença da pectina liase é indicada pela descoloração (Figura 2.5) e a atividade da pectina metil esterase é indicada por uma coloração mais intensa (Hernández *et al*, 2007).

### 2.2.7. Lipases e Esterases

#### a) Lipases

A deteção da atividade lipolítica dos microrganismos foi efetuada num meio de cultura com a seguinte composição: glucose (0,1 %), peptona (1 % (p/v)), cloreto de sódio (0,5 % (p/v)), agar (2 % (p/v)), azeite (5 % (v/v)), com um valor de pH  $5 \pm 0,2$  (Marquina *et al*, 1992).

Os componentes do meio, com exceção do azeite, foram misturados e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se com agitação vigorosa, 5 % (v/v) do azeite de baixo índice de acidez, previamente fervido, de modo a originar uma mistura homogénea. O meio foi distribuído em caixas de Petri e inoculado com culturas jovens (48 horas). Após a inoculação as placas foram incubadas a 25 °C durante 5-8 dias. Decorrido o tempo de incubação, as culturas microbianas foram

cobertas com uma solução de sulfato de cobre saturada e colocadas a 4 °C durante uma hora.

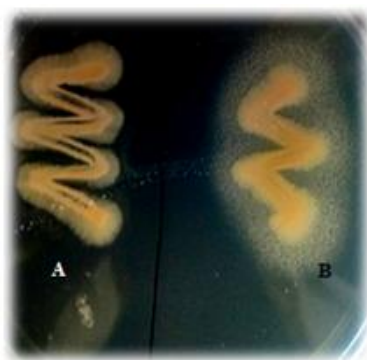
O aparecimento de coloração azul intensa no local de crescimento das colónias indica atividade lipolítica positiva devido à formação de sais de cobre de ácidos gordos insolúveis resultantes da libertação de ácidos gordos após a lipólise (Psani e Kotzekidou, 2006).

### **b) Esterases**

A atividade esterásica foi detetada num meio de cultura com Tween 80 (polioxietileno-sorbitano-monoleato), com a seguinte composição: peptona (1 % (p/v)), cloreto de sódio (0,5 % (p/v)), cloreto de cálcio (0,01 %), agar (2 % (p/v)), Tween 80 (1 % (p/v)) e um valor de pH 5,0 ±0,2.

Os componentes do meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Separadamente, ferveu-se o Tween 80 durante 5 minutos. Este foi adicionado ao meio esterilizado e distribuído em caixas de Petri.

Após a inoculação das placas com culturas microbianas com 48 horas, procedeu-se à incubação a 25 °C durante 7-10 dias. O aparecimento de halos opacos em torno das colónias é indicativo de atividade esterásica positiva (Figura 2.6) (Wang *et al*, 2008).



**Figura 2.6 - Atividade esterásica: A – resultado negativo; B – resultado positivo.**

### **2.2.8. Tolerância aos sais de bÍlis**

O estudo do potencial probiótico dos microrganismos isolados da fermentação industrial da azeitona foi realizado num meio de cultura com sais de bÍlis. Este meio de cultura apresentou a seguinte composição: glucose (0,1 %), extrato de levedura (0,5 % (p/v)),

peptona (1 % (p/v)), agar (2 % (p/v)), extrato de bÍlis (Sigma) (0,5 % (p/v)) com um valor de pH de  $7\pm 0,2$  (Psomas *et al*, 2001).

Os componentes do meio foram misturados e esterilizados em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos. Os sais de bÍlis foram dissolvidos em Água desmineralizada e esterilizados por filtração (0,45 µm). Posteriormente, foram adicionados ao meio estéril, o qual foi distribuído em caixas de Petri. As placas foram inoculadas e incubadas a 25 °C durante 72 horas. O crescimento dos microrganismos no meio de cultura e o aparecimento de halos em torno das colónias indica a tolerância à bÍlis (Psomas *et al*, 2001).

### **2.2.9. Proteases**

A atividade proteolítica foi detetada nos meios de cultura de caseína (contendo leite em pó) e meio de cultura de gelatina.

#### **a) Meio de cultura de caseína (leite em pó)**

A detecção da produção de proteases realizou-se num meio de cultura Tryptone Soy Agar (TSA) (proteína de caseína [15 g/L], peptona de soja [5 g/L], cloreto de sódio [5 g/L] e agar [15 g/L]) (Sharlau), suplementado com leite em pó (Skim milk poder, Himmedia), com um valor de pH de  $5\pm 0,2$ .

Para a preparação deste meio de cultura, dissolveu-se em metade do volume de Água, o meio TSA que foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Em separado, dissolveu-se o leite em pó no restante volume de Água o qual foi esterilizado em autoclave durante 10 minutos a 121 °C.

Os componentes foram misturados e distribuídos em caixas de Petri. Após a inoculação das placas com culturas jovens (48h), estas foram incubadas a 25 °C durante 5-10 dias. A atividade proteásica positiva revela-se através do aparecimento de halos transparentes em torno das colónias (Figura 2.7) (Strauss *et al*, 2001).



**Figura 2.7 - Atividade proteasica no meio de cultura de caseína: A – resultado positivoa; B – resultado negativo.**

### **b) Meio de cultura de gelatina**

A atividade proteasica foi estudada num meio de cultura composto por Nutrient Agar e gelatina (0,5 % (p/v)), com um valor de pH  $6\pm 0,2$ .

O meio Nutrient Agar e a gelatina foram esterilizados em autoclave, separadamente, a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Efetuou-se a junção dos dois componentes após o tratamento térmico e distribuiu-se o meio completo em caixas de Petri. Estas foram inoculadas e incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 6 dias.

Após o crescimento microbiano, foi preparada uma solução saturada de sulfato de amónio, a qual foi vertida para as placas. A atividade proteasica em meio de gelatina foi revelada pelo aparecimento de halos transparentes em torno das colónias (Figura 2.8).



**Figura 2.8 - Atividade proteasica no meio de cultura de gelatina.**

### 2.2.10. Fenolases



Figura 2.9 - Produção de fenolases: A – resultado positivo; B- resultado negativo

A detecção de atividade fenolásica nos isolados de microrganismos foi realizada num meio de cultura contendo ácido tânico com a seguinte composição: extrato de malte (1,5 % (p/v)), agar (2 % (p/v)) e ácido tânico (0,5 % (p/v)), com um valor de pH  $5,5 \pm 0,2$ .

Misturou-se o extrato de malte e o agar numa parte da água desmineralizada e esterilizou-se em

autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Dissolveu-se o ácido tânico no restante volume de água desmineralizada estéril e adicionou-se ao meio de cultura esterilizado. Distribuiu-se em caixas de Petri e inoculou-se com os isolados de microrganismos provenientes de fermentação industrial de azeitonas. As placas foram incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5-10 dias. A capacidade de produção de tanases identificou-se através do aparecimento de um halo transparente em torno das colónias (Figura 2.9).

### 2.2.11. Celulases

O estudo da capacidade de produção de celulases foi efetuado num meio de cultura cuja composição foi: YNB (0,67 % (p/v)), carboximetilcelulose (CMC) (0,5 % (p/v)) e agar (2 % (p/v)), com um valor de pH  $5,5 \pm 0,2$  (Strauss *et al*, 2001).

A CMC foi previamente dissolvida em água desmineralizada e adicionada ao agar, tendo-se esterilizado em autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Após o tratamento térmico adicionou-se o YNB, previamente esterilizado por filtração. O meio completo foi distribuído em caixas de Petri que foram inoculadas e incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5-8 dias. Decorrido o período de incubação, as placas foram lavadas com água estéril fria, inundadas com solução de vermelho de Congo (0,03 %) durante 15 minutos e finalmente com uma solução de NaCl (1M) durante mais 15 minutos. As zonas de hidrólise surgem com auréolas amareladas, enquanto a CMC permanece vermelha (Figura 2.10) (Strauss *et al*, 2001).

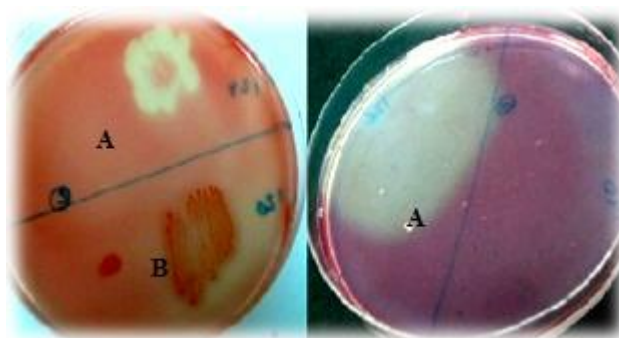


Figura 2.10 - Produção de celulases: A – resultado positivo; B – resultado negativo.

## 2.3. Propriedades antimicrobianas

### 2.3.1. Atividade antimicrobiana sobre bactérias

A determinação da atividade antimicrobiana, sobre as bactérias Gram + e Gram - dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona foi determinada em meio de cultura TSA suplementado com 1 % (p/v) de extrato de levedura e 1 % (p/v) de glucose. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Após a esterilização, foi distribuído em caixas de Petri estéreis.

Efetou-se uma suspensão celular, em tubos com 5 mL de solução de Ringer, de cada uma das bactérias crescidas em meio de cultura TSA, durante 24 horas. Utilizou-se o padrão McFarland Standard [0,5], para a aferição da concentração das bactérias em suspensão. Os tubos com as suspensões de bactérias foram devidamente agitados e comparados com o padrão McFarland [0,5]. Estas suspensões foram inoculadas por espalhamento com zaragatoa em placas com meio TSA com extrato de levedura (1 % (p/v)) e glucose (1 % (p/v)). Após a inoculação das bactérias, foram colocadas sobre as mesmas os 41 isolados em aglomerados de células.

As placas foram incubadas a 25 °C durante 24 horas e colocadas a 20 °C durante mais 24 horas. Os resultados obtidos foram registados após a incubação durante 48 horas. Esta propriedade foi também estudada na presença de 4 % (p/v) e 6 % (p/v) de NaCl. Todos os ensaios foram repetidos 3 vezes.

A inibição do crescimento das bactérias observa-se pela presença de um halo transparente em torno dos aglomerados de células dos isolados em estudo. As dimensões do halo estão relacionadas com a eficiência da inibição.

### **2.3.2. Atividade antimicrobiana sobre leveduras sensíveis e sensibilidade em relação a leveduras com capacidade *killer* conhecida**

O estudo da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona sobre leveduras foi realizado com recurso a espécies sensíveis (tabela 2.III). Os mesmos isolados foram testados relativamente à sua sensibilidade em relação a leveduras *killer* de referência (K2, K5, K8, K9 e K10). (Tabela 2.IV).

- **Meio de cultura**

O meio de cultura utilizado (YMAM) para a determinação da atividade *killer* apresentou a seguinte composição: 0,5 % peptona de carne, 0,3 % extrato de levedura, 0,3 % de extrato de malte, 1 % (p/v) de glucose e 2 % (p/v) de agar. Ao meio de cultura foi adicionada uma solução tampão de citrato de sódio 0,2 M (ácido cítrico e fosfato disódico), suplementada com azul-de-metileno 0,003 %, com um valor de pH de  $4 \pm 0,1$ .

Para a preparação do meio de cultura juntaram-se os ingredientes para a obtenção da primeira parte do meio: peptona de carne, extrato de levedura, extrato de malte, glucose e agar de forma a obter concentração dupla. Em separado, foi preparada uma solução tampão de citrato de sódio à qual foram adicionados 3 mL de solução de azul-de-metileno (1 % (p/v)). As duas soluções foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Juntaram-se as duas soluções e o meio completo foi distribuído em caixas de Petri (Marquina *et al*, 1992; Santo *et al*, 2012). O meio de cultura foi preparado com vista à obtenção de diferentes concentrações de NaCl (0 %, 4 % e 6 % (p/v)).

## 1) Sensibilidade *killer* em relação a leveduras *killer* de referência

O estudo dos microrganismos isolados de fermentação industrial da azeitona em relação a estirpes de referência cuja atividade *killer* é conhecida (tabela 2.IV) foi realizado de modo a testar a sua sensibilidade. Efetuou-se uma suspensão celular dos isolados em tubos contendo 5 mL de solução de Ringer. Para a preparação e aferição de turvação da suspensão foi utilizado um cartão de riscas pretas. Estas suspensões foram inoculadas, utilizando zaragatoas estéreis, em cada placa de YM-MB. Posteriormente, as leveduras com capacidade antimicrobiana conhecida (tabela 2.IV) foram colocadas sobre as placas em aglomerados de células (Figura 2.11). O ensaio foi realizado na presença de concentrações de NaCl variáveis (0 %, 4 % (p/v) e 6 % (p/v)).

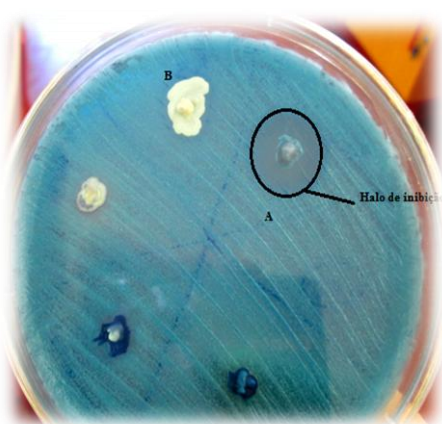


Figura 2.11 - Atividade *killer* de leveduras: A - positivo; B - Negativo

As placas foram incubadas a 20 °C durante 5-10 dias. Após o tempo de incubação, a atividade *killer* das leveduras foi determinada pela presença de halos de inibição do crescimento transparentes circundadas por células coradas de azul-de-metileno, em torno dos aglomerados de células. A ausência do halo descrito indicia a imunidade à proteína segregada pelas leveduras com atividade *killer* (Santo *et al*, 2012, Marquina *et al*, 1992). Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

## 2) Determinação da atividade *killer* sobre leveduras sensíveis

Para determinar a atividade *killer* dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitonas utilizaram-se três leveduras sensíveis: *Z. mrakii*, *S. bayanus* e *S. cerevisiae* que foram inoculadas em YM agar e incubadas a 25 °C durante 48 horas.

As leveduras sensíveis foram utilizadas para realizar suspensões celulares, colocando-se uma ansada de células num tubo contendo 5 mL de Solução de Ringer até se obter a turvação desejada. Esta suspensão foi utilizada para inocular a superfície das placas contendo meio YMAM, por espalhamento com uma zaragatoa estéril sobre a qual se inocularam os microrganismos em estudo (41 isolados), formando aglomerados de

células. O ensaio foi testado na presença de concentrações de NaCl variáveis (0 %, 4 % (p/v) e 6 % (p/v)).

As placas foram incubadas a 20 °C durante 5-10 dias. Após o tempo de incubação, a atividade *killer* foi determinada pela presença de um halo transparente rodeada por células coradas de azul-de-metileno em torno dos aglomerados de células. A ausência do halo descrito indicia a ausência de proteína segregada por microrganismos com atividade *killer* (Marquina *et al*, 1992; Santo *et al*, 2012). Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

## 3. Resultados e discussão

---

### 3.1. Produção de enzimas extracelulares

Os resultados do rastreio da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares dos microrganismos isoladas da fermentação industrial de azeitona verde britada encontram-se resumidos nas tabelas 3.I, 3.II, 3.III e 3.IV.

Tabela 3.I - Aividades enzimáticas dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitonas (Amilases, Pectinases, Xilanases, Celulases) \* atividade enzimática fraca.

	Amilases	Pectinases	Xilanases	Celulases
<i>R. mucilaginosa</i>	0	1 *	0	0
<i>C. boidinii</i>	0	0	0	0
<i>Z. mrakii</i>	0	3	0	0
<i>C. matritensis</i>	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	0	4 *	0	0
<i>A. pullulans</i>	1	1	1*	1
Isolado não identificado	0	0	0	0

Como se pode verificar pela tabela 3.I apenas *Aureobasidium pullulans* produziu amilases, pectinases e celulases (Figura 3.2). No que diz respeito à atividade pectinolítica, para além de *Aureobasidium pullulans*, três isolados de *Zygotryphozospora mrakii*, alguns isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e um dos isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* apresentaram uma atividade pectinolítica pouco relevante (Figura 3.2).

Nenhum dos microrganismos produziu a hidrólise completa do xilano, sendo que *A. pullulans* efetuou uma ligeira utilização deste substrato.

Tabela 3.II - Atividades enzimáticas dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitonas (Lipases, esterases, proteases e catalases) (Os números indicam os isolados com hidrólise completa do substrato).

	Lipases	Esterases	Proteases		Catalases
			Leite	Gelatina	
<i>R. mucilaginosa</i>	0	0	0	0	2
<i>C. boidinii</i>	0	0	0	0	3
<i>Z. mrakii</i>	0	0	0	0	17
<i>C. matritensis</i>	0	0	0	0	2
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	0	13
<i>A. pullulans</i>	1	1	1	1	1
<b>Isolado não identificado</b>	0	0	0	0	1

No que diz respeito à capacidade lipásica, esterásica e proteásica (tabela 3.II) somente *A. pullulans* produziu as enzimas necessárias para hidrolisar azeite, o Tween 80 e hidrolisar a caseína e a gelatina (Figura 3.3).

Todos os isolados microbianos testados, apresentaram capacidade para degradar o peróxido de hidrogénio (Figura 3.1).

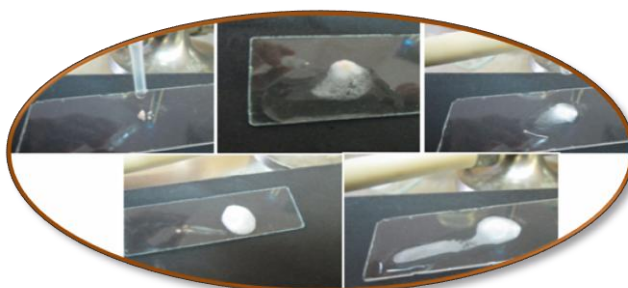


Figura 3.1 - Sequência ilustrativa da reação de catalases positivas

A produção de  $\beta$ -glucosidases foi demonstrada em *A. pullulans* através do crescimento em meio de cultura contendo arbutina, acompanhado da produção de um pigmento castanho. Este microrganismo também demonstrou capacidade de produzir fenolases as quais foram responsáveis pela presença de um halo transparente em torno das colónias crescidas num meio de cultura rico em ácido tânico (tabela 3.III).

Relativamente ao crescimento na presença de sais de bÍlis, verificou-se que todos os isolados exceto *A. pullulans* apresentaram crescimento (tabela 3.IV). O aparecimento de halo e pigmento amarelado (Figura 3.4) em torno das colónias surgiram maioritariamente nos isolados de *Z. mrakii*, *C. boidinii* e *S. cerevisiae* tal como se pode observar na tabela 3.IV.

Os isolados das espécies *R. mucilaginosa*, *C. boidinii*, *A. pullulans* e um isolado de *Z. mrakii* apresentaram capacidade de crescer na presença de oleuropeína como fonte única de carbono e energia. Para além do crescimento foi também observada a produção de um pigmento (Figura 3.4) em torno das colónias em dois dos isolados em estudo: *R. mucilaginosa* e *A. pullulans* (tabela 3.IV).

**Tabela 3.III - Atividades enzimáticas dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitonas ( $\beta$ -glucosidases, fenolases) (Os números indicam os isolados com hidrólise completa do substrato).**

	$\beta$ -glucosidases		Fenolases
	Crescimento	Pigmentação	
<i>R. mucilaginosa</i>	2	0	0
<i>C. boidinii</i>	3	0	0
<i>Z. mrakii</i>	17	0	0
<i>C. matritensis</i>	3	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	13	0	0
<i>A. pullulans</i>	1	1	1
Isolado não identificado	1	0	0

**Tabela 3.IV - Utilização de oleuropeína como fonte única de carbono e energia e crescimento na presença de sais de bÍlis (Os números indicam os isolados com hidrólise completa do substrato).**

	Utilização de Oleuropeína		Sais de BÍlis	
	Crescimento	Pigmentação	Crescimento	halo/pigmentação
<i>R. mucilaginosa</i>	2	1	2	0
<i>C. boidinii</i>	3	0	3	3
<i>Z. mrakii</i>	1	0	17	16
<i>C. matritensis</i>	0	0	3	2
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	13	5
<i>A. pullulans</i>	1	1	0	0
Isolado não identificado	0	0	1	1

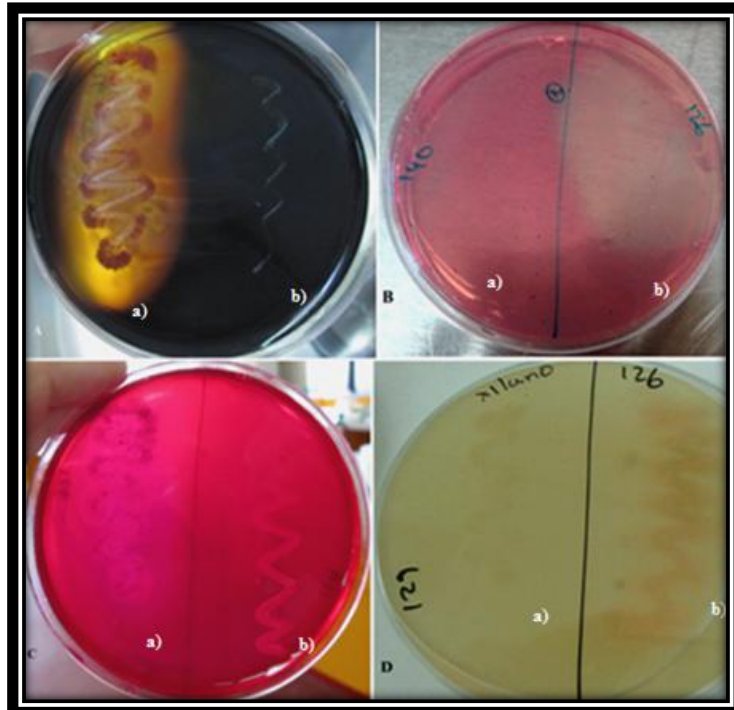


Figura 3.2 - A – Meio de amido revelando atividade amilásica positiva a) e negativa b); B – Meio de celulose revelando atividade celulásica positiva a) e negativa b); C – Meio de pectina revelando atividade pectinásica positiva a) e negativa b); D – Meio de xilano revelando atividade xilanásica positiva a) e negativa b).

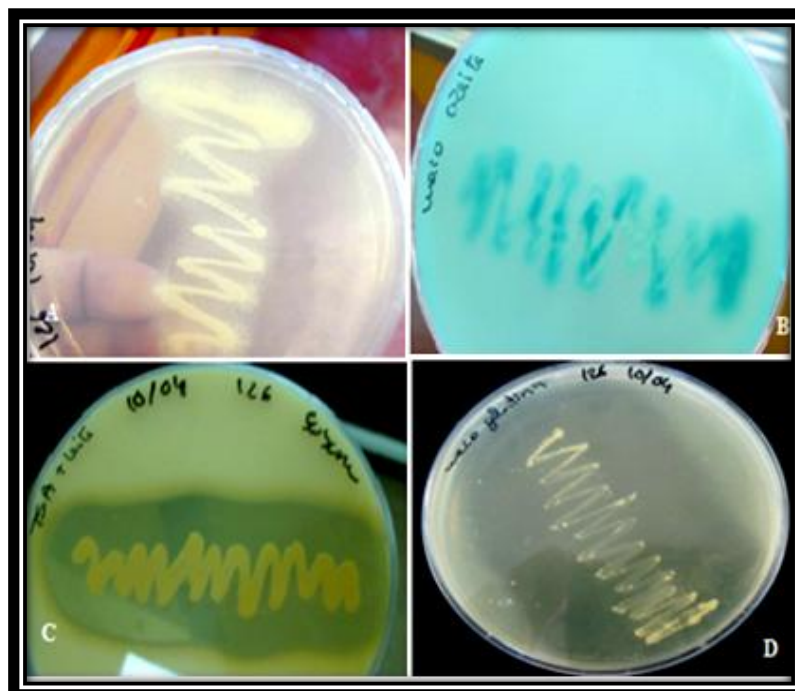


Figura 3.3 – A – Meio de Tween 80 revelando atividade esterásica positiva; B – Meio de azeite revelando atividade lipásica positiva; C – Meio de caseína revelando atividade proteásica positiva; D – Meio de gelatina revelando atividade proteásica positiva.



**Figura 3.4 - A – Meio de arbutina revelando atividade glucosidásicapositiva a) e negativa b); B – Meio de oleuropeína revelando atividade positiva a) e negativa b); Meio de ácido tânico revelando atividade tanásica positiva; D – Meio de sais de bÍlis apresentando crescimento microbiano**

As azeitonas apresentam uma composição de 78-80 % de água, 2-6 % de carboidratos, 1-2 % de proteínas, possuindo um elevado teor de lípidos (12-30 %) (Arroyo-López *et al*, 2008). A celulose e a hemicelulose representam os principais polissacarídeos estruturais da parede celular dos vegetais (Strauss *et al*, 2001), pelo que a sua hidrólise poderá levar ao amolecimento dos frutos, tornando-se por isso indesejável no processo de produção de azeitonas. Em alguns estudos recentes foi detetada a capacidade de digerir amido, assim como alguns trabalhos referem a existência de microrganismos produtores de amilases de tais como algumas estirpes de *A. pullulans* (Chi *et al*, 2009). No presente trabalho experimental apenas *A. pullulans* demonstrou atividade amilolítica e celulásica. A variedade de aplicações industriais em que se utilizam as amilases tais como o pão e a indústria de panificação, a indústria alimentar, a liquefação de amido, a indústria têxtil, a indústria de papel, entre outras torna a produção desta enzima relevante. Neste sentido, o interesse em microrganismos amilolíticos tem sido crescente nos últimos anos.

No estudo de Strauss *et al*, (2001), a atividade  $\beta$ -glicosidásica, evidenciada utilizando a arbutina no meio de cultura, foi detetada num pequeno número de estirpes do género *Candida*. No estudo de Bautista-Gallego *et al* (2011), *Wickerhamomyces anomalus* foi a espécie que demonstrou a maior atividade de  $\beta$ -glucosidases. A atividade  $\beta$ -glucosidásica tem sido associada à hidrólise da oleuropeína, pelo que a sua existência em leveduras é desejável de modo contribuir para a remoção do amargor presente nas azeitonas (Bautista-Gallego *et al*, 2011; Tofalo *et al*, 2013). No presente trabalho somente a espécie *A. pullulans* apresentou atividade  $\beta$ -glucosidásica ao hidrolizar a arbutina.

Das leveduras estudadas por Silva *et al*, (2011) apenas 5 isolados de *C. oleophila* foram capazes de hidrolisar a oleuropeína. Apesar das suas características antimicrobianas, este composto polifenólico confere o sabor amargo das azeitonas mostrando-se prejudicial para o desenvolvimento das bactérias ácido-láticas (Bautista-Gallego *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011). No presente trabalho *A. pullulans* e *R. mucilaginosa* demonstraram capacidade de utilizar oleuropeína como única fonte de carbono e energia.

Relativamente à produção de fenolases, o isolado da espécie *A. pullulans* foi o único com capacidade de as produzir.

Hernández *et al* (2007) investigaram a capacidade das leveduras isoladas em degradar os polissacarídeos da parede celular da azeitona através do estudo das atividades enzimáticas pectinolítica e xilanolítica, a fim de identificar espécies indesejáveis durante a fermentação por causarem o amolecimento das azeitonas. A maioria dos isolados de leveduras provenientes dos frutos frescos demonstrou atividade pectinolítica elevada, mas as leveduras isoladas de salmoura de azeitonas mostraram atividade polissacarolítica baixa, apesar de *Pichia anomala* e *Kluyveromyces marxianus* apresentarem desde ausência a forte atividade de pectinases. Algumas estirpes das espécies *Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa* e *Rhodotorula minuta*, apresentaram-se altamente pectinolíticas e *R. minuta* exibiu uma intensa atividade de xilanases afigurando-se, segundo os autores, como estirpes indesejáveis devido à possibilidade de estarem associadas ao amolecimento das azeitonas. O trabalho efetuado por Silva *et al* (2011) revelou que nenhuma das estirpes de *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *S. cerevisiae* e *C. oleophila*, isoladas de azeitonas portuguesas salmouradas, possuía atividade pectinolítica extracelular. Bautista-Gallego *et al* (2011) não detetaram atividade de xilanases em nenhuma das espécies de leveduras de fermentações

industriais de azeitona de mesa verde estudadas. No presente trabalho, *A. pullulans* apresentou uma ligeira atividade xilanolítica, não sendo suficiente para afirmar que efetua a hidrólise completa do xilano. Relativamente à atividade pectinolítica, *A. pullulans* e *Z. mrakii* (3 isolados) apresentaram atividade positiva, sendo que alguns isolados de *S. cerevisiae* (4) e um isolado de *R. mucilaginosa* apresentaram uma ligeira (+/-) atividade. A produção de pectinases pelos microrganismos presentes em azeitonas de fermentação industrial pode apresentar-se também como uma causa de amolecimento das mesmas.

Os microrganismos produtores de lipases constituem parte da microbiota autóctone na salmoura de azeitonas, sendo desejáveis por serem prováveis contribuintes para o aumento do teor de ácidos gordos livres durante a fermentação, e poderem dar origem a propanol e 2-butanol, que atuarão como precursores dos compostos voláteis eventualmente responsáveis pelo sabor da azeitona de mesa (Hernández *et al*, 2007; Bautista-Gallego *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011). A maioria das estirpes investigadas tanto por Hernández *et al* (2007) quanto por Bautista-Gallego *et al* (2011) e Silva *et al* (2011), demonstraram produção de lipases em meio de azeite e esterases utilizando como substrato tributirina (que não foi utilizado no presente estudo). No trabalho de Psani e Kotzekidou (2006), 100 % dos microrganismos estudados apresentaram capacidade lipolítica utilizando meio de azeite. No presente estudo apenas *A. pullulans* demonstrou atividade lipolítica em meio de azeite e estereásica utilizando meio com Tween 80.

No que diz respeito à atividade proteolítica, Strauss *et al* (2001) afirmam que a sua presença tem sido associada à redução de turbidez em bebidas fermentadas como cerveja e vinho. Segundo os estudos de Bautista-Gallego *et al*, (2011), a espécie *Pichia galeiformis* foi a que demonstrou a maior capacidade em degradar proteínas. Tal como a atividade polissacarolítica, esta atividade tem sido considerada uma propriedade indesejável no processo de fermentação de azeitonas devido à capacidade de produzir o amolecimento de frutos. A espécie *A. pullulans* foi a única que demonstrou produção de proteases nos meios de cultura ricos em caseína (meio contendo leite em pó) e gelatina (meio contendo gelatina como fonte única de carbono e energia).

Tofalo *et al*, (2013) reportaram que a maioria das espécies isoladas apresentou atividade catalásica positiva à semelhança dos resultados obtidos por Bautista-Gallego *et al* (2011). No presente estudo, todos os isolados evidenciaram catalases, sendo que *C. boibinii* e *A. pullulans* apresentaram uma reação mais forte que os restantes

microrganismos estudados. A presença das catalases tem sido considerada como desejável no que diz respeito às azeitonas uma vez que contribui para a preservação destas, limitando a oxidação de ácidos gordos insaturados (Tofalo *et al*, 2013; Hernández *et al*, 2007).

As aplicações tecnológicas de *A. pullulans* têm sido estudadas nos últimos anos, sendo a capacidade de produção de bioprodutos tais como pululano, enzimas extracelulares e proteínas unicelulares as principais. Esta espécie é reconhecida pela produção de proteases, amilases, lipases, xilanases, celulasas entre outras, o que lhe confere um grande potencial biotecnológico (Chi *et al*, 2009). Estes resultados estão de acordo com os apresentados no presente trabalho, uma vez que *A. pullulans* foi o único isolado com capacidade de produção destas enzimas extracelulares.

A resistência aos sais de bÍlis apresenta-se como uma atividade estudada por poucos autores. Silva *et al* (2011) concluíram que a maioria das estirpes de leveduras presentes no seu estudo conseguiram crescer na presença de sais de bÍlis, condições semelhantes às que existem no duodeno dos humanos, constituindo um resultado interessante uma vez que nenhum microrganismo viável poderá atingir o duodeno quando ingerido se não apresentar capacidade de resistir aos sais de bÍlis. No estudo efetuado por Psani e Kotzekidou (2006), todos os isolados de *Torulaspora delbrueckii* e a maioria dos isolados de *D. hansenii* apresentaram tolerância aos sais de bÍlis. No presente estudo, todos os isolados exceto *A. pullulans* apresentaram capacidade de crescer em meio de cultura com sais de bÍlis.

Como afirmam Arroyo-López *et al* (2006) e Tofalo *et al* (2013), durante o processamento de azeitonas de mesa as leveduras desempenharam atividades positivas, como a produção de compostos voláteis, metabolitos benéficos às propriedades sensoriais do produto, antioxidantes, vitaminas, aminoácidos e purinas, promoção do crescimento de bactérias ácido-láticas, capacidade antimicrobiana e de biodegradação de compostos fenólicos. No entanto, estes microrganismos podem refletir-se negativamente através da formação de CO<sub>2</sub> (que provoca o rebentamento de embalagens), do amolecimento dos tecidos do fruto, da turvação das salmouras e produção de odores e sabores desagradáveis.

Deste modo, a presença de microrganismos que demonstrem propriedades enzimáticas tais como as atividades β-glucosidásica, fenolásica, lipolítica, esterásica e catalásica apresentam implicações desejáveis na fermentação de azeitonas verdes, pois contribuirão para o desenvolvimento do sabor e para a redução do amargor das

azeitonas. Por outro lado, as atividades polissacarolíticas, (celulásica, pectinolítica e xilanolítica) e proteásica representam propriedades indesejáveis, já que têm sido associadas ao amolecimento e degradação da estrutura do fruto. A atividade amilolítica não é apresentada como significativa, na literatura, para a fermentação em estudo. Porém, mesmo que prejudicial para a fermentação de azeitonas, qualquer uma das propriedades enzimáticas apresentadas pelos microrganismos possui um potencial de aplicação biotecnológico.

## 3.2. Propriedades antimicrobianas

O estudo das propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada foi realizado de modo a estudar a sua capacidade antibacteriana e as suas propriedades *killer* contra leveduras. Assim, estudou-se a capacidade dos microrganismos inibirem leveduras referenciadas como sensíveis e a sua sensibilidade a leveduras referenciadas como *killer*.

### 3.2.1. Atividade antimicrobiana sobre bactérias

Os resultados do rastreio da atividade antibacteriana dos microrganismos provenientes da fermentação industrial de azeitona sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Cronobacter sakazakii* apresentam-se nas tabelas 3.V, 3.VI e 3.VII. Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de NaCl: 0 %, 4 % (p/v) e 6 % (p/v).

No estudo efetuado sem adição de NaCl (tabela 3.V) observou-se que nenhum isolado apresentou capacidade de inibição das bactérias *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *C. sakazakii*. Apenas *A. pullulans* apresentou capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, *L. innocua* e *L. monocytogenes* (tabelas 3.V, 3.VI e 3.VII).

Tabela 3.V - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (sem adição de NaCl)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. boidinii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Z. mrakii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. matritensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	+	+	+	-	-
Isolado não identificado	-	-	-	-	-	-

No meio cultura com 4 % (p/v) de NaCl (tabela 3.VI), somente *A. pullullans* se apresentou com capacidade de inibir bactérias: *S. aureus*, *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Neste meio de cultura observou-se um aumento do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano, comparativamente ao que se observou no meio

sem adição de NaCl. As bactérias Gram -, *E. coli*, *S. typhimurium* e *C. sakazakii*, não foram inibidas por nenhum dos microrganismos isolados de fermentação industrial de azeitona verde britada.

Tabela 3.VI - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (4 % (p/v) de NaCl)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. boidinii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Z. mraakii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. matritensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. Pullulans</i>	-	+	++	++	-	-
Isolado não identificado	-	-	-	-	-	-

Na presença de 6 % (p/v) de NaCl (tabela 3.VII) no meio de cultura apenas *A. pullullans* apresentou capacidade de inibir *S. aureus*, *L. innocua* e *L. monocytogenes* sendo que o diâmetro do halo de inibição do crescimento se apresentou maior do que no ensaio realizado anteriormente (Figura 3.5). Neste meio, as bactérias *E. coli* e *C. sakazakii* não apresentaram capacidade de crescer (devido à concentração de NaCl).

Tabela 3.VII - Propriedades antimicrobianas dos microrganismos isolados em relação a bactérias (6 % (p/v) de NaCl)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	*	-	-	-	-	*
<i>C. boidinii</i>	*	-	-	-	-	*
<i>Z. mraakii</i>	*	-	-	-	-	*
<i>C. matritensis</i>	*	-	-	-	-	*
<i>A. Pullulans</i>	*	++	+++	+++	-	*
Isolado não identificado	*	-	-	-	-	*

-\* As bactérias não apresentaram crescimento neste meio.

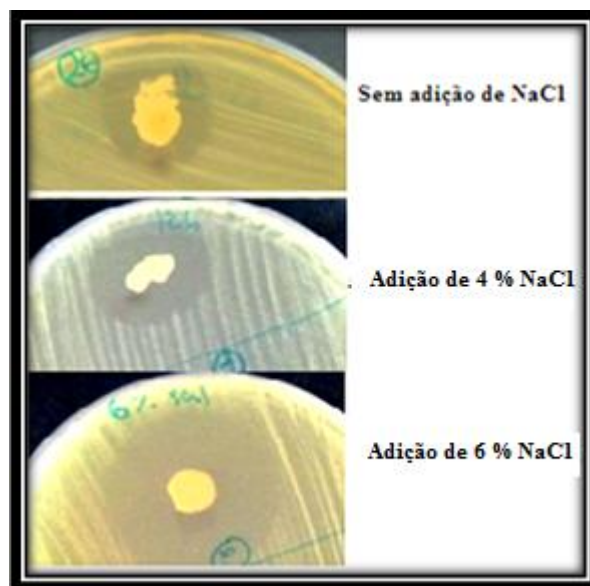


Figura 3.5 - Inibição de *L. monocytogenes* na presença de concentrações crescentes de NaCl

Silva *et al* (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de leveduras isoladas de azeitonas portuguesas das variedades “Galega” e “Cordovil” sobre bactérias patogênicas, tendo concluído que a ação inibitória varia dentro da mesma espécie, ou seja, apenas alguns isolados de uma mesma espécie apresentaram capacidade de inibição das bactérias.

No presente trabalho o único microrganismo com capacidade inibidora sobre as bactérias Gram + (*L. innocua*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*) foi *A. pullulans*. O aumento da concentração de sal no meio de cultura gerou halos de inibição do crescimento das bactérias proporcionalmente maiores à percentagem de sal. Segundo Llorente *et al* (1997), a atividade antimicrobiana de leveduras isoladas de salmouras de azeitonas contra estirpes sensíveis só foi significativamente melhorada com o aumento da concentração de sal no meio. Estes resultados estão de acordo com os resultados observados no presente estudo em que se observou um aumento do diâmetro dos halos nas concentrações de 4 % (p/v) e 6 % (p/v) de NaCl.

Os resultados do presente estudo evidenciam que os microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde, apesar de inibirem as bactérias Gram + (*L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus*) não inibiram bactérias Gram – (*E. coli*, *Salmonella* sp., *C. sakazakii*). A potencial inibição de bactérias patogênicas por parte dos microrganismos isolados, no processo de fermentação das azeitonas constitui uma

grande vantagem caso as mesmas sejam incluídas em culturas *starter*. Assim, a qualidade e a segurança do produto final é aumentada contribuindo para efeitos benéficos em termos de saúde pública com a obtenção de um alimento com qualidade, higiene e segurança alimentar melhoradas.

### 3.2.2. Atividade antimicrobiana sobre leveduras sensíveis e sensibilidade em relação a leveduras com capacidade *killer* conhecida

Os resultados obtidos do rastreio da capacidade antimicrobiana (atividade *killer*) – com (4% (p/v)) e sem adição de sal - dos microrganismos em estudo relativamente a leveduras designadas sensíveis e da sua sensibilidade a toxinas *killer* conhecidas (K2, K5, K8, K9 e K10) encontram-se resumidos nas tabelas 3.VIII e 3.IX.

**Tabela 3.VIII - Atividade *killer* e sensibilidade dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada (\*Inibição parcial)**

Código	Leveduras	Atividade <i>killer</i>			Sensibilidade K2, K5, K8, K9, K10
		NCYC 1006	PYCC 4456	<i>Z. mrakii</i>	
100	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	K10
101	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	K5
102	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
103	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
104	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2, K5*, K10*
107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
108	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
109	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K8
110	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
113	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
114	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
115	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
116	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	-
117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
120	Isolado não identificado	-	-	-	-
121	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	-
122	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
123	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
124	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-
125	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
126	<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	-	K5*, K8*
127	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
128	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
129	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
130	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
131	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
132	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
133	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
134	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
135	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
136	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
137	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
138	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
139	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
140	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-

**Tabela 3.IX - Atividade killer e sensibilidade dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada (\*Inibição parcial) (4 % (p/v) de NaCl)**

Código	Leveduras	Atividade killer			Sensibilidade
		NCYC 1006	PYCC 4456	<i>Z. mrakii</i>	K2, K5, K8, K9, K10
100	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-
101	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	K5, K8, K10
102	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K10
103	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
104	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2, K5*, K10*
108	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	K5, K10
109	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K2, K5, K10
110	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	K2
111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
113	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K8, K10
114	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
115	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
116	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	K5, K8, K10
117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
120	Isolado não identificado	-	-	-	K5
121	<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	K5, K8, K10*
122	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K9, K10*
123	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
124	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	K10
125	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10
126	<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	-	K5, K8
127	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
128	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
129	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5
130	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
131	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
132	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K10
133	<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-	-
134	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
135	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
136	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	-
137	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K10
138	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
139	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	K2
140	<i>Zygorulaspóra mrakii</i>	-	-	-	K5, K10

A análise das tabelas 3.VIII e 3.IX permitiu constatar que os microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona não apresentaram capacidade de inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Zygorulaspóra mrakii* na ausência de NaCl assim como na presença deste sal (4 % (p/v)).

A atividade *killer* e a sensibilidade das leveduras foram também testadas na presença de 6 % (p/v) NaCl. Contudo, aquando da observação dos resultados verificou-se que os isolados da espécie *Z. mrakii* não apresentaram crescimento suficientemente

esclarecedor para se revelarem conclusivos. Por esta razão foi decidido não apresentar estes resultados.

A sensibilidade dos microrganismos isolados da fermentação industrial de azeitona verde britada em relação a leveduras com capacidade *killer* conhecida (K2, K5, K8, K9 e K10), foi testada na presença de concentrações de NaCl diferentes (0 %, 4 % (p/v)). Os resultados obtidos permitiram concluir que há um aumento da capacidade de inibição quando a quantidade de NaCl aumenta de 0 % para 4 % (p/v), como se pode observar no gráfico da figura 3.6.

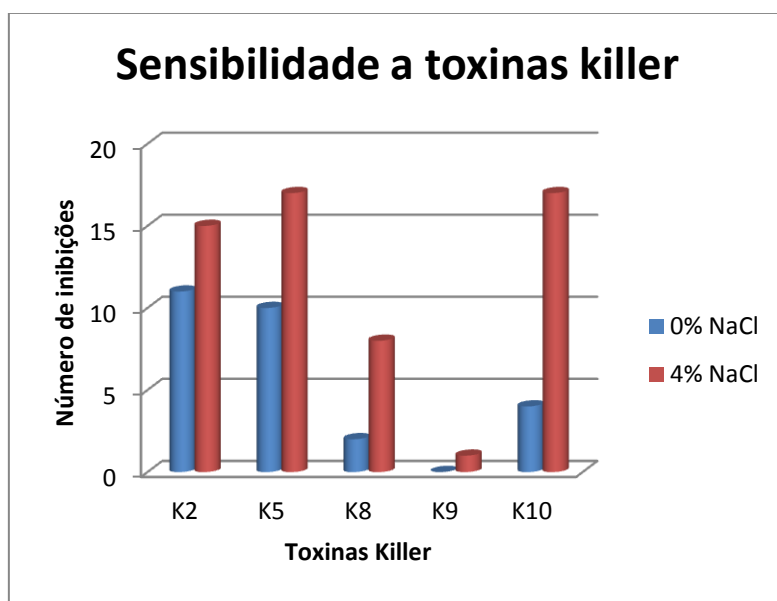


Figura 3.6 - Sensibilidade dos microrganismos de fermentação industrial em relação a toxinas *killer* de referência

A quantidade de sal no meio de cultura mostrou ser um fator que influencia a sensibilidade das leveduras a estirpes com capacidade *killer* conhecida (K). Neste sentido, e como se pode observar na figura 3.7, verificou-se um aumento da sensibilidade dos isolados com o aumento de NaCl no meio.

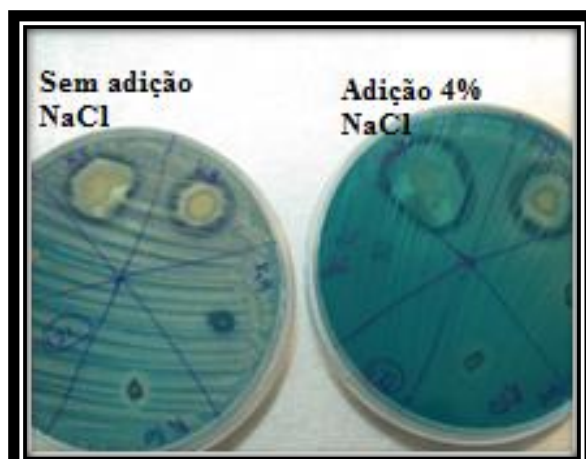


Figura 3.7 - Sensibilidade de *Candida boidinii* às leveduras K5, K8 e K10 em meio sem adição de NaCl e com 4 % de NaCl

Musmanno, Di Maggio e Coratza (1999) detetaram que, dentre leveduras isoladas de fermentações espontâneas de vinhos, apenas as estirpes designadas com forte fenótipo *killer* foram capazes de prevalecer sobre as leveduras sensíveis e, ainda, que a percentagem de isolados com capacidade antimicrobiana (92 %) se manteve constante ao longo do tempo.

Hernández *et al*, (2008) observaram que concentrações de 5 % (p/v) e 8 % (p/v) de NaCl provocaram um aumento do número de leveduras inibidas, comparativamente aos ensaios com menores quantidades de sal. Conclusões semelhantes foram efetuadas por Llorente *et al*, (1997) onde a toxicidade das leveduras foi evidenciada pelo aumento da concentração de NaCl.

## 4. Conclusões e perspectivas futuras

---

### 4.1. Conclusões

O aumento do conhecimento das propriedades biotecnológicas dos microrganismos permitirá a sua utilização em aplicações tecnológicas que visem aumentar o tempo de conservação dos alimentos, proteger e favorecer as suas propriedades aromáticas e texturais e também beneficiar a saúde dos consumidores.

No presente trabalho *Aureobasidium pullulans* foi o único microrganismo que apresentou capacidade de produção de enzimas extracelulares: fenolases, esterases, amilases, pectinases, proteases, lipases e  $\beta$ -glucosidases. Microrganismos que possuam as atividades  $\beta$ -glucosidásica, fenolásica, lipolítica, esterásica, catalásica podem estar implicados em alterações desejáveis na fermentação de azeitonas verdes, pois contribuirão para o desenvolvimento do sabor e para a redução do amargor das azeitonas. Por outro lado, as atividades polissacarolíticas, (celulásica, pectinolítica e xilanolítica) e proteásica representam propriedades indesejáveis, já que têm sido associadas à degradação da estrutura dos frutos.

Qualquer uma das propriedades enzimáticas apresentadas por *A. pullulans* possui um potencial de aplicação biotecnológica.

*A. pullulans* revelou-se capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram +, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*. Contudo, *A. pullulans* não inibiu o crescimento das bactérias Gram – testadas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., e *Cronobacter sakazakii*). A potencial inibição de bactérias patogénicas por parte dos microrganismos presentes nos processos fermentativos constitui uma grande vantagem caso os mesmos sejam incluídos em culturas *starter*. Assim, a qualidade e a segurança do produto final são aumentadas o que contribui para a obtenção de um alimento mais robusto em termos de saúde pública.

Nenhum dos isolados apresentou capacidade de inibir o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Zygorhizidium mraikii*. Alguns dos isolados testados apresentaram-se sensíveis às toxinas *killer* referenciadas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* (K2) *Pichia anomala* (K5 e K8) *Williopsis*

*saturnus* (K9) e *Kluyveromyces lactis* (K10). A levedura que se revelou mais potente na inibição dos microrganismos de fermentação industrial de azeitona verde foi a K2, no meio de cultura sem adição de sal e no meio de cultura com 4 % (p/v) de NaCl foram as K5 e K10. Por outro lado, a levedura que se apresentou menos potente, em ambos os meios de cultura (com e sem adição de NaCl) foi a levedura K9.

## 4.2. Perspetivas futuras

Dado o crescente interesse no conhecimento das propriedades tecnológicas de microrganismos isolados de processos fermentativos propõe-se que futuramente se efetuem os seguintes trabalhos:

- Quantificar as atividades enzimáticas detetadas em *Aureobasidium pullulans*;
- Testar a possibilidade de utilização de *A. pullulans* no tratamento de resíduos ricos em materiais orgânicos tais como celulose e compostos fenólicos;
- Identificar as substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por *A. pullulans*.

## 5. Referências bibliográficas

---

ABDEL-FATAH, O., HASSAN, M., ELSHAFEI1, A., HAROUN, B., ATTA, H., OTHMAN, A., (2012). Physiological studies on Carboxymethyl cellulase formation by *Aspergillus terreus* DSM 826. *Brazilian Journal of Microbiology*; Sociedade Brasileira de Microbiologia; São Paulo; 01-11.

ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., COBO, A., CABALLERO, N., FUENTES, M., PÉREZ-PULIDO, R., GÁLVEZ, A., (2013). Characterization of lactic acid bacteria from naturally fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32; Elsevier; 308-316.

ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS, R. GÁLVEZ, A., (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 144; Elsevier; 487-496.

ALIMARDANI-THEUIL, P., GAINVORS-CLAÍSSE, A., DUCHIRON, F., (2011). Yeasts: an attractive source of pectinases – From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 48; Elsevier; 1525-1537.

ALVES, M., GONÇALVES, T., QUINTAS, C., (2012). Microbial quality and yeast population in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23; Elsevier; 363-368.

ALVES, M., (2010). *Produção industrial de azeitona verde no Algarve: parâmetros físico-químicos e microbiológicos*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve para a obtenção de grau de mestre em Tecnologia de Alimentos. Faro.

AOUIDI, F., DUPUY, N., ARTAUD, J., ROUSSOS, S., MSALLEM, M., GAIME, I., HAMDI, M., (2012). Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. *Industrial Crops and Products*, 37; Elsevier; 292-297.

APONTE, M.; VENTORINO, V.; BLAIOTTA, G.; VOLPE, G.; FARINA, V.; AVELLONE, G.; LANZA, C. M.; MOSCHETTI, G., (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, 27; Elsevier; 162-170.

ARGYRI, A., LYRA, E., PANAGO, E., TASSOU, C., (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiology*, 36; Elsevier; 1-6.

ARROYO-LÓPEZ, F.N., ROMERO-GIL, V., BAUTISTA-GALLEGO, J., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F., JIMÉNEZ-DÍAZ, R., GARCÍA-GARCÍA, P., QUEROL, A., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., (2012). Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms. *International Food Microbiology*, 160; Elsevier; 42-49.

ARROYO-LÓPEZ, F.N., QUEROL, A., BAUTISTA-GALLEGO, J., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 160; Elsevier; 180-196.

ARROYO-LÓPEZ, F. N., DURAN-QUINTANA, M. C., RUIZ-BARBA, J. L., QUEROL, A., GARRIDO-FERNANDEZ, A., (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23; Elsevier; 791-796.

BARBOSA, A., GIESE, E., DEKKER, R., BORSATO, D., PÉREZ, A., IRANZO, J., (2010). Extracellular  $\beta$ -glucosidase production by yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *New Biotechnology*, 27, vol. 4; Elsevier.

BAUTISTA-GALLEGO, J., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F., BARRIO, E., QUEROL, A., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., ARROYO-LÓPEZ, F.N., (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147; Elsevier; 89-96.

BEVILACQUA, A., PERRICONE, M., CANNARSI, M., CORBO, M. R., SINIGAGLIA, M., (2009). Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, 44; Elsevier; 2198–2207.

CHI, Z., WANG, F, CHI, Z., YUE, L., LIU, G., ZHANG, T.,(2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnology important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82; Springer; 793-804.

COTON, E., COTON, M., LEVERT, D., CASAREGOLA, S., SOHIER, D., (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108; Elsevier; 130-135.

DOULGERAKI, A., PRAMATEFTAKI, P., ARGYRI, A., NYCHAS, G., TASSOU, C., PANAGOU, E., (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT – Food Science and Technology*, 50; Elsevier; 353-356.

GONÇALVES, G. (2007) *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

GROUNTA, A., NYCHAS, G.J., PANAGOU, E.. (2013). Survival of food-borne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 161; Elsevier; 197-202.

GUPTA,R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V., CHAUCHAN, B., (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38; Elsevier; 1599-1616.

HATOUM, R., LABRIE, S., Fliss, I., (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 421; EDITORA; 1-12.

HERNÁNDEZ, A., MARTÍN, A., CÓRDOBA, M., BENITO, M., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121; Elsevier; 178-188.

HERNANDÉZ, A., MARTÍN, A., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., GÓRDOBA, M., (2007). Identification and characterization of yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24; Elsevier; 346-351.

HURTADO, A., REGUANT, C., BORDONS, A., ROZÈS, N., (2012). Lactic acid bacteria from table olives. *Food Microbiology*, 31; Elsevier; 1-8.

HURTADO, A., REGUANT, C., BORDONS, A., ROZÈS, N., (2009). Influence of fruit ripeness and salt concentration in the microbial processing of *Arbequina* table olives. *Food Microbiology*, 26; Elsevier; 827-833.

HURTADO, A., REGUANT, C., ESTEVE-ZARZOSO, B., BORDONS, A., ROZÈS, N., (2008). Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Research International*, 41; Elsevier; 728-744.

HUTKINS, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, London.

INE, 2014. Estatísticas de produção vegetal. [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000705&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000705&contexto=bd&selTab=tab2). Acedido a 6 de Julho 2014.

IOOC - International Olive Oil Council - (2004). *Trade Standard applying to table olives*. IOOC editions; Madrid.

LLORENTE, P., MARQUINA, D., SANTOS, A., PEINADO, J., SPENCER-MARTINS, I., (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 63; American Society for Microbiology; 1165-1167.

LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M., (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86; Elsevier; 23-50.

MARQUINA, D., PERES, C., SANTOS, A., PEINADO, J. M., SPENCER-MARTINS, I., (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14; Wiley; (ed.) J.-Y. Maillard; 279-283.

MAZZUCA, S., SPADAFORA, A., INNOCENTI, A., (2006). Cell and tissue localization of  $\beta$ -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by *in situ* activity assay. *Plant Science*, 171; Elsevier; 726-733.

MEDINA, E., BRENES, M., ROMERO, C., RAMÍREZ, E., de CASTRO, A., (2013). Survival of foodborne pathogenic bacteria in table olive brines. *Food Control*, 34; Elsevier; 719-724.

MENEGHIN, M., REIS, M., CECCATO-ANTONINI, S., (2010). Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53; Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar; Brasil; 1043-1050.

MUSMANNO, R., DI MAGGIO, T., CORATZA, G., (1999). Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. *Journal of applied Microbiology*, 87; Wiley; 932-938.

NGUYEN, D., HOORDE, K., CNOCKAERT, M., BRANDT, EVIE, AERTS, M., THANH, LE BINH, VANDAMME, P.,(2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 163; Elsevier; 19-27.

NISIOTOU, A. A., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G.J.E., PANAGOU, E.Z., (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108; Wiley; (ed.) A. Gilmour; 396-405.

NOGUEIRA, F., (2012). *Contribuição para a caracterização de “azeitonas de mesa mistas ao natural produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspetos morfológicos, químicos e microbiológicos*. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Bragança.

PANAGOU, E., SCHILLINGER, U., FRANZ, C. & NYCHAS G., (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25; Elsevier; 348-358.

PEPI, M., LAMPARIELLO, L., ALTIERI, R., ESPOSITO, A., PERRA, G., RENZI, M., LOBIANCO, A., FEOLA, A., GASPERINI, S., FOCARDI, S., (2010). Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp e *Pantoeasp* isolated from olive mil waste mixtures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64; Elsevier; 73-80.

PEREIRA, A., PEREIRA, J., BENTO, A., ESTEVINHO, M., (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46; Elsevier; 2895-2902.

PSANI, M., KOTZEKIDOU, P., (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as *starter* adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22; Springer; 1329-1336.

PSOMAS, E., ANDRIGHETTO, C., LITPOULOU-TZANETAKI, E., LOMBARDI, A., TZANETAKIS, N., (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69; Elsevier; 125-133.

RANDAZZO, C., RIBBERA, A., PITINO, I., CAGGIA, C., (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 32; Elsevier; 87-96.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F., ROMERO-GIL, V., BAUTISTA-GALLEGO, J., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., ARROYO-LÓPEZ, F.N., (2012). “Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28; Springer; 1761–1770.

SABATINI, N., MARSILIO, V., (2008). Volatile compounds in table olives (*Olea Europea L.*, *Nocellara del Belice* cultivar). *Food Chemistry*, 107; Elsevier; 1522-1528.

SABOTIČ, J.; KOS, J., (2012). Microbial and fungal protease inhibitors: Current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93; Springer; 1351–1375.

SANGORRÍN, M., ZAJONSKOVSKY, I., LOPES, C., RODRÍGUEZ, M., BROOCK, M., (2001). Killer behavior in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology*, 41; Wiley; (ed.) Erika Kothe; 105-113.

SANTO, D.; GALEGO, L., GONÇALVES, T., QUINTAS, C., (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47; Elsevier; 45-50.

SCIESSERE, L., CUNHA-SANTINO, M. B., BIANCHINI Jr., I., (2011). Cellulase and xylanase activity during the decomposition of three aquatic macrophytes in a tropical oxbow lagoon. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42; Sociedade Brasileira de Microbiologia; São Paulo; 909-918.

SCIFÒ, G., RANDAZZO, C., RESTUCCIA, C., FAVA, G., CAGGIA, C., (2009). *Listeria innocua* growth in fresh cut mixed leafy salads packaged in modified atmosphere. *Food Control*, 20; Elsevier; 611-617.

SILVA, T., RETO, M., SOL, M., PEITO, A., PERES, C.M., PERES, C., XAVIER-MALCATA, F., (2011). Characterization of yeasts from portuguese brined olives, with

focus in their potentially probiotic behaviour. *LWT-Food Science and technology*, 44; Elsevier; 1349-1354.

SPADAFORA A., MAZZUCA, S., CHIAPPETTA, F., PARISE, A., PERRI, E., INNOCENTI, M., (2008). Oleuropein-Specific- $\beta$ -Glucosidase Activity Marks the Early Response of Olive Fruits (*Olea europaea*) to Mimed Insect Attack. *Agricultural Sciences in China*, 7(6); Elsevier; 703-712.

SPYROPOULOU, K., CHORIANOPOULOS, N., SKANDAMIS, P., NYCHAS, G. J. E., (2001). Survival of *E. coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 66; Elsevier; 3-11.

STRAUSS, M.C.A., JOLLY, N.P., LAMBRECHTS, M.G., VAN REUBURG, P., (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91; Wiley; (ed.) A. Gilmour; 182–190.

STEINKRAUS, H. K., (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8; Elsevier; 311-317.

TASSOU, C. C., PANAGOU, E. Z., KATSABOXAKIS, K. Z., (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19; Elsevier; 605-615.

TOFALO, R., SCHIRONE, M., PERPETUINI, G., SUZZI, G., CORSETTI, A., (2012). Development and application of real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*, 29; Elsevier; 356-362.

TOFALO, R., PERPETUINI, G., SCHIRONE, M., SUZZI, G., CORSETTI, A., (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *Journal of Food Microbiology*, 161; Elsevier; 203-208.

UMSZA-GUEZ, M, DÍAZ, A., ORY, I., NLANDINO, A., GOMES, E., CARO, I., (2011). Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42; Sociedade Brasileira de Microbiologia; São Paulo; 1585-1597.

VAKHLU, J.; KOUR, A., (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.9, n.1; Universidad Católica de Valparaíso, Chile; 69-85.

VAUGHN , R. H., JAKUBCZYK, K. T., MCMILAN, J. D., HIGINIO THOMAS, E., DAVE, B. A., CRAMPTON, V. M., (1969). Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, 18; PMC; 771-775.

VILJOEN, B., (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37-44.

VORONOVSKY, A., ROHULYA, O, ABBAS, C., SIBIRNY, A., (2009). Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metabolic Engineering*, 11; Elsevier; 234-342.

WANG, W., WANG, Y., WANG, D., (2008). Dual effects of Tween 80 on protein stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 347; Elsevier; 31-38.

WHITTENBURY, R., (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*, 35; Society for General Microbiology: Federation of European Microbiological Societies; 13-26.

## 6. Anexo

Comunicação, sob a forma de painel apresentada, no International Food Congress – Novel Approches in the Food Industry” (NAFI 2014) que decorreu em Kusadasi - Turquia de 26 a 29 de Maio de 2014.



### Technological properties of yeasts isolated from table olive fermentations

Barros, S.; Quintas, C.

susana.patricia.barros@gmail.com, cquintas@ualg.pt  
Instituto Superior de Engenharia, Campus da Penha CIQA, Campus de Gambelas, Faro 8005-139. Portugal

#### Introduction

The interest in the identification of species/strains with physiological properties and potential for biotechnological applications has increased in recent years.

The aim of the present study was to detect the production of extracellular enzymes and the antimicrobial activity of isolates obtained from table olives' industrial fermentations.

Forty one isolates of the genera *Candida*, *Citeromyces*, *Zygotulasporea*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium* were screened for their ability to produce different extracellular enzymes. Their antimicrobial activity against foodborne bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria spp.*, and *Staphylococcus aureus*) was screened. The antimicrobial activity against yeasts (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *Z. mrakii*) and sensitivity to killer reference strains [*S. cerevisiae* NCYC 738 (K2 type), *Pichia anomala* NCYC 434 (K5 type), *P. anomala* NCYC 435 (K8 type), *Williopsis saturnus* NCYC 500 (K9 type) and *Kluyveromyces lactis* NCYC 575 (K10 type)] was also studied.

#### Methods

##### Production of extracellular enzymes

The ability for the production of extracellular enzymes by the microorganisms isolated from table olive fermentations was detected with culture media supplemented with specific substrates: arbutin ( $\beta$ -glucosidases), olive oil (lipases), tween 80 (esterases), starch (amylases), pectin (pectinases), gelatin (proteases), cellulose (cellulases), milk powder (proteases), xylan (xylanases) and tannic acid (tannases). The capacity to grow in the presence of oleuropein and bile salts and to degrade hydrogen peroxide was also studied.

##### Antimicrobial activity

###### Yeasts:

The killer activity of 41 isolates were assayed by the seeded-agar-plate-technique, using YEPD-MB (1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone and 2% agar) containing 0.003 % (w/v) methylene blue, buffered at pH 4.5 with 0.5 M phosphate-citrate.

###### Foodborne bacteria:

The inhibition of the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria spp.*, and *Staphylococcus aureus*, by microorganisms isolated from table olives' industrial fermentation was tested in TSA medium supplemented with yeast extract (1 %) and glucose (1 %).

#### Results

##### Enzymatic activity:

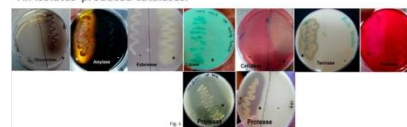
• Only *A. pullulans* produced  $\beta$ -glucosidases, tannases, esterases, cellulases, lipases, proteases, amylase and, xylanases (Fig.1).

• *A. pullulans* and *R. mucilaginosa* showed ability to use oleuropein.

• Some isolates of *R. mucilaginosa*, *Z. mrakii*, *S. cerevisiae* and *A. pullulans* were able to hydrolyze pectin.

• All isolates, except *A. pullulans* grew on the media with bile salts. Some of them produced an opaque halo around the colonies.

• All isolates produced catalases.



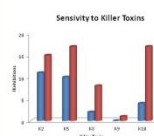
##### Antimicrobial activity:

• *A. pullulans* inhibited *Listeria spp.* (Fig.2) and *S. aureus*. The inhibition was most effective with the increase of NaCl concentrations.

• No isolates inhibited the growth of *E. coli*, *Salmonella* and *Cronobacter sakazakii*.

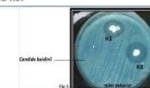


##### Killer behavior:



• In the absence of NaCl, K2 was the most effective toxin, followed by K5, K10 and K8 (Fig.2).

• In the presence of NaCl (4 %), K5 and K10 were the most effective toxins followed by K2, K8 and K9.



#### Final considerations

This study revealed some interesting aspects :

• The potential of *A. pullulans* as:  
producer of extracellular enzymes  
an inhibitor of foodborne pathogenic bacteria

• The utilization of strains with specific technological characteristics in the table olives' production may certainly have a beneficial impact on the organoleptic, nutritional and microbial safety of the final product.

