



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

Departamento de Engenharia Alimentar

Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Neusa Maria da Silva Ferro Rodrigues

Faro
2011



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

Departamento de Engenharia Alimentar

Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho de projecto orientado por:

Professora Doutora Célia Quintas

e co-orientado por:

Professora Doutora Maria Nelma Gaspar



Neusa Maria da Silva Ferro Rodrigues

Faro, 2011

O documento apresentado é da inteira responsabilidade da autora

Neusa Maria da Silva Ferro Rodrigues



Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a realização desta tese.

Em especial à Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas agradeço por me ter proporcionado a realização deste trabalho experimental, pela sua constante motivação e pelos conhecimentos transmitidos com empenho e dedicação.

À Professora Doutora Nelma Gaspar pela forma como me incentivou para a realização deste trabalho e pela transmissão do seu saber ao longo dos anos.

À Professora Doutora Paula Cabral pela forma como me ajudou na revisão final do trabalho.

À minha colega de laboratório Sílvia Madeira pelo apoio e compreensão.

À minha colega de Mestrado Maria do Carmo Alves pela ajuda, boa disposição e amizade ao longo do trabalho.

À minha família, em especial ao meu marido Jorge, pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis.

Lista de abreviaturas e símbolos

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BAL	Bactérias ácido lácticas
DNS	Ácido dinitrossalicílico
g/L	Gramas por litro
<i>HaeIII</i>	Enzima de restrição de <i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HinfI</i>	Enzima de restrição de <i>Haemophilus influenzae</i>
MEA	Meio de cultura de agar e extracto de malte
NP	Norma Portuguesa
p/v	Peso por volume
PCA	Meio de cultura para contagem de microrganismos (Plate count agar)
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
rDNA	DNA ribosomal
RFLP	Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphisms).
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
SDS	Docedil sulfato de sódio
TAE	Tris-acetato-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colónias

Resumo

A azeitona de mesa é um alimento típico da gastronomia portuguesa e da Dieta Mediterrânica, preparado com os frutos de diferentes variedades de oliveira, processados e fermentados de forma a remover o seu amargor e melhorar a sua preservação.

Neste trabalho, estudou-se a fermentação natural de azeitona verde da variedade Maçanilha preparada, à escala laboratorial, de acordo com dois processos tradicionais (A e B) a duas temperaturas (18 e 25 °C). No Processo A as azeitonas britadas foram submetidas a um pré-tratamento com água antes de ser colocadas em salmoura e no Processo B as azeitonas foram directamente colocadas em salmoura após a britagem.

As fermentações foram monitorizadas através da avaliação de alterações microbiológicas e físico-químicas com o objectivo de compreender e melhorar a produção de azeitona de mesa.

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram o pH, os açúcares redutores, os compostos fenólicos e a cor. As populações microbianas estudadas foram a microbiota total a 30 °C, os fungos filamentosos, as leveduras, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* e do género *Pseudomonas* e as bactérias ácido lácticas.

As leveduras revelaram-se um grupo muito importante na produção da azeitona verde natural pelo que se procedeu à sua identificação por Análise de Polimorfismos de Fragmentos de Restrição e por sequenciação da região D1-D2 do gene 26S rRNA.

Os isolados identificados pertenciam às espécies *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus carnescens*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii*. As espécies *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus* foram isoladas pela primeira vez durante a produção de azeitona. Contudo, *C. membranaefaciens* foi a espécie que prevaleceu até ao final dos processos fermentativos.

O Processo B, originou um produto final sem bactérias da família *Enterobacteriaceae* e do género *Pseudomonas*, o que sugere que este processo é o mais adequado para a produção de azeitona britada.

Palavras-chave: Azeitonas verdes, fermentação, leveduras, RFLP, sequenciação.

Abstract

Table olives, a typical food product of Portugal's gastronomy and common in the Mediterranean Diet, are prepared from the fruit of different olive tree varieties and processed to remove the bitter taste and improve their preservation.

This work studied the natural fermentation of green olives of the Manzanilla variety prepared at a laboratory scale according to two traditional Processes (A and B) and in two temperature conditions (18 °C and 25 °C). In Process A, cracked olives were submitted to a treatment with water before brining and in Process B olives were placed in brine immediately after being cracked.

The fermentative processes were evaluated by monitoring the microbiological and physicochemical changes in order to understand and improve the production process of green natural table olives. The physicochemical parameters monitored were pH, reducing sugars, phenolic compounds and colour. The microbial populations studied were the total viable counts at 30 °C, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp*, yeasts and molds.

Since yeasts were the predominant microbial population in the fermentation process, they were isolated and identified by the Restriction Fragment Length Polymorphism technique and by partial sequencing of the D1-D2 region from the 26S rRNA gene.

The identified isolates belong to the species *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus carnescens*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *Pichia kluyveri* and *Pichia guilliermondii*. The species *Cryptococcus carnescens* and *Sporobolomyces odoratus* have never been reported before in table olives' environment. However, as the biological processes evolved, a clear decrease of yeast diversity was observed with *Candida membranaefaciens* becoming the dominant until the end.

Process B resulted in a product without bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonas* genus, suggesting that this method is the most adequate to produce cracked green table olives.

Key-words: Green olives, fermentation, yeasts, RFLP, sequencing.

Índice de Figuras

Figura 1.1. -	Azeitona Maçanilha.	6
Figura 1.2. -	Azeitona Maçanilha britada.	7
Figura 1.3. -	Processo de britagem de azeitona Maçanilha.	7
Figura 1.4. -	Métodos de preparação de azeitona de mesa.	10
Figura 1.5. -	Representação esquemática do locus rDNA em leveduras.	22
Figura 2.1. -	Diagrama de produção de azeitona verde britada de acordo com os Processos A e B.	32
Figura 3.1. -	Evolução da microbiota durante a fermentação de azeitonas processadas, de acordo com o Processo A e o Processo B, a 25 °C.	45
Figura 3.2.-	Evolução da microbiota durante a fermentação de azeitonas processadas, de acordo com o Processo A e o Processo B, a 18 °C.	47
Figura 3.3. -	Perfis obtidos por RFLP dos géneros/espécies isoladas ao longo das fermentações de azeitonas verdes britadas.	50
Figura 3.4. -	Evolução do pH no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 25 °C.	53
Figura 3.5. -	Evolução da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 25 °C.	54
Figura 3.6. -	Evolução da concentração de compostos fenólicos no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 25 °C.	55
Figura 3.7. -	Evolução dos parâmetros de cor L, a e b na superfície das azeitonas nos Processos A e B das fermentações a 25 °C.	56
Figura 3.8. -	Evolução do pH no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 18 °C.	58
Figura 3.9. -	Evolução da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 18 °C.	59
Figura 3.10.-	Evolução da concentração de compostos fenólicos no líquido fermentativo nos Processos A e B das fermentações a 18 °C.	60
Figura 3.11.-	Evolução dos parâmetros de cor L, a e b na superfície das azeitonas nos Processos A e B das fermentações realizadas a 18 °C.	61

Índice de Tabelas

Tabela I -	Processos de preparação de azeitonas (IOOC, 2004).	5
Tabela II-	Vantagens e desvantagens da presença de leveduras no processo de fermentação de azeitonas de mesa.	18
Tabela III -	Problemas relacionados com a presença de leveduras no processo de embalagem de azeitonas de mesa.	18
Tabela IV-	Principais leveduras identificadas em processos de preparação de azeitona de mesa e país onde foram isoladas.	20
Tabela V -	Leveduras isoladas em fermentações de azeitonas de mesa.	21
Tabela VI -	Composição de substratos usados em fermentação de vegetais.	27
TabelaVII -	Mistura para PCR.	38
Tabela VIII -	Condições da amplificação.	38
Tabela IX -	Reagentes utilizados na preparação das soluções para a reacção de restrição.	39
Tabela X-	Microbiota existente à superfície do fruto antes de ser processado.	44
Tabela XI -	Tamanho dos produtos de PCR (pb) e dos fragmentos resultantes das endonucleases e frequência do número de espécies de leveduras isoladas nas fermentações.	51
Tabela XII-	Sucessão de leveduras ao longo do período de fermentação.	52
Tabela XIII	Microbiota presente no fruto e na salmoura final.	64
Tabela XIV-	Composição química na salmoura final.	71
Tabela XV-	Variação da cor das azeitonas ao longo das fermentações.	73

Índice geral

	<i>Pág.</i>
Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Lista de abreviaturas e símbolos.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tabelas.....	VIII
Índice geral.....	IX
1. Introdução	1
1.1 Objectivos	2
1.2. Azeitona de mesa	3
1.2.1. Azeitona Maçanilha.....	6
1.2.2. Tipos de processamento de azeitona de mesa	7
1.3 Microbiota na azeitona de mesa	12
1.3.1. Bactérias ácido-lácticas	13
1.3.2. Leveduras	14
1.4. Métodos de identificação de leveduras	22
1.5. Características funcionais da azeitona de mesa.....	24
1.5.1. Fermentação	26
1.6. Defeitos nas azeitona.....	28
2. Materiais e Métodos	31
2.1 Avaliação das alterações físico-químicas e microbiológicas ocorridas ao longo da fermentação de azeitona verde britada	31
2.1.1 Amostragem	33
2.1.2 Parâmetros microbiológicos	33
2.1.2.1 Identificação de leveduras	36
2.1.3 Parâmetros físico-químicos	40
3. Resultados	43
3.1 Parâmetros microbiológicos.....	43
3.1.1 Microbiota à superfície do fruto.....	43
3.1.2 Microbiota da fermentação realizada a 25 °C.....	45
3.1.3 Microbiota da fermentação realizada a 18 °C.....	47

3.1.4 Identificação de leveduras	49
3.2 Parâmetros físico-químicos	53
3.2.1 Fermentação realizada a 25 °C	53
3.2.2 Fermentação realizada a 18 °C	58
4. Discussão.....	64
5. Conclusão.....	74
6. Referências Bibliográficas	77



INTRODUÇÃO

1. Introdução

A azeitona é o fruto da oliveira *Olea europea* L., uma das árvores mais importantes nos países Mediterrânicos. A principal utilização da azeitona é a produção de azeite e de azeitona de mesa. O azeite, produto resultante da maceração mecânica da azeitona, utiliza mais de 90% da produção mundial deste fruto, sendo os restantes 7 a 10% consumidos como azeitona de mesa. Esta é uma das mais antigas aplicações biotecnológicas no processamento de alimentos, que surgiram na região Mediterrânica e que ao longo dos tempos se tem vindo a expandir por outros países.

Trata-se de um produto tradicional da gastronomia portuguesa, constituindo um aperitivo indispensável na dieta mediterrânica e como tal a sua qualidade deve ser preservada. No Algarve a azeitona verde pertencente à cultivar Maçanilha, é uma das mais utilizadas na produção de azeitona de mesa. É um fruto que só pode ser consumido depois de processado devido ao facto de ser muito amargo em virtude de possuir um teor muito elevado de compostos fenólicos.

No passado, a conserva da azeitona era preparada utilizando talhas de barro onde os frutos eram colocados em salmoura tendo este procedimento muito pouco de tecnologia, mas muito de tradição e sabedoria popular.

Uma das formas tradicionais mais utilizadas para processar a azeitona é a britagem que faz parte da cultura gastronómica do Algarve e é bastante procurada pela restauração. Este processo consiste em esmagar (britar) ligeiramente as azeitonas verdes, procedendo-se posteriormente a um pré tratamento que consiste em lavagens sucessivas com água. Após este pré tratamento, as azeitonas são colocadas em salmoura até perderem parcialmente o sabor amargo. Outro processo utilizado para produção da azeitona britada consiste em colocá-las em recipientes com salmoura logo após o esmagamento, o que prolonga o tempo de preparação, mas por outro lado aumenta o período de conservação. Os compostos solúveis em água são libertados da polpa da azeitona, por difusão, na salmoura sendo este processo influenciado pela concentração de sal. Os açúcares difundidos na salmoura são utilizados pelos microrganismos e convertidos em ácidos orgânicos. As alterações químicas que ocorrem no líquido fermentativo e no fruto estão relacionadas com o desenvolvimento de populações microbiológicas durante a fermentação.

A produção industrial de azeitona de mesa verde, ou preta, continua ainda a ser um processo mais ou menos empírico na Europa apesar da sua importância económica, resultando em produtos com características de qualidade heterogénea ao longo do tempo (Spyropoulou *et al.*, 2001).

1.1 Objectivos

A presente investigação surgiu da necessidade de entender os mecanismos associados à fermentação de azeitonas de forma a aumentar os conhecimentos relacionados com o processo no sentido de obter produtos de qualidade melhor e mais consistentes. O trabalho experimental foi desenvolvido na Universidade do Algarve, Instituto Superior de Engenharia no âmbito do Mestrado em Tecnologia dos Alimentos. Utilizaram-se conhecimentos empíricos obtidos junto da população rural Algarvia onde a azeitona verde britada é característica da alimentação.

Os ensaios experimentais foram conduzidos à escala laboratorial em condições semelhantes às utilizadas pela população para produção e consumo familiar.

Estudaram-se dois processamentos tradicionais, (Processo A e Processo B) conduzidos numa primeira fase a 25 °C e posteriormente a 18 °C. O Processo A consistiu em britar a azeitona verde e submetê-la a um pré-tratamento com água ao longo de uma semana. Após esse período a água foi substituída por salmoura (8 % (p/v) NaCl) que se manteve até ao fim da fermentação. O Processo B consistiu em colocar a azeitona em salmoura (8 % (p/v) NaCl) imediatamente após a britagem e mantê-la desta forma até ao fim da fermentação.

Assim, estabeleceram-se os seguintes objectivos:

Comparar dois processos tradicionais de produção de azeitona verde britada praticada na região do Algarve.

Estudar a dinâmica da microbiota e de algumas alterações físico químicas que ocorrem na salmoura ao longo do período de fermentação da azeitona britada.

Identificar as espécies de leveduras envolvidas nos processos fermentativos.

Pretende-se desta forma, adquirir conhecimentos que possam contribuir para a obtenção de azeitonas verdes britadas de qualidade consistente, produzidas segundo processos tradicionais respeitando as suas características naturais e prolongando o seu período de armazenamento.

1.2. Azeitona de mesa

De acordo com o “Trade standard applying to table olives” (2004) a azeitona de mesa é um produto preparado a partir de frutos oriundos de diferentes variedades de oliveira, ligeiramente tratados ou processados de forma a remover o seu amargor e a serem preservados por processos de fermentação. Cerca de 1,5 milhões de toneladas de azeitonas são produzidas por ano em todo o mundo e metade dessa produção faz-se na Europa principalmente na Grécia, Espanha, Itália e Portugal.

As principais variedades de azeitona utilizadas na produção de azeitonas de mesa são a Gordal (*Olea europea regalis*), a Clemente (também conhecida por Gordal Sevillano) e a Maçanilha (*Olea europea pomiformis*) (Wood, 1998). A azeitona é um fruto com baixa concentração de açúcar (2,6-6,0%) e um alto conteúdo em lipídios (12-30%), contudo estes valores podem variar de acordo com o estado de maturação e com a variedade (Garrido Fernandez *et al.*, 1997).

As azeitonas de mesa podem ser classificadas de acordo com o estado de maturação dos frutos utilizados nos diferentes processamentos (IOOC, 2004). A azeitona verde, corresponde ao fruto colhido no estado verde de maturação, antes de se iniciar a fase do amadurecimento e após atingir o tamanho adequado. A sua cor pode variar de verde a amarelo escuro. A azeitona denominada em fase de “transição da cor,” corresponde ao fruto colhido no início da fase de maturação e a sua cor pode variar de rosa a castanho. A azeitona preta corresponde ao fruto colhido no final da maturação em que a cor varia de preto avermelhado, a violeta escuro e preto esverdeado (IOOC, 2004).

O principal objectivo do processamento da azeitona é a remoção do seu gosto amargo e a aquisição de sabor e aromas característicos (Campaniello *et al.*, 2005). O gosto amargo da azeitona pode ser removido através de tratamento alcalino, por imersão em líquido que conduz à diluição dos compostos amargos, ou por processos biológicos.

O aroma característico das azeitonas de mesa fermentadas resulta do equilíbrio entre um conjunto de compostos voláteis como hidrocarbonetos, álcoois (etanol), aldeídos, cetonas, ésteres e outros compostos. A formação destes compostos é um processo dinâmico desenvolvido ao longo da fermentação pela microbiota presente principalmente bactérias ácido lácticas e leveduras (Sabatini *et al.*, 2008). O etanol é responsável por algumas propriedades organoléticas do produto final principalmente o odor. É um dos produtos finais do metabolismo das leveduras podendo também ser produzido por bactérias ácido lácticas heterofermentativas (Tassou *et al.*, 2002).

A azeitona de mesa, pode ser conservada de acordo com as suas características, em salmoura, em sal, em atmosfera modificada, através de processos térmicos, com conservantes ou ainda através de agentes acidificantes (IOOC, 2004). De acordo com o tipo de preparação as azeitonas de mesa podem ser classificadas em azeitonas tratadas, azeitonas naturais, azeitonas desidratadas e azeitonas pretas oxidadas, (Tabela I).

No final do processo de fermentação, as azeitonas submetidas a uma fermentação natural, que é o caso da azeitona verde britada segundo processos tradicionais, devem apresentar uma percentagem mínima de 6% de NaCl, um pH máximo de 4,3 e uma percentagem de acidez de 0,3 % ácido láctico (p/v). As azeitonas e a salmoura devem estar isentas de qualquer tipo de degradação microbiana, estar livres de microrganismos patogénicos e metabolitos produzidos pelos mesmos. O volume de produto coberto com salmoura não deve nunca ocupar menos de 90% do volume total do recipiente de embalagem (IOOC, 2004).

Tabela I – Processos de preparação de azeitonas (IOOC, 2004)

Processos de preparação de azeitona de mesa	
Azeitona tratada	Azeitonas verdes, pretas ou em fase de mudança de cor, que sofreram tratamento alcalino e posterior embalagem em salmoura onde ocorre fermentação total ou parcial, preservadas ou não por adição de conservantes.
Azeitona natural	Azeitonas verdes, pretas ou em fase de mudança de cor, colocadas directamente em salmoura onde decorre fermentação total ou parcial, preservadas ou não por adição de conservantes.
Azeitona desidratada	Azeitonas verdes, pretas ou em fase de mudança de cor, que sofreram ou não tratamento alcalino suave, preservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas em sal e/ou submetidas a um processo térmico ou outro tipo de processo tecnológico.
Azeitona preta Oxidada	Azeitonas verdes, ou em fase de mudança de cor, preservadas em salmoura fermentadas ou não, escurecidas por oxidação em solução alcalina, preservadas em embalagem hermética e submetidas a processo de esterilização por calor.

1.2.1. Azeitona Maçanilha

A azeitona Maçanilha é a variedade mais utilizada na preparação de azeitonas de mesa em salmoura de acordo com o método Espanhol (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997). Caracteriza-se por ser um fruto de forma esférica com cerca de 3,5-5,0 gramas, com caroço de dureza média e que apresenta uma produtividade elevada em climas com invernos amenos (Figura 1.1).



Figura 1.1. Azeitona Maçanilha

É um fruto muito susceptível ao aparecimento de manchas escuras originadas por pancadas durante a colheita (Kouraba *et al.*, 2004; Segovia-Bravo *et al.*, 2008). Nesta fase, as azeitonas são colocadas em recipientes onde são transportadas ficando susceptíveis a danos como feridas e manchas na superfície. Estes danos ou feridas expõem os conteúdos celulares proporcionando aos microrganismos a entrada para o interior do fruto, infectando-o, levando à sua deterioração e promovendo reacções de oxidação. (Eskin, 2001). As manchas resultantes dos danos provocados na pele da azeitona, permanecem no fruto mesmo após a fermentação (Kouraba *et al.*, 2004; Segovia-Bravo *et al.*, 2008).

Embora todas as espécies de azeitona possam ser utilizadas para produção de azeitona de mesa, um conjunto de características como o tamanho, a forma, a razão polpa/caroço, a cor e a textura conferem à espécie Maçanilha características consistentes de estação para estação. A fermentação de azeitona da variedade Maçanilha caracteriza-se por ocorrer em condições de pH relativamente alto, superior a 4,5 (Kailis, 2007).

No Algarve a britagem de azeitonas Maçanilha verdes (Figura 1.2.) é o método mais popular de produzir azeitonas de mesa. Tradicionalmente as azeitonas são esmagadas com uma pedra (Figura 1.3.) e são colocadas em salmoura de forma a diminuir o sabor amargo. Actualmente já estão disponíveis no mercado equipamentos de britagem em aço inoxidável. A salmoura é preparada com sal marinho característico da costa Algarvia. Quando é necessário obter um efeito de preservação a salmoura é mantida ou pode ser substituída várias vezes no período até um mês, de modo a obter um produto pronto para consumo. Quando se pretende acelerar o processo de preparação, as azeitonas são lavadas várias vezes em água ou colocadas em sacos de rede em

águas correntes antes de serem colocadas em salmoura. As azeitonas britadas são consumidas temperadas com diversas ervas aromáticas como, orégãos, nêveda, alho, limão, tomilho ou louro.



Figura 1.2. Azeitona Maçanilha britada

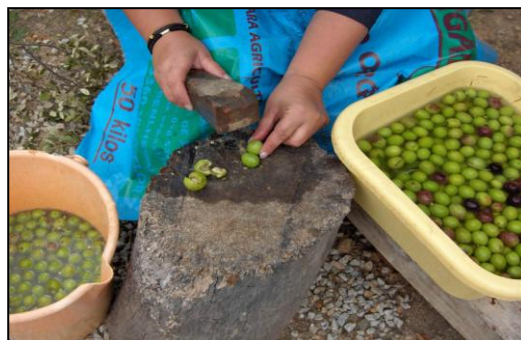


Figura 1.3. Processo de britagem da azeitona Maçanilha

1.2.2. Tipos de processamento de azeitona de mesa

Os processos de preparação de azeitona de mesa com maior relevância a nível mundial são Azeitona verde em salmoura, tratada segundo o método Espanhol, Azeitona preta oxidada de acordo com o método Californiano e Azeitona preta em salmoura, azeitona natural processada segundo o método Grego (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Nos primeiros dois processos o amargor do fruto originado pelos compostos fenólicos é removido por tratamento com solução de hidróxido de sódio (NaOH). Na azeitona preparada com o método Grego os frutos são colocados directamente na salmoura e a remoção do amargor é feita de uma forma lenta e incompleta.

Nas azeitonas processadas de acordo com o método Espanhol a fermentação é levada a cabo por bactérias ácido lácticas enquanto que nas azeitonas processadas através do método Grego os microrganismos responsáveis pela fermentação são leveduras e bactérias ácido lácticas constituindo estes grupos uma fracção da microbiota total (Campaniello *et al.*, 2005). Em alguns locais, as azeitonas de mesa preparadas de acordo com os métodos Espanhol e Grego são fermentadas com adição de culturas starter de bactérias ácido lácticas. Segundo Campaniello *et al.*, (2005) este tipo de ecossistemas são afectados por diferentes factores. Os mais importantes são a microbiota indígena, o pH e a actividade da água das azeitonas, a capacidade de difusão dos

nutrientes a partir dos tecidos dos frutos, a quantidade de compostos fenólicos e de ácidos orgânicos e finalmente a temperatura de fermentação e a concentração de sal na salmoura.

O método Espanhol de produção de azeitona de mesa é utilizado em 38% da produção mundial. O fruto processado de acordo com este método, é submetido a um pré tratamento com uma solução de hidróxido de sódio (1,0 – 2,6% p/v), por um período de 4 a 12 h, que penetra na polpa e por hidrólise, os compostos fenólicos (principalmente oleuropeína) são degradados resultando, o hidroxitirosol. A remoção deste composto antimicrobiano natural da azeitona é feita primeiramente por razões relacionadas com o sabor do produto final. Contudo, a oleuropeína e seus derivados se não forem removidos na fase inicial do processo, limitarão o crescimento das bactérias ácido lácticas condicionando o tipo de fermentação. O pH das azeitonas depois do tratamento com NaOH deve ser inferior a 8. Após o tratamento alcalino as azeitonas são lavadas com mudanças de água periódicas durante aproximadamente 24 horas (Robinson, 1988; Sánchez, *et al.*, 2000). Durante esta fase de pré-tratamento a microbiota inicial do fruto sofre uma redução (Hutkins, 2006). A azeitona é colocada em salmoura contendo cerca de 6 a 12% de NaCl. Quando a concentração inicial da salmoura é baixa é adicionado sal progressivamente ao longo do processo, de forma a obter uma concentração final de 8 a 9 % (p/v). Muitas vezes a salmoura é acidificada com 3 % (p/v) de ácido láctico (Robinson, 1988). No final da fermentação após 3 a 4 semanas, o pH da salmoura deve estar compreendido entre 3,5 e 4,2, com uma acidez titulável entre 0,8 e 1,0 (Hutkins, 2006). Este processo é caracterizado por ocorrer em 3 fases distintas em que os microrganismos se vão sucedendo (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Numa primeira fase ocorrem as bactérias Gram negativas, frequentemente membros da família *Enterobacteriaceae* e bactérias Gram positivas. A segunda fase é caracterizada por um crescimento progressivo de bactérias ácido lácticas e de leveduras e um decréscimo gradual do número de bactérias Gram negativas. Na terceira fase, é observado um crescimento abundante de *Lactobacillus*, sobretudo *Lactobacillus plantarum*, tornando-se o grupo de microrganismos predominante contudo podem existir em simultâneo leveduras responsáveis pela produção de compostos que conferem cheiro e sabor desejáveis (Panagou *et al.*, 2006; Hutkins, 2006). Na fermentação de azeitonas verdes preparadas segundo o método Espanhol as clorofilas são transformadas em feofitinas levando ao escurecimento do fruto. Os iões magnésio são substituídos por hidrogénio em todos os compostos porfirínicos uma reacção favorecida pelo meio ácido resultante do processo (Martins e Silva, 2002).

A produção de azeitona preta oxidada em salmoura, de acordo com o método Californiano corresponde a 90 a 95% da azeitona cultivada na Califórnia, sendo produzidos 30% da produção mundial (Segovia Bravo *et al.*, 2008; Hutkins, 2006). A variedade mais utilizada neste tipo de processamento é a Maçanilha. A azeitona é colhida na fase verde mas o produto final pode ser verde, ou preto, no caso das azeitonas de mesa oxidadas. Este método baseia-se em 3 passos principais: tratamento alcalino, armazenamento em salmoura e tratamento térmico (Mafra *et al.*, 2007). No início do processo, quando as azeitonas ainda estão verdes são colocadas em sucessivas soluções de NaOH e entre cada uma destas soluções são colocadas em tanques com injeção de ar. Durante este processo o fruto escurece gradualmente por oxidação (Garcia *et al.*, 1992). A solução alcalina penetra 1-2 mm na polpa do fruto (Marsilio *et al.*, 2001). O processo decorre entre tratamento alcalino e lavagens em tanques com injeção de ar, até se conseguir o valor de pH aproximadamente 8 (Brenes *et al.*, 1995).

Os compostos fenólicos presentes na azeitona são polimerizados pela acção do oxigénio, levando ao escurecimento dos frutos, primeiro para castanho e finalmente para preto (Hutkins, 2006). A cor final não é permanente e tende a desaparecer progressivamente. Para estabilizar a cor negra, os frutos podem ser imersos durante algumas horas em glucanato de ferro (García *et al.*, 1986). Os compostos fenólicos têm um papel importante na formação da cor negra característica deste tipo de azeitona de mesa, sendo o substrato de enzimas oxidativas.

Enquanto noutros alimentos o escurecimento oxidativo resulta em perdas nutricionais, em azeitonas de mesa produzidas segundo o método Californiano, estas reacções são parte de transformações desejáveis e essenciais que contribuem para a complexidade da cor (Marsilio *et al.*, 2001). As azeitonas produzidas de acordo com o método Californiano, apresentam um pH superior a 4,6. A sua preservação só é possível através de esterilização (Codex Alimentarius 66/1981).

O processo de preparação de azeitona preta em salmoura segundo o método Grego, é especialmente importante na Grécia onde representa quase 50% das 90.000-100.000 toneladas de azeitona de mesa produzida. As azeitonas são colhidas, seleccionadas, lavadas e imersas numa solução de NaCl 8-10% (p/v) sem pré-tratamento com solução de NaOH, ocorrendo então fermentações naturais que envolvem uma microbiota mista de bactérias Gram negativas, bactérias ácido lácticas e leveduras (Nisiotou *et al.*, 2009). Após um período inicial de fermentação vigorosa onde os diversos grupos microbianos competem pelos nutrientes o processo é dominado por

bactérias ácido lácticas e leveduras que coexistem até ao fim do processo onde a proporção entre as duas populações é determinante nas características do produto final (Nisiotou *et al.*, 2009). As leveduras são o grupo com maior representatividade na fermentação de azeitonas estilo Grego e as bactérias lácticas encontram-se presentes em número comparativamente menor. Os compostos fenólicos são parcialmente removidos por hidrólise, por difusão e diluição na salmoura (Nychas *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2008). Esta fermentação tem como produtos finais não só ácido láctico mas também ácido acético, ácido cítrico e ácido málico. O pH final deste tipo de azeitonas, é cerca de 4,5 e acidez inferior a 0,6% (Hutkins, 2006). A Figura 1.4. resume a metodologia utilizada na preparação de azeitona de mesa de acordo com os métodos Espanhol, Grego e Californiano.

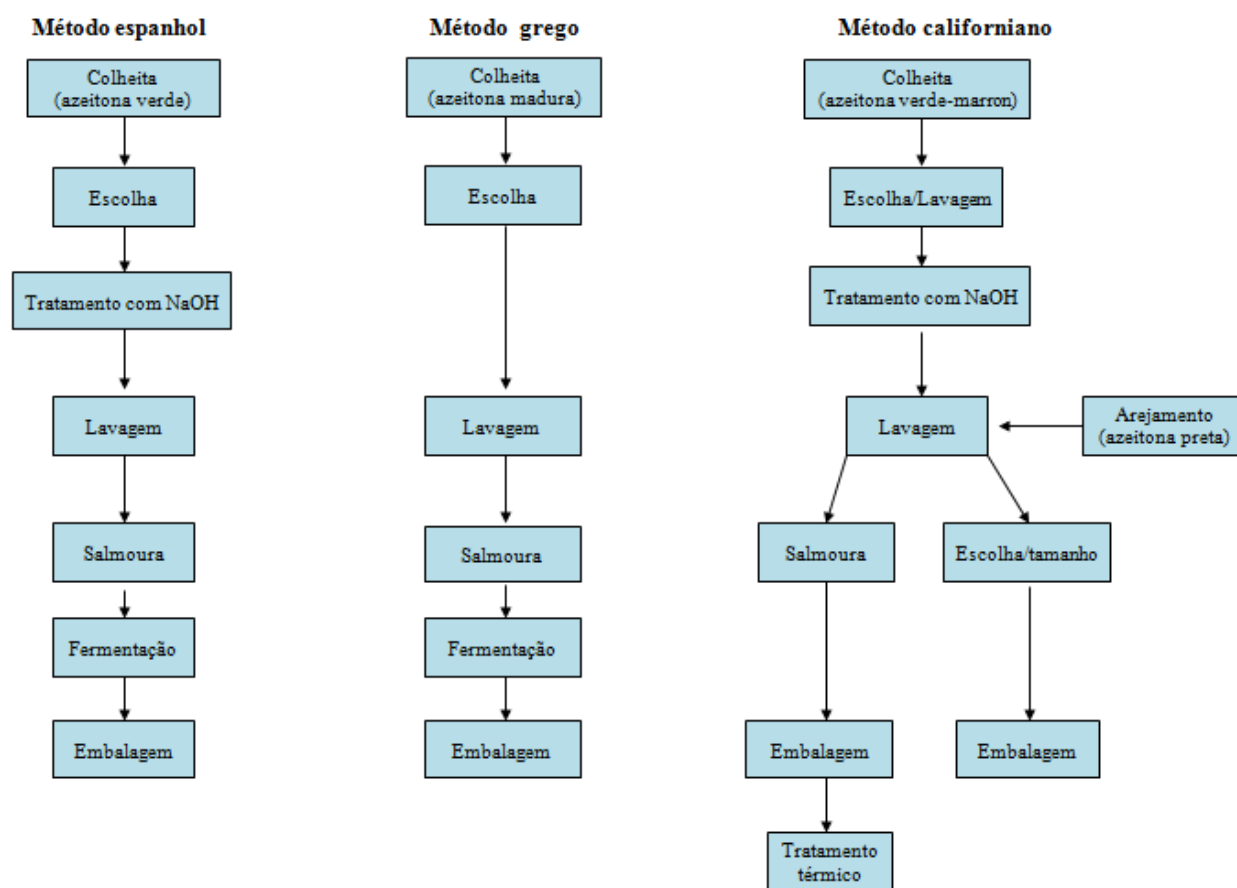


Figura 1.4. Métodos de preparação de azeitona de mesa (Adaptado de Hutkins, 2006).

Existem outros métodos tradicionais de processamento de azeitona de mesa verde ou preta bastante utilizados e designados por “azeitona directamente imersa em salmoura”. Nestes processos não se aplica o pré tratamento inicial com solução de NaOH, e os frutos são imersos em salmoura após esmagados ou cortados longitudinalmente.

No caso da azeitona britada, o processo pode envolver uma fase de pré tratamento com lavagens sucessivas com água, após a britagem. Esta fase, diminui a actividade microbiana e reduz a concentração de açúcares e compostos fenólicos para metade em relação à sua concentração inicial, sendo vantajosa para o processo contribuindo assim para a diminuição do sabor amargo do fruto mais rapidamente. Contudo, as lavagens podem também aumentar o pH e diminuir a acidez uma vez que os ácidos em solução na salmoura são removidos (Arroyo-López *et al.*, 2007).

A azeitona britada favorece trocas osmóticas entre a polpa e a solução envolvente (Arroyo-López *et al.*, 2008a). A taxa de difusão dos solutos, bem como a difusão de NaCl da salmoura para o interior do fruto, dá-se mais rapidamente devido à exposição dos tecidos internos do fruto provocada pela britagem (Arroyo-López *et al.*, 2007). O processo de fermentação de azeitonas britadas levado a cabo por leveduras, tem revelado ser sempre mais rápido que qualquer outro processo natural, facto que pode acelerar a degradação das clorofilas e consequentemente o escurecimento dos frutos (Arroyo-López *et al.*, 2008a).

Na salmoura ocorre uma fermentação caracterizada pelas condições físico-químicas existentes, temperatura, concentração em sal e variedade da azeitona. Os frutos são mantidos nesta solução de forma a perder total ou parcialmente o sabor amargo. De acordo com as necessidades de mercado, as azeitonas são retiradas da salmoura, temperadas com ervas aromáticas e embaladas para consumo (Arroyo –Lopez *et al.*, 2008a).

Em fermentação de azeitonas não tratadas com NaOH, podem ocorrer problemas de derrame de salmoura por transbordo da salmoura dos recipientes e de escurecimento dos frutos resultantes de alterações físico-químicas e da actividade microbiana.

Outro problema relacionado com escurecimento enzimático e oxidativo tem a ver com oxidação de compostos fenólicos que pode ser minimizado pela imersão das azeitonas processadas em salmoura, numa solução ácida (Segóvia-Bravo *et al.*, 2010).

Para além destes tipos de processamento de azeitona de mesa existem outros de menor expressão económica, característicos de regiões específicas. Em Portugal a azeitona da variedade Galega é fermentada naturalmente inteira, sendo das azeitonas de mesa mais características do país.

1.3 Microbiota na azeitona de mesa

A microbiota endógena dos vegetais é constituída por fungos filamentosos, leveduras bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas. Microrganismos aeróbios como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Bacillus* crescem à superfície dos tecidos de vegetais fazendo parte da microbiota residente, tal como microrganismos anaeróbios facultativos *Enterobacter*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* e outras enterobacterias. É característico também dos vegetais a presença de leveduras incluídas nos géneros de *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Rhodotorula*. As bactérias ácido lácticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* fazem também parte da microbiota dos vegetais com níveis de 10^3 células por grama de produto. Em relação às populações de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e *Escherichia* têm sido descritos valores de 10^7 células por grama de produto. Esta diferença coloca as bactérias ácido lácticas em desvantagem numérica comparativamente com outros microrganismos presentes nos produtos de origem vegetal (Hutkins, 2006).

No caso da azeitona, diversos factores afectam a microbiota endógena específica tais como os polifenóis, que inibem o crescimento das bactérias ácido lácticas (Oliveira *et al.*, 2004).

Ao longo do processo de fermentação de azeitonas a predominância de uma população microbiana sobre outras depende de vários factores tecnológicos tais como a concentração de sal na salmoura, pH inicial, oxigénio disponível, capacidade de difusão dos nutrientes do fruto para o meio e temperatura de fermentação (Nisiotou *et al.*, 2009). Em geral, a população microbiana diminui gradualmente com o aumento da concentração de sal na salmoura. Em concentrações de sal na salmoura de cerca de 8 %, verifica-se um retardamento no crescimento de bactérias ácido lácticas independentemente da temperatura de fermentação. Como consequência tem-se observado

um aumento no crescimento das leveduras tolerantes ao sal, resultando um produto final menos ácido de pH mais elevado (Tassou *et al.*, 2002).

A evolução do crescimento microbiano durante a fermentação de azeitonas verdes é caracterizada por um período inicial em que as bactérias Gram negativas, principalmente enterobactérias são dominantes, seguido de um período de crescimento de bactérias lácticas e leveduras e diminuição gradual das bactérias Gram negativas. Quando o número de bactérias lácticas é superior ao número de leveduras, a fermentação láctica é favorecida e obtém-se um produto com um valor pH baixo, inferior a 4,5. Quando acontece o contrário, as azeitonas adquirem um sabor mais suave em relação ao obtido na fermentação láctica, com um pH acima dos 4,5 (Garrido Fernández *et al.*, 1997; Nychas *et al.*, 2002; Tassou *et al.*, 2002; Chammem *et al.*, 2005; Panagou *et al.*, 2006; Panagou *et al.*, 2008).

1.3.1. Bactérias ácido-lácticas

O termo bactérias ácido lácticas não corresponde a um grupo taxonómico mas sim a um conjunto de bactérias com características específicas do ponto de vista funcional e genético. São bactérias Gram positivas produtoras de ácido láctico, não formadoras de esporos, com propriedades bioquímicas genéticas e fisiológicas semelhantes. Não possuem a enzima catalase, são tolerantes a valores de pH ácido, podendo ser aerotolerantes e anaeróbias facultativas (Hutkins, 2006).

As bactérias ácido lácticas são descritas como um grupo de microrganismos com necessidades nutricionais complexas que crescem apenas em meios ricos em nutrientes. São microrganismos característicos de diferentes habitats tais como vegetais, leite e carne mas também salmouras, alimentos ácidos e até bebidas alcoólicas.

Estas bactérias metabolizam açúcares com produção de ácidos fundamentalmente através de duas vias metabólicas, a homofermentativa em que 90% do ácido produzido é o ácido láctico e a

heterofermentativa em que 50% ou menos, corresponde ao ácido láctico e os restantes 50% são ácido cítrico, ácido málico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono e hidrogénio (Hutkins, 2006). Estes ácidos levam à diminuição do valor de pH da salmoura inibindo os microrganismos patogénicos indesejáveis (enterobacteria e clostrídios) e promovendo o crescimento de leveduras.

A maioria das populações de bactérias lácticas encontradas em azeitonas verdes não tratadas com NaOH pertence ao género *Lactobacillus*, sobretudo *L. plantarum* e *L. pentosus* (Segóvia-Bravo *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2008). Outros autores referem a população de bactérias lácticas neste tipo de azeitonas constituída por *L. brevis* (50 %), *L. casei* e *Enterococcus spp.* (Randazzo *et al.*, 2004).

Estudos levados a cabo em fermentação espontânea de azeitonas da variedade Maçanilha, não tratadas com solução de NaOH, mostram que não existem bactérias ácido lácticas na salmoura ao longo do processo (De la Torre *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2004; Aponte *et al.*, 2010). Uma explicação para esse facto deve-se à presença na salmoura de compostos fenólicos que para além de serem responsáveis pela cor dos frutos, exercem actividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos, entre eles as bactérias ácido lácticas (Medina *et al.*, 2008 e 2009).

Na prática, são muitos os factores que determinam o equilíbrio da contribuição das várias espécies de microrganismos ao longo da fermentação, especialmente os parâmetros intrínsecos do vegetal, a concentração de sal utilizada, a temperatura, a capacidade tampão da salmoura e a presença de compostos antimicrobianos (Hurtado *et al.*, 2009).

1.3.2. Leveduras

As leveduras são organismos eucariotas incluídas no Dominio *Eucarya*, no reino *Fungi*, unicelulares, pelo menos numa fase do seu ciclo de vida. Possuem uma parede celular formada essencialmente por manano, glucano e quitina. São destituídas de órgãos de locomoção e não possuem plastos. Na maior parte dos casos são saprófitas conhecendo-se contudo alguns casos de parasitismo. Podem produzir esporos sexuais ou reproduzir-se assexuadamente por gemulação,

no entanto em algumas espécies pode ocorrer bipartição. A reprodução sexuada leva à formação de ascos (Filo Ascomycota) ou à diferenciação dos basídios que originam os basidiósporos (Filo Basidiomycota). Na categoria não filogenética Deuteromicetes estão agrupadas as espécies em que não está descrita a reprodução sexuada (Deacon, 2006).

Em termos gerais as leveduras crescem melhor em baixos valores de pH e a_w do que as bactérias. São bastante versáteis e capazes de se multiplicar em diferentes habitats providenciados pelo homem, que tem seleccionado ao longo dos anos este grupo de microrganismos caracterizados pelas excelentes propriedades utilizadas na produção de diversos alimentos. A fermentação levada a cabo pelas leveduras é um processo em que os açúcares são transformados em água, etanol e dióxido de carbono.

Na produção de azeitona de mesa directamente imersa em salmoura, é comum a presença de leveduras (Rodriguez-Gomez *et al.*, 2010).

As leveduras predominantes na fermentação de azeitonas verdes, pertencem maioritariamente, aos géneros *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces* (Arroyo-López *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2008; Rodriguez-Gómez *et al.*, 2010). Populações de leveduras, com níveis entre 3 e 5 log de UFC/mL têm sido encontradas em fermentações de azeitonas em salmoura com valores de pH muito baixo, em condições de aerobiose e de anaerobiose (Castro *et al.*, 2007).

De acordo com Fernandez Diez *et al* (1985), Garrido *et al* (1995) e Sanchez *et al* (2000), a actividade da população de leveduras, encontrada em elevado número ao longo da fermentação de azeitonas directamente imersas em salmoura e azeitonas pretas, desempenha um papel de grande importância nas características organoléticas finais da azeitona verde de mesa. Constituem a microbiota predominante desde que os níveis de NaCl usados na salmoura sejam iguais ou superiores a 8%.

O papel das leveduras no processamento de azeitonas de mesa, tem aspectos positivos e negativos ao longo da fermentação e posteriormente na fase de embalagem (Arroyo–Lopez *et al.*, 2008b). Os aspectos benéficos das leveduras consistem na produção de compostos voláteis desejáveis (etanol, álcoois, glicerol e ésteres), que melhoram as propriedades organolépticas do produto, tais como textura, sabor e odor (Garrido Fernandez *et al.*, 1995), promovem o crescimento de bactérias ácido lácticas (Segovia Bravo *et al.*, 2007), possuem a actividade killer e promovem a biodegradação de compostos fenólicos (Garrido *et al.*, 1995; Garrido Fernandez *et al.*, 1997; Psani and Kotzekidou., 2006).

Ao longo do seu crescimento as leveduras sintetizam vitaminas, aminoácidos e purinas destacando-se entre as vitaminas a tiamina (vitamina B₁), ácido nicotínico, piridoxina (vitamina B₆), ácido pantoténico e outros co-factores (Arroyo–Lopez *et al.*, 2008b). No caso de fermentações alcoólicas ou não alcoólicas levadas a cabo por leveduras, a produção de ésteres contribui para a produção do aroma e sabor característicos. Essa produção é condicionada por factores como a temperatura, pH, concentração de oxigénio e natureza dos substratos utilizados (Arroyo-lópez *et al.*, 2008b).

Alguns destes compostos produzidos pelas leveduras funcionam como antioxidantes que retardam a degeneração oxidativa dos lípidos e promovem a saúde humana. Um exemplo dessa actividade é a produção de carotenoides, ácido cítrico, glutatona e tocoferol, por espécies de *Candida* e de *Saccharomyces*. A síntese destas substâncias pode ser induzida no crescimento das leveduras sob condições de stress ou ainda ser resultado da utilização de componentes específicos do meio fermentativo, como compostos fenólicos ou aditivos que são tóxicos para as células (Arroyo-López *et al.*, 2008b).

As leveduras podem também ser causadoras de problemas na fermentação de azeitonas como é o caso da formação de bolsas de gás e o amolecimento dos tecidos do fruto. O gás resultante do metabolismo das leveduras é um factor difícil de controlar, uma vez que as leveduras estão naturalmente presentes em grande número nas azeitonas (Hernandez *et al.*, 2007).

O controlo de factores da fermentação como a diminuição do pH e o aumento da concentração de NaCl na salmoura, pode não ser suficiente para evitar a deterioração causada pelas leveduras. Foram efectuados estudos em que se utilizou solução de extracto de alho para controlo da

população de leveduras onde se demonstrou a eficácia deste produto mas por outro lado, foram afectadas negativamente as características organoléticas do produto final (Hernandez *et al.*, 2007).

A utilização de leveduras seleccionadas com actividade killer conhecida, como culturas starter, constitui outra forma de proteger o produto contra espécies de leveduras de deterioração. As leveduras killer produzem proteínas e glicoproteínas tóxicas (toxinas killer), que causam a morte a outras espécies de leveduras (killer sensíveis) (Schmitt *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007).

Assim sendo, a utilização de leveduras como controlo biológico, pode melhorar o processo de produção de azeitonas de mesa, reduzindo as necessidades de sal na salmoura ou evitando o uso de conservantes químicos (Hernández *et al.*, 2007).

Na fase final da fermentação podem ocorrer alterações causadas por leveduras, tais como acumulação de CO₂ na embalagem, turvação das salmouras, produção de cheiros indesejáveis e resistência aos conservantes (Turantas *et al.*, 1999). Outro problema associado à presença de leveduras diz respeito à actividade sacarolítica de algumas espécies, na medida em que são produzidas enzimas que levam à degradação da parede celular dos frutos. Esta actividade foi descrita em *Rhodotorula minuta* e *Debaryomyces hansenii* em fermentação de azeitonas verdes de mesa (Hernandez *et al.*, 2007). Segundo Hernández *et al.*, (2006), populações de leveduras das espécies *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis* podem crescer e formar biofilmes na salmoura e produzir galacturonases que levam ao amolecimento e posterior degradação dos frutos.

Nas Tabelas II e III estão resumidos os principais efeitos causados por leveduras isoladas em azeitona de mesa ao longo das fases de fermentação e embalagem.

Tabela II– Vantagens e desvantagens da presença de leveduras no processo de fermentação de azeitonas de mesa [Arroyo-López *et al.* (2006, 2008b), Garrido Fernandez *et al.* (1997), Hernandez *et al.* (2007), Hurtado *et al.*(2008)].

Fermentação		
Vantagens	Espécies	Desvantagens
Produção de compostos voláteis e metabolitos desejáveis	(em estudo)	Formação bolsas de gás; Produção excessiva de CO ₂ ; Turvação anormal em líquidos; Formação de películas à superfície de salmouras;
Actividade anti oxidante	<i>P. anomala</i>	Actividade poli sacarolítica
Promoção do crescimento de bactérias ácido lácticas	<i>D. hansenii</i> <i>S. cerevisiae</i>	Actividade poli galacturonase, alteração de aroma e sabor.
Actividade Killer	<i>D. hansenii</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>K. marxianus</i>	Produtos com sabor mais suave e menor preservação crescimento à superfície das salmouras

Tabela III– Problemas relacionados com a presença de leveduras no processo de embalagem de azeitonas de mesa. [Arroyo-López *et al.* (2006, 2008b),Garrido Fernandez *et al.* (1997), Hernandez *et al.* (2007), Hurtado *et al.* (2008)].

Espécies	Desvantagens
<i>S. cerevisiae</i> <i>P. anomala</i>	Produção de CO ₂ ; Rebentamento de embalagens;
<i>D. hansenii</i> <i>R. minuta</i>	Turvação das salmouras; produção de cheiros e sabores desagradáveis
<i>R. glutinis</i> <i>R. minuta</i> <i>R. rubra</i>	Amolecimento dos frutos
Não relacionado claramente com leveduras	Resistência a elevadas concentrações de conservantes

A identificação de leveduras em azeitona de mesa, é efectuada desde há muito, de forma a determinar os seus efeitos nos processos fermentativos. Mrak *et al.*, (1956) identificaram *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Pichia membranaefaciens* e *Rhodotorula glutinis* nos Estados Unidos da América. Mais tarde, Gonzalez Cancho *et al.*, (1966) encontraram em fermentações de azeitona verde produzida de acordo com o método Espanhol, leveduras dos géneros *Candida*, *Pichia* e da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Marquina *et al.*, (1992) isolaram várias espécies do género *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* em azeitonas verdes directamente imersas em salmoura. *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia anomala* foram descritas como espécies predominantes na fermentação de azeitonas pretas produzidas segundo método Espanhol (Gonzalez Cancho *et al.*, 1975). Em fermentações desenvolvidas na presença de oxigénio isolaram-se leveduras das espécies *Candida saitoana*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* e *Walliopsis saturnus* variedade *mrakii* (Duran Quintana *et al.*, 1986).

Tassou *et al.*, (2002), relatou que em fermentação de azeitonas pretas, Conservolea cv. as leveduras eram o único grupo de microrganismos a crescer em concentrações de NaCl de 8%. Estudos realizados em Portugal e Marrocos mostram as principais espécies de leveduras presentes na fermentação de azeitonas verdes directamente imersas em salmoura, *Pichia anomala*, *Kuyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae* e em azeitonas verdes temperadas, as espécies *Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Torulaspora delbrueckii* e *Candida boidinii*. Contudo continua por determinar a função de cada um destes microrganismos no processo fermentativo (Marquina *et al.*, 1992).

As espécies *Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodothorula glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae* são leveduras vulgarmente encontradas em diversos processos de fermentação de azeitonas (Arroyo-Lopez *et al.*, 2008b; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2010).

A Tabela IV resume as principais espécies de leveduras mais frequentemente isoladas em azeitonas de mesa de acordo com o processo utilizado e o país onde foram isoladas.

Tabela IV– Principais leveduras identificadas em processos de preparação de azeitona de mesa e país onde foram isoladas. [Arroyo-López *et al.* (2006, 2008b), Garrido Fernandez *et al.* (1997), Hernandez *et al.* (2007), Hurtado *et al.* (2008)].

Azeitona verde (Estilo Espanhol)		Azeitona verde (Directamente imersa em salmoura)		Azeitona preta	
Espécie	País	Espécie	País	Espécie	País
<i>C. crusei</i>	Espanha	<i>C. boidinii</i>	Espanha/ Portugal Marocos	<i>C. boidinii</i>	Espanha / França
<i>C. parapsilopsis</i>	Espanha/EUA	<i>C. didensiae</i>	Espanha	<i>C. saitoana</i>	Espanha
<i>C. rugosa</i>	Espanha/EUA	<i>D. hansenii</i>	Portugal	<i>Cryptococcus laurentis</i>	Grecia
<i>C tropicalis</i>	Espanha	<i>G.candidum</i>	Espanha	<i>D. etchelsii</i>	França
<i>P. anomala</i>	Espanha	<i>K. lactis</i>	Espanha	<i>H. guilliermondii</i>	Espanha
<i>P. membranaefaciens</i>	Espanha/EUA	<i>K.marxianus</i>	Portugal	<i>P. anomala</i>	França /Espanha
<i>R. glutinis</i>	EUA	<i>P. anomala</i>	Portugal	<i>P. membranaefaciens</i>	Espanha
<i>S. cerevisiae</i>	Espanha	<i>P. kluyveri</i>	Espanha	<i>R. glutinis</i>	Espanha
		<i>P. membranaefaciens</i>	Espanha / Portugal	<i>S. cerevisiae</i>	Espanha
		<i>R. glutinis</i>	Espanha	<i>T. delbrueckii</i>	Grécia
		<i>R. minuta</i>	Portugal	<i>W. saturnus var. mrakii</i>	Espanha
		<i>S. cerevisiae</i>	Espanha / Portugal		
		<i>T. delbrueckii</i>	Marrocos		

Estão descritas populações de leveduras na ordem dos 6,5 log UFC/mL em azeitona verde britada directamente imersa em salmoura, da variedade Maçanilha-Alorena preparadas com 11% de solução de NaCl (Arroyo López *et al.*, 2007). Em fermentações de azeitonas pretas preparadas com 7,5% de NaCl as leveduras constituíam o grupo dominante com valores a atingir 6,0 log UFC/mL (Panagou *et al.*, 2006). Poucos são os estudos que relacionam a dinâmica das diversas espécies de leveduras em azeitona de mesa mas tem sido demonstrado que a presença de algumas espécies no início condiciona a presença ou extinção de outras espécies ao longo do processo e determina o tipo e rendimento do produto final.

Diversas espécies de leveduras têm sido identificadas em azeitona de mesa preparada de acordo com diferentes processos industriais e tradicionais. A Tabela V apresenta um resumo desses isolados.

Tabela V – Leveduras isoladas em fermentações de azeitonas de mesa.

[Marquina *et al.*,(1992); Arroyo-Lopez *et al.*, (2008, 2008b); Rodriguez-Gomez *et al.*,(2010); Mrak *et al.*, (1956); Gonzalez Cancho *et al.* ,(1966, 1975); Rodriguez-Gomez *et al.*,(2010); Alves *et al.*, (2012)]

Azeitona de mesa		Leveduras	Autores
Método Espanhol		<i>Candida krusei</i>	
		<i>C. parapsilosis</i>	Mrak <i>et al.</i> (1956)
		<i>Candida rugosa</i>	Gonzalez Cancho <i>et al.</i> (1966, 1975)
		<i>Pichia membranaefaciens</i>	Arroyo-Lopez <i>et al.</i> (2008)
		<i>Rhodotorula glutins</i>	Rodriguez-Gomez <i>et al.</i> ,(2010)
		<i>Candida sp.</i>	
		<i>Pichia sp.</i>	
Azeitona Verde	Método tradicional (salmoura)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		<i>Debaryomyces sp.</i>	
		<i>Candida sp.</i>	
		<i>Rhodotorula sp.</i>	
		<i>Pichia anomala</i>	Arroyo-Lopéz <i>et al.</i> (2008)
		<i>Kuyveromyces marxianus</i>	
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	Rodriguez-Gomez <i>et al.</i> (2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Método tradicional (britada)		<i>Pichia membranaefaciens,</i>	
		<i>Torulasporea delbrueckii</i>	
		<i>Candida boidinii</i>	
		<i>Candida boidinii</i>	
		<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	
		<i>Candida diddensiae,</i>	
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	
	<i>Candida quercitrusa</i>	Alves <i>et al.</i> (2012)	
Azeitona Preta	Método tradicional	<i>Zygotulasporea mrakii</i>	
		<i>Pichia galeiformi</i>	
		<i>Citeromyces matritensis</i>	
		<i>Candida oleophila</i>	
		<i>Saccharomyces cerevisiae e Pichia anomala</i>	Tassou <i>et al.</i> (2002) Panagou <i>et al.</i> (2006) Gonzalez Cancho <i>et al.</i> (1975)

1.4. Métodos de identificação de leveduras

Até há alguns anos atrás a caracterização e identificação de leveduras assentava fundamentalmente em aspectos morfológicos e bioquímicos (Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman *et al.*, 1998). Recentemente, a identificação de leveduras é preferencialmente realizada recorrendo a técnicas moleculares o que permite uma maior exactidão na classificação dos isolados (Guillamon *et al.*, 1998; Arroyo-Lopez *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008; Arroyo-Lopez *et al.*, 2008b). Estes métodos, baseiam-se, na maior parte dos casos, em análises do ácido desoxirribonucleico (DNA) dos genes correspondentes ao RNA ribossómico (rRNA). Em leveduras têm sido utilizadas as sequências de DNA correspondentes ao RNA 26S e 5.8S da subunidade grande dos ribossomas (Large sub unit – LSU rDNA), assim como do RNA 18S da subunidade ribossómica mais pequena (Small sub unit – SSU rRNA). Os genes de rDNA possuem informação para os três tipos de RNA que se encontram nos ribossomas dos eucariotas (18S, 5.8S e 26S) e para as zonas não transcritas designadas por Internal transcribed spacers (ITS).

As regiões ITS1 e ITS2 são regiões não codificantes e variáveis e o gene 5.8S rRNA é uma região codificante e conservada. Estas regiões em conjunto permitem a identificação de espécies distintas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) (Figura 1.5).

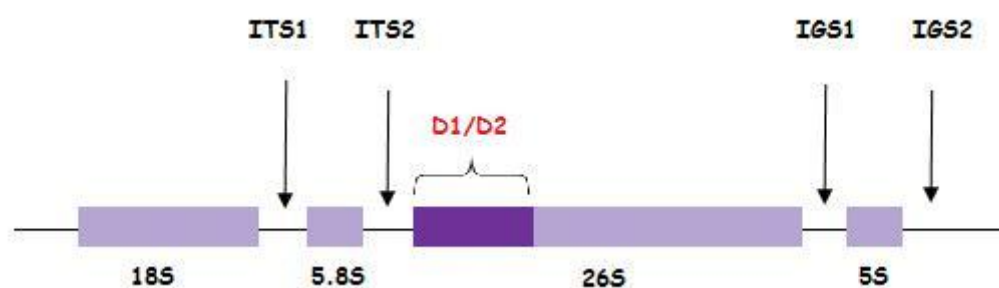


Figura 1.5. Representação esquemática do locus rDNA em leveduras. Internal transcribed spacers - ITS. IGS – Intergenic spacer (Spencer, 2001)

A região ITS é de extrema importância na elaboração de primers no sentido de obter uma rápida identificação e diferenciação das espécies que se pretende identificar. Um primer é uma pequena sequência de nucleótidos que hibridiza no início da sequência alvo da qual é complementar. Os primers são usados na reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) onde ocorre a amplificação da sequência específica de ácidos nucleicos (sequência alvo), das amostras a estudar. Ao reconhecer o primer, a enzima DNA polimerase sintetiza uma cópia complementar, obedecendo à informação contida na sequência de DNA que será replicada. Para se dar a reação de PCR é também necessária uma mistura de desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP; dTTP; dGTP; dCTP).

Diversos estudos têm referido a região ITS e o gene 5.8S rDNA, bastante mais vantajosos na identificação e diferenciação de fungos, do que os genes 18S do rDNA. Os genes ribossomais evoluem de uma forma concertada, apresentando um baixo polimorfismo intraespecífico e uma alta variabilidade interespecífica. Estas regiões ribossômicas têm sido muito utilizadas na classificação de espécies de leveduras e na identificação de leveduras do vinho (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), de azeitonas (Arroyo-López *et al.*, 2006) e de outros vegetais como a mandioca (Ferreira *et al.*, 2009).

Os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC.3') são usados para amplificar a região do gene rRNA, que inclui as duas regiões não codificantes, ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S rRNA.

Uma das técnicas utilizadas para identificar espécies de leveduras é a amplificação da região ITS – 5.8S rRNA seguida de restrição com endonucleases. Esta técnica consiste na análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) onde a restrição da região ITS – 5.8S amplificada dá origem a fragmentos distintos consoante as espécies em estudo.

Os fragmentos são posteriormente separados por electroforese em gel, de acordo com o seu tamanho, dando origem a padrões de restrição específicos para cada espécie. Estes métodos permitem resultados em 24 h em contraste com métodos convencionais que podem durar 3 a 4 dias ou mesmo semanas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Spencer, 2001; Ferreira *et al.*, 2009).

Outro método utilizado para identificação de leveduras consiste na Sequenciação parcial de DNA. Este método baseia-se na comparação de sequências da região D1/D2 (Figura 1.4) da

subunidade grande (26S). As sequências de nucleótidos desta região são características para cada espécie de leveduras o que permite efectuar avaliações entre as relações intraespecíficas e interespecíficas.

Para se proceder à sequenciação, a região do rDNA é amplificada com os primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG).

As sequências obtidas são posteriormente comparadas com as presentes em bases de dados, como a disponível pelo National Center of Biotechnology Information (NCBI), através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). O BLAST compara as sequências de ácidos nucleicos da região amplificada de acordo com a sua similaridade, com bases de dados de sequências actualmente disponíveis, fornecendo resultados de identificação de espécies com extrema rapidez (Kurtzman *et al.*, 1998).

1.5. Características funcionais da azeitona de mesa

Dos alimentos associados à dieta Mediterrânea conhecidos por contribuírem de uma forma benéfica para a saúde, o azeite e a azeitona são dos mais importantes. A azeitona é uma fonte de compostos fenólicos fitoesteróis, escaleno e lípidos monoinsaturados que apresentam propriedades biológicas desejáveis (Boskou *et al.*, 2004; Andrikopoulos, 2010).

Estão descritos cerca de quinze compostos fenólicos na azeitona. A oleuropeína, conhecido como o responsável pelo amargo do fruto, o hidroxitol, o tirosol, o cafeico, o ácido oleanólico e o ácido cumárico entre outros, estando a sua concentração dependente do grau de maturação dos frutos e dos processos utilizados (Boskou *et al.*, 2004; Saija *et al.*, 2001).

Estudos recentes mostram actividade farmacológica de alguns destes compostos fenólicos sugerindo que possam ser promotores da saúde humana (D'Angelo *et al.*, 2001). As principais actividades biológicas associadas à oleuropeína, hidroxitol triosal, verbascosido e outros compostos fenólicos encontrados em azeitona estão relacionadas com as suas propriedades antioxidantes (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos têm sido descritos como responsáveis por inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e a acumulação de

produtos finais oxidados nas células. A oxidação de moléculas de lipoproteínas e de outros lipídios, origina precursores de doenças coronárias. Por isso, associam-se a estes compostos efeitos protectores contra doenças cardíacas, como a arritmia e simultaneamente protecção contra o stress oxidativo das células humanas (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Boskou *et al.*, 2004; Andrikopoulos, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram uma baixa incidência de arteriosclerose, doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro na região mediterrânica em comparação com outras regiões. Os resultados destes estudos têm sido atribuídos à dieta praticada pela população nesta região (Tripoli *et al.*, 2005). Os benefícios para a saúde obtidos com este tipo de dieta são atribuídos à elevada concentração de ácidos gordos monoinsaturados (ácido oleico), e de outros componentes encontrados na azeitona, tais como tocoferóis, polifenóis e triterpenóis. O consumo de ácido oleico, reduz o risco de arteriosclerose pois torna as lipoproteínas menos sensíveis à peroxidação e simultaneamente reduz os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDC) e aumenta os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL). São também reconhecidos os efeitos benéficos do ácido oleico, na diabetes, triglicerolemia e doenças auto imunes como artrite reumatóide (Tripoli *et al.*, 2005).

A fracção não saponificável do azeite contém os compostos triterpenicos pentacíclicos tais como ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido maslínico, uvaol e eritrodiol. Diversos estudos demonstram que estes compostos possuem propriedades anti inflamatórias, antioxidantes e anti tumorais (Allouche *et al.*, 2009).

Resultados de testes in-vitro realizados com extracto alcoólico de azeitona de mesa de origem Grega, revelaram que, estes extractos ricos em compostos fenólicos, exibem eficácia na prevenção do cancro gástrico através da limitação da proliferação das células inflamadas induzindo a sua supressão e morte (Kountouri *et al.*, 2009).

Um estudo realizado utilizando cinco variedades de azeitona de mesa comercializada na Grécia revelou que o consumo de cerca de 50 g de azeitonas fornece cerca de 56 mg de compostos fenólicos. Testes levados a cabo *in vivo* mostraram que após a ingestão de azeitonas a concentração de polifenóis no sangue aumenta, provando que este compostos estão biodisponíveis (Andrikopoulos, 2010). Assim, conhecidos os benefícios destes compostos, a ingestão de 5 a 10 azeitonas de mesa cobre as necessidades diárias de compostos fenólicos (Boskou *et al.*, 2004).

1.5.1. Fermentação

A fermentação é um processo bioenergético de transformação de substâncias orgânicas, induzido por microrganismos ou pelas suas enzimas. Pode ser definida como uma alteração a nível bioquímico em que a oxidação anaeróbica ou parcialmente anaeróbica dos hidratos de carbono é levada a cabo por microrganismos. Quando realizada segundo processos tradicionais, a fermentação é um fenómeno espontâneo que inclui diversas fases, influenciadas pelas espécies microbianas associadas com a matéria-prima e com as condições ambientais envolventes (Hutkins, 2006). Durante a fermentação, os microrganismos usam os nutrientes das azeitonas, especialmente os açúcares, produzindo ácidos que baixam o pH do produto (Hutkins, 2006; Cocolin e Ercolini, 2008). Consequentemente, a acidez da salmoura aumenta e o pH decresce sendo estes factores determinantes para uma fermentação bem sucedida e um produto seguro (Spyropoulou *et al.*, 2001). Os ácidos orgânicos produzidos pela microbiota durante a fermentação são fundamentais contribuindo para o desenvolvimento de aromas característicos no produto final. Estes ácidos em equilíbrio com os seus sais actuam como um tampão estabilizando o pH da salmoura. Esta capacidade tamponizante pode não ser desejável na medida em que não permite que durante a fermentação se obtenha o pH óptimo (Marsilio *et al.*, 2008).

A fermentação de alimentos de origem vegetal é uma prática utilizada em todo o mundo em larga escala. A matéria-prima usada para a produção dos três alimentos fermentados mais consumidos mundialmente é a couve, os pimentos e as azeitonas, (Tabela VI), que se caracterizam por ser alimentos com elevada quantidade de água, baixo conteúdo em proteínas, em hidratos de carbono e em gordura, à excepção da azeitona. A composição do alimento é um factor determinante no tempo de fermentação (Hutkins, 2006).

Tabela VI – Composição de substratos usados em fermentação de vegetais Hutkins, (2006).

Vegetal	Água	Hidratos de Carbono	Proteína	Lipídios
Couve	92% - 94%	5% - 6%	1%	-
Pimento	95%	2% - 3%	1%	-
Azeitona	78% - 80%	2% - 4%	1% - 2%	12% - 14%

A fermentação de vegetais reduz factores antinutricionais tais como glicosidos cianogénicos e ácidos fíticos sendo este efeito resultante do próprio processo que pode envolver o esmagamento ou imersão em líquidos (Martin *et al.*, 2008).

Os processos fermentativos levados a cabo por culturas mistas de microrganismos, são condicionados pela disponibilidade dos substratos fermentáveis, pela concentração de sal, pH, condições de aerobiose/anaerobiose e temperatura que no seu conjunto determinam os grupos de microrganismos dominantes em cada fase do processo (Panagou *et al.*, 2008). Durante esta fase, componentes solúveis como açúcares, sais minerais e polifenóis passam da azeitona para o exterior (salmoura). Estes componentes, são utilizados pela microbiota presente e vão alterando a composição do líquido ao longo do tempo (Castro *et al.*, 2007; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2010). É importante monitorizar estes factores de forma a melhorar a fase da fermentação e obter produtos consistentes e de elevada qualidade final.

A maior parte dos estudos relacionados com as alterações que ocorrem na azeitona de mesa durante a fermentação, são efectuados com base no líquido fermentativo que envolve o fruto.

A temperatura e o sal são os parâmetros que mais influenciam o processo fermentativo. Ambos podem ser decisivos no controlo de aspectos da fermentação tais como:

- Quantidade das populações microbianas;
- Selecção das espécies microbianas envolvidas;
- Qualidade dos produtos finais.

A temperatura do processo, além de ter um efeito directo na taxa de crescimento dos microrganismos afecta também a taxa de difusão dos solutos. Desta forma o aumento da

temperatura favorece a difusão dos nutrientes para a salmoura especialmente no período inicial do processo (Tassou *et al.*, 2002).

A fermentação enquanto fase da produção de azeitona de mesa, tem o propósito de:

- Desenvolver características organolépticas específicas que resultam do crescimento dos microrganismos envolvidos;
- Melhorar a digestibilidade.
- Prolongar a conservação dos produtos;

1.6. Defeitos nas azeitona

A azeitona de mesa é um alimento fermentado muito susceptível de sofrer degradação microbiana. A microbiota responsável por essa alteração é constituída por bactérias e fungos aeróbios, bactérias e fungos anaeróbios facultativos, anaeróbios estritos e bactérias formadoras de esporos. Factores como a disponibilidade de glucose ou o valor de pH acima de 4,5 promovem o crescimento deste tipo de microrganismos originando alterações no produto final. Os maiores problemas associados com azeitonas de mesa têm a ver com amolecimento dos frutos e a excessiva produção de gás (Hutkins, 2006).

Quando estão presentes na fermentação bactérias produtoras de ácido propiónico, verifica-se o defeito no produto final designado por “zapatera”. Ocorre no final da fermentação quando estas bactérias metabolizam o ácido láctico em ácido propiónico, ácido acético e CO₂, podendo levar a um aumento de pH, o que favorece o crescimento de espécies de *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium botulinum* e outras espécies de clostrídios putrefactivos.

O crescimento de *Clostridium botulinum* e respectiva produção de toxinas, consiste no perigo microbiológico mais importante em azeitona de mesa fermentada (Pereira *et al.*, 2008).

O metabolismo associado à produção de ácido propiónico, ácido acético e CO₂, resulta na libertação de um odor “amanteigado” desagradável e muito forte, que pode ocorrer sobretudo quando o pH é superior a 4,5 e quando a concentração de NaCl é baixa (Hutkins, 2006). O efeito zapatera é frequente, sobretudo em azeitonas colocadas directamente em salmoura e fermentadas naturalmente (Montaño *et al.*, 1992).

As azeitonas podem ficar contaminadas com bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* durante a colheita, no transporte ou na lavagem sendo este grupo de bactérias considerado um indicador da higiene durante o processamento (Spyropoulou *et al.*, 2001). Numa fase inicial da fermentação, estes microrganismos produzem gás que se acumula entre a epiderme e a polpa do fruto, provocando uma separação das duas estruturas, abrindo fissuras ou formando bolhas. Este defeito é conhecido popularmente por “olho de peixe” e está associada ao crescimento de bactérias coliformes, um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Este crescimento pode ser evitado se a fermentação for controlada correctamente em relação ao teor de NaCl e ao pH e desta forma não se verificará a presença destes microrganismos durante a fermentação de azeitonas (Hernandez *et al.*, 2006; Hutkins, 2006).

O amolecimento dos frutos, um defeito descrito como dos mais comuns na fermentação da azeitona de mesa, está relacionado com a hidrólise da pectina através da actividade pectinolítica de fungos filamentosos, como por exemplo *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e menos frequentemente por bactérias coliformes (Hutkins, 2006).



MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos

2.1 Avaliação das alterações físico-químicas e microbiológicas ocorridas ao longo da fermentação de azeitona verde britada

Os frutos da espécie *Olea europaea L.* da variedade Maçanilha utilizados neste estudo, foram colhidos manualmente ao longo do mês de Setembro de 2008, em Pechão concelho de Olhão. Neste período, o fruto encontra-se no estado de maturação verde (cor verde amarelada) e caracteriza-se por ser muito amargo e de textura rija. Após a colheita, as azeitonas foram transportadas para o laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve e as fermentações preparadas à escala laboratorial e a temperatura controlada. À chegada, foram escolhidas de forma a obter um lote homogêneo sem cortes ou picadas de insectos. O fruto seleccionado foi lavado duas vezes com água da rede de forma a retirar poeiras e detritos sólidos. Seguiu-se a operação da britagem que consiste em partir (esmagar) o fruto, um a um. Procedeu-se a mais uma lavagem com água da rede para se retirar o excesso do líquido proveniente dos frutos. As azeitonas foram posteriormente tratadas segundo dois processos tradicionais Algarvios envolvendo fermentações naturais em salmoura.

Processo A - consistiu em britar a azeitona verde e submetê-la a um pré-tratamento com água ao longo de uma semana, tendo sido essa água substituída por salmoura que se manteve até ao fim do período de fermentação.

Processo B - consistiu em colocar a azeitona em salmoura imediatamente após a britagem e mantê-la desta forma até ao fim do período de fermentação.

No estudo desenvolvido com o Processo A, cerca de 400 g de azeitonas britadas, foram pesadas, colocadas em frascos de vidro estéreis com tampa de rosca (de capacidade de 700 mL) e cobertas com água mineral. Ao fim de dois dias a água foi removida e substituída por nova água mineral. Este procedimento repetiu-se a cada dois dias ao longo de uma semana. Ao fim deste período a água foi substituída por uma solução de salmoura NaCl 8% (p/v) que se manteve até ao fim da fermentação. No que diz respeito ao Processo B pesaram-se 400 g do fruto e colocaram-se em frascos de vidro estéreis (de capacidade de 700 mL) com tampa de rosca e juntou-se salmoura NaCl 8% (p/v) que se manteve até ao fim da fermentação. Utilizaram-se dois frascos de fermentação para cada processo de preparação de azeitona britada, (A e B). O primeiro para determinar a dinâmica da microbiota ao longo da fermentação bem como as

alterações físico-químicas do líquido fermentativo. O segundo foi utilizado para estudar as variações ocorridas na cor. Efectuou-se o estudo da fermentação da azeitona britada, tratada pelos Processos (A e B), à temperatura de 25 °C durante 30 dias e à temperatura de 18 °C durante 60 dias. Na Fig.2.1 apresentam-se os diagramas de produção de azeitona verde britada estudada ao longo do presente trabalho.

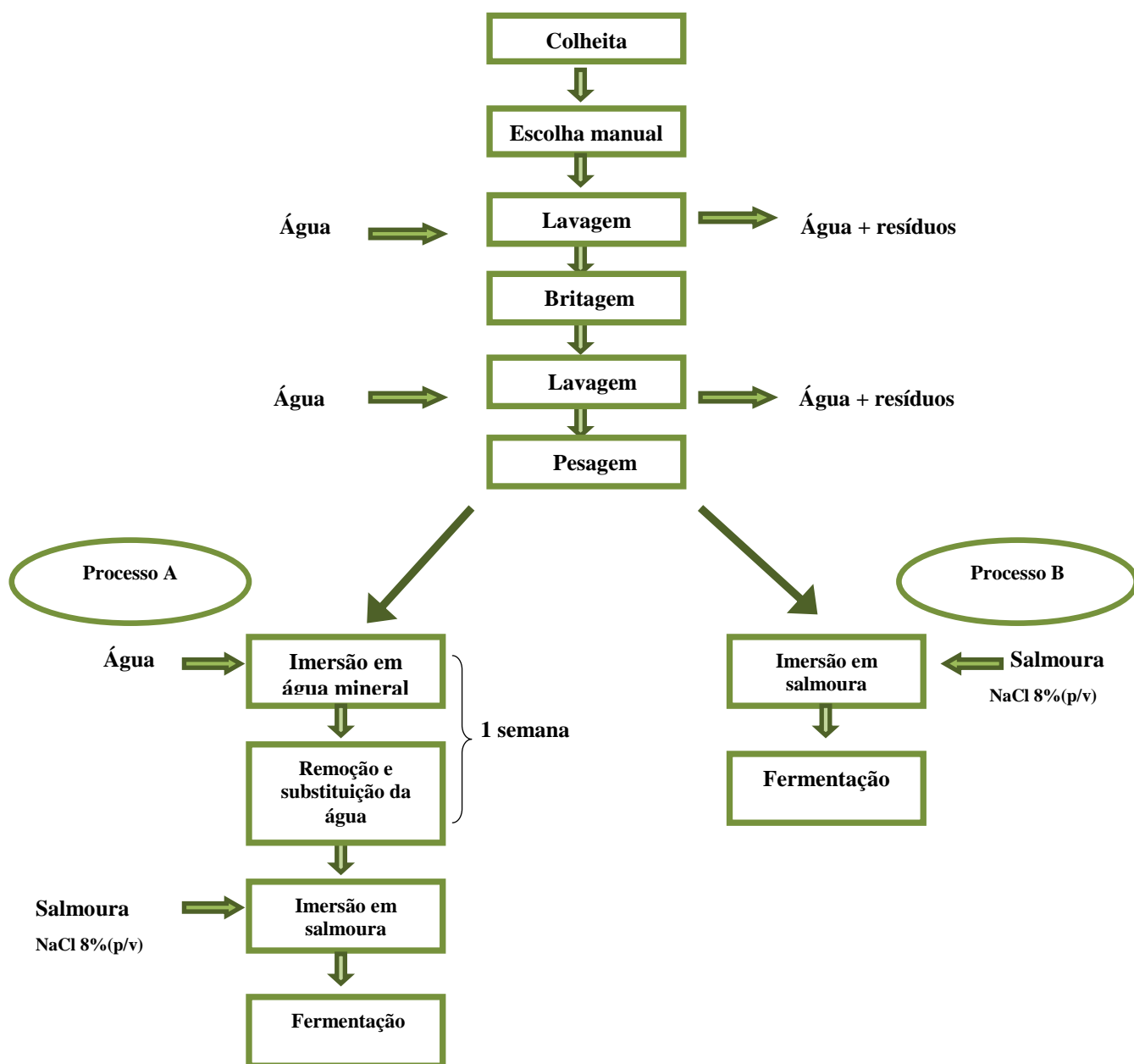


Fig.2.1. Diagrama de produção de azeitona verde britada de acordo com os Processos A e B.

2.1.1 Amostragem

As amostras de salmoura e azeitonas foram recolhidas assepticamente em intervalos de tempo regulares de forma a avaliar as alterações ao longo do processo de fermentação. O controlo analítico iniciou-se no dia 1 de cada fermentação que correspondeu a uma segunda-feira e posteriormente foi repetido na quarta e na sexta. Esta periodicidade manteve-se até ao fim de cada fermentação. A salmoura foi recolhida, para as análises microbiológicas e físico químicas. As determinações microbiológicas bem como medição de pH e acidez total foram realizadas imediatamente após a recolha. Em cada ponto de amostragem 6 mL de salmoura foram centrifugados a 10000 rpm, 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi congelado (-20 °C). Estas amostras foram usadas na determinação de açúcares e compostos fenólicos. Foram também recolhidas em condições de assepsia amostras de azeitonas para a determinação da cor. Após a recolha, os frascos foram imediatamente fechados permanecendo assim até à recolha de amostras seguinte. O procedimento de recolha utilizado foi idêntico nos dois processos de preparação da azeitona, A e B e para as duas fermentações a 25 °C e a 18 °C, respectivamente.

2.1.2 Parâmetros microbiológicos

Antes de se proceder às fermentações, determinou-se a microbiota existente à superfície do fruto. Para isso pesaram-se 25 g de frutos para um saco de stomacker e misturou-se em 225 mL de Solução de Ringer (Merck). Deixou-se em repouso cerca de 3 minutos agitando ligeiramente. Fizeram-se diluições decimais e pesquisou-se a microbiota total a 30 °C, fungos filamentosos e leveduras, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias do género *Pseudomonas* e bactérias ácido lácticas (BAL).

O líquido fermentativo foi também analisado, imediatamente após a preparação dos frascos de fermentação o que correspondeu ao primeiro dia do trabalho e posteriormente em intervalos regulares de dois em dois dias. Fizeram-se diluições decimais até à diluição 10^{-5} com solução de Ringer (Merck). Pesquisou-se a microbiota total a 30 °C, fungos filamentosos e leveduras, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias do género *Pseudomonas* e bactérias ácido lácticas. As análises foram efectuadas em duplicado.

Contagem da microbiota total a 30 °C

A contagem da microbiota total a 30 °C, foi feita tendo como base a Norma Portuguesa 4405 (2002) Contagem de microrganismos a 30 °C. O inóculo constituído por 0,1 mL de líquido fermentativo e suas diluições foram inoculados em duplicado à superfície do meio de cultura Tryptone Soya Agar (Scharlau) acidificado a pH 5,0 com solução de HCl (1M) para reflectir as condições de acidez da amostra. As placas foram incubadas a 30 °C durante 4 dias. Após este período, contaram-se todas as colónias presentes na superfície do meio de cultura.

Contagem de bactérias do género *Pseudomonas*

A contagem de bactérias do género *Pseudomonas* efectuou-se no meio de cultura Cetrimide agar (Scharlau) acidificado a pH 5,0 com solução de HCl (1M), por espalhamento de 0,1 mL do líquido fermentativo e respectivas diluições. Incubaram-se as placas a 30 °C durante 4 dias. Contaram-se as colónias características de *Pseudomonas* que foram posteriormente confirmadas através da realização de coloração de Gram detectando os bastonetes Gram negativos possuidores da enzima catalase.

Contagem de leveduras

A enumeração de leveduras efectuou-se por espalhamento de 0,1 mL de líquido fermentativo bem como das suas diluições decimais à superfície de Malt Extract agar (Scharlau) suplementado com Chloranphenicol a 0,1 % para inibição do crescimento de bactérias e acidificado a 5,0 com HCl (1M). Após incubação a 25 °C durante 4 dias contaram-se as colónias características de leveduras, tendo sido estas repicadas para meio de Potato Dextrose agar, PDA (Scharlau), para posterior identificação.

Contagem de fungos filamentosos

A contagem de fungos filamentosos teve como procedimento a Norma Portuguesa NP 3277-1 (1987) – Contagem de bolores e leveduras em alimentos.

Inoculou-se 1mL de líquido fermentativo bem como das suas diluições decimais à superfície do meio de cultura Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Scharlau), acidificado a pH 5. As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias. Contaram-se todas as colónias características de fungos filamentosos. As colónias de leveduras presentes foram repicadas para PDA para posterior identificação.

Contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae*

A enumeração de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* procedeu-se por incorporação 1 mL de líquido fermentativo e respectivas diluições decimais em meio de cultura cromogénico Chromocult coliform agar (Merck) acidificado a pH 6,0 com solução de HCl (1M). Incubaram-se as placas a 37 °C durante 1 a 2 dias. Contaram-se todas as colónias presentes, rosa, violeta, roxas azuis, e brancas como enterobacterias.

Contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem de bactérias ácido lácticas efectuou-se através da incorporação de 1 mL de líquido fermentativo e suas diluições decimais no meio de cultura Man Rogosa and Sharp (Scharlau) acidificado a pH 5,0 suplementado com cicloheximida. Após a solidificação das placas, o meio inoculado foi coberto com uma camada do mesmo meio. Incubou-se a 30°C durante 4 dias. Observaram-se as placas no sentido de contar todas as colónias presentes no meio de cultura.

Fez-se a confirmação de bactérias lácticas pesquisando a presença de cocos ou bastonetes Gram positivos não possuidores da enzima catalase.

2.1.2.1 Identificação de leveduras

Após o isolamento de leveduras em Malt Extract Agar e Rose Bengal Agar selecionaram-se colónias e repicaram-se para placas com PDA. Nesta primeira fase a identificação baseou-se nas características morfológicas das colónias como a cor, o tamanho, as margens, o brilho, a textura e a elevação. Numa fase seguinte confirmou-se a presença de células de leveduras ao microscópio e estudou-se a morfologia celular através de preparações a fresco.

Após a confirmação da pureza, as culturas isoladas em Potato Dextrose Agar conservaram-se à temperatura de refrigeração, em tubos inclinados do mesmo meio. As leveduras foram repicadas para novo meio a cada 30 dias.

Numa fase posterior, as leveduras isoladas foram identificadas por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP), e por sequenciação parcial do DNA (Kurtzman *et al.*, 1998). Para realizar o estudo através de RFLP, os primers ITS1 e ITS4 foram usados de forma a amplificar a região do gene rRNA, a qual inclui as duas regiões não codificantes, ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S rRNA.

Os produtos de PCR obtidos de cada isolado, foram digeridos pelas enzimas de restrição, *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* originando padrões de restrição distintos para cada espécie (Esteve Zarzoso *et al.*, (1999). Para confirmação das identificações obtidas por RFLP, recorreu-se à sequenciação da região D1/D2 do gene 26S do rDNA.

Extracção de DNA

A extracção de DNA foi efectuada a partir de culturas de leveduras crescidas durante 16 h em meio de cultura Yeast Malt Agar YM (0,5 % peptona, 0,3 % extracto de levedura, 0,3 % malte, 1% glucose), a 25 °C numa incubadora orbital com agitação (IKA KS 4000i). As culturas foram centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos numa centrífuga (Eppendorf 5415 R).

Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de água destilada ultra pura estéril. Procedeu-se novamente a uma centrifugação a 12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Adicionou-se ao precipitado 500 µL de uma solução de sorbitol 0,9 M, e 35 µL de uma solução de *zymolyase* 1 mg/mL. Após agitação, incubou-se a 37 °C durante 60 minutos, posteriormente centrifugou-se a 12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Substituiu-se o sobrenadante por 500 µL de uma solução de 50 mM tris HCl, 20 mM EDTA e adicionou-se ainda 13 µL de uma solução SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10 %.

No passo seguinte, agitou-se a mistura e incubou-se durante 5 minutos a 65 °C. Adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5 M e colocou-se no gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se 15 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo contendo 700 µL de isopropanol (-20 °C), com o objectivo de fazer precipitar o DNA. Incubou-se novamente à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) durante 10 minutos. Após uma centrifugação durante 15 minutos a 4 °C a 12000 rpm, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com etanol a 70 %. Efectuou-se uma nova centrifugação durante 3 minutos a 4 °C a 12000 rpm e retirou-se cuidadosamente o etanol e o seu excesso com um papel absorvente.

Deixou-se evaporar o etanol à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de água destilada ultra pura estéril e armazenou-se a -20 °C. Esta solução de DNA foi diluída de acordo com a concentração desejada quando utilizada nas reacções de PCR.

Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação da região 5.8S-ITS realizou-se de acordo com Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999). Para tal utilizaram-se os primers ITS1 (0,5 µM) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (0,5 µM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC.3') White *et al.*, (1990). Prepararam-se as reacções de PCR num volume de 100 µl de acordo com a Tabela VII. Distribuiu-se 97 µL da mistura de reagentes (Mix) em cada tubo de PCR. Os restantes 3 µL a colocar nos tubos de PCR corresponderam à solução de DNA, diluída ou não, extraído de cada isolado.

Tabela VII – Mistura para PCR.

Reagentes	Concentração na Mix	Volume (µL)
Primer Forward ITS 1	0,5 µM	2
Primer Reverse ITS 4	0,5 µM	2
Desoxiribonucleótidos (Promega)	10 µM	10
MgCl ₂ (Promega)	1,5 mM	10
DNA Polimerase (Promega)	5 unidades	1
Tampão	1 x	20
Água ultra pura estéril	-	52
DNA	-	3
Total	-	100

As condições em que decorreram as reacções de PCR encontram-se resumidas na Tabela VIII.

Tabela VIII – Condições da amplificação

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação Inicial	94	3
Desnaturação	95	1
Annealing	55,5	2
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler) através de um passo de desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, annealing a 55,5 °C durante 2 minutos e extensão a 72 °C durante 2 minutos. No final ocorreu um passo de extensão a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados num gel de agarose (1 %) em TAE (1X) contendo 5 µL de brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 pb Ladder, Biorad). Após a electroforese (100 V), os géis foram visualizados no sistema G-Box Syngene- Genesys 10 UV Scanner.

Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Os produtos resultantes da reacção de PCR (uma alíquota constituída por 13 µL) foram digeridos com as enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* (Bioron) (Tabela IX). As misturas foram incubadas 12 horas, a 37°C e os fragmentos de restrição foram separados em géis de agarose 3% em tampão TAE (1x). Após electroforese (130 V) os géis foram corados com brometo de etídio (1,5 mg/l) e visualizados no sistema G-Box Syngene-Genesys 10 UV Scanner. Os tamanhos dos fragmentos de DNA resultantes da restrição foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 pb Ladder, Biorad). Os perfis de restrição obtidos foram gravados e comparados com os publicados por outros autores (Guillámon *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Sabate *et al.*, 2002; Llanos-Frutos *et al.*, 2004; Arroyo-López *et al.*, 2006).

Tabela IX – Reagentes utilizados na preparação das soluções para a reacção de restrição.

Reagentes	Volume (µL)
Quantidade de enzima	0,8
DNA amplificado	13
Água ultra-pura estéril	2
Tampão do enzima	2
Total	17,8

Amplificação para a sequenciação parcial do gene 26S rRNA

A região do rDNA foi amplificada com os primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG), nas condições descritas na Tabela VIII.

2.1.3 Parâmetros físico-químicos

Determinação de pH

O valor de pH foi determinado por medição directa utilizando o potenciómetro (Hanna Instruments, HI 8424). Antes da determinação do pH de cada amostra o aparelho foi calibrado, utilizando duas soluções padrão, uma a pH 4 e outra a pH 7.

Determinação de compostos fenólicos

Para determinar a concentração total de compostos fenólicos no líquido fermentativo foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. Adicionou-se a 0,2 mL de cada amostra na diluição adequada, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 N) e 0,8 mL de solução saturada de carbonato de sódio (7,5 %). Após 30 minutos ao abrigo da luz, foi lida a absorvância a 765 nm. Preparou-se uma curva de calibração com ácido gálico com concentrações compreendidas entre 0-0,3 g/L. Para as diluições da solução de ácido gálico e para o branco utilizou-se uma solução com 3% de NaCl (Huang *et al.*, 2006).

Determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo foi determinada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS), tendo-se adicionado 1 mL de DNS a 1 mL da diluição adequada de líquido fermentativo. Após 5 minutos em banho de água a 100 °C seguido de arrefecimento, leu-se a absorvância, a 540 nm, num espectrofotómetro (Genesys™ 10 series), utilizando como branco, água destilada. As concentrações em açúcares redutores foram calculadas usando uma curva de calibração construída com soluções de glucose (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 g/L) (Maldonado *et al.*, 2008).

Determinação da cor

Utilizou-se um colorímetro (Dr Lange Spectro-colour, Neutex, spectral- QC, Espanha) para avaliação da cor na superfície das azeitonas. A cor foi determinada por conjugação dos 3 parâmetros de medição: **L** (luminosidade; L= 100 branco, L= 0 preto) **a** (-a = verde, +a = vermelho) e **b** (-b = azul, +b = amarelo). Em cada momento de análise utilizaram-se 3 azeitonas e fizeram-se 6 medições em cada uma (Martins e Silva, 2002).



RESULTADOS

3. Resultados

No presente capítulo encontram-se os registos das alterações microbiológicas e físico-químicas ocorridas no líquido fermentativo, verificadas ao longo de dois processos fermentativos A e B realizados a 18 e a 25 °C com vista à obtenção de azeitona de mesa britada.

No Processo A a azeitona britada foi submetida a um pré tratamento com água e posteriormente colocada em salmoura. No Processo B, os frutos foram colocados em salmoura imediatamente após a britagem.

Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas resultaram da média de duas determinações em cada ponto de amostragem, excepto para a cor que resultou da média de 6 medições em 3 frutos.

3.1 Parâmetros microbiológicos

3.1.1 Microbiota à superfície do fruto

Antes de se proceder ao processamento do fruto, determinou-se a carga microbiana existente à sua superfície. A amostra foi recolhida em embalagem estéril e analisada imediatamente à chegada ao laboratório.

O fruto utilizado para preparação da fermentação a 25 °C continha $6,0 \times 10^3$ UFC/g no que diz respeito à microbiota total a 30 °C, $2,2 \times 10^2$ UFC/g em fungos filamentosos e as leveduras estavam presentes a níveis de $1,4 \times 10^3$ UFC/g. De acordo com os métodos e as condições utilizadas não foram encontradas BAL, bactérias do género *Pseudomonas* e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Tabela X).

A microbiota total a 30 °C na azeitona utilizada para preparação da fermentação a 18 °C era de $2,0 \times 10^4$ UFC/g. Os fungos filamentosos estavam presente com $6,3 \times 10^3$ UFC/g e as leveduras com $3,2 \times 10^3$ UFC/g. Nesta amostra não foram detectadas BAL, bactérias do género *Pseudomonas* e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

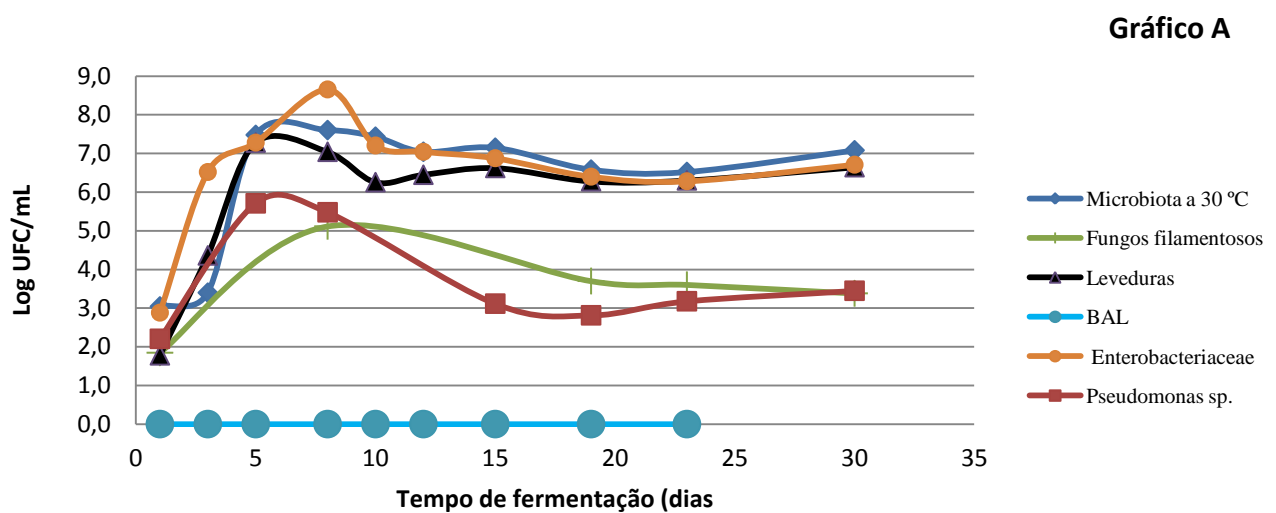
Tabela X – Microbiota existente à superfície do fruto antes de ser processado

Microrganismos	Fermentação a 25 °C	Fermentação a 18 °C
	UFC/g	UFC/g
Microrganismos a 30°C	$6,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
Fungos filamentosos	$2,2 \times 10^2$	$6,3 \times 10^3$
Leveduras	$1,4 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$
Bactérias ácido lácticas	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
Enterobactérias	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$

3.1.2 Microbiota da fermentação realizada a 25 °C

A evolução da microbiota ao longo do tempo de processamento com vista à obtenção de azeitona de mesa britada está representada na Figura 3.1. Esta figura mostra as alterações nas populações microbianas estudadas no líquido fermentativo da azeitona processada de acordo com Processos A e B, decorridos a 25 °C.

Processo A



Processo B

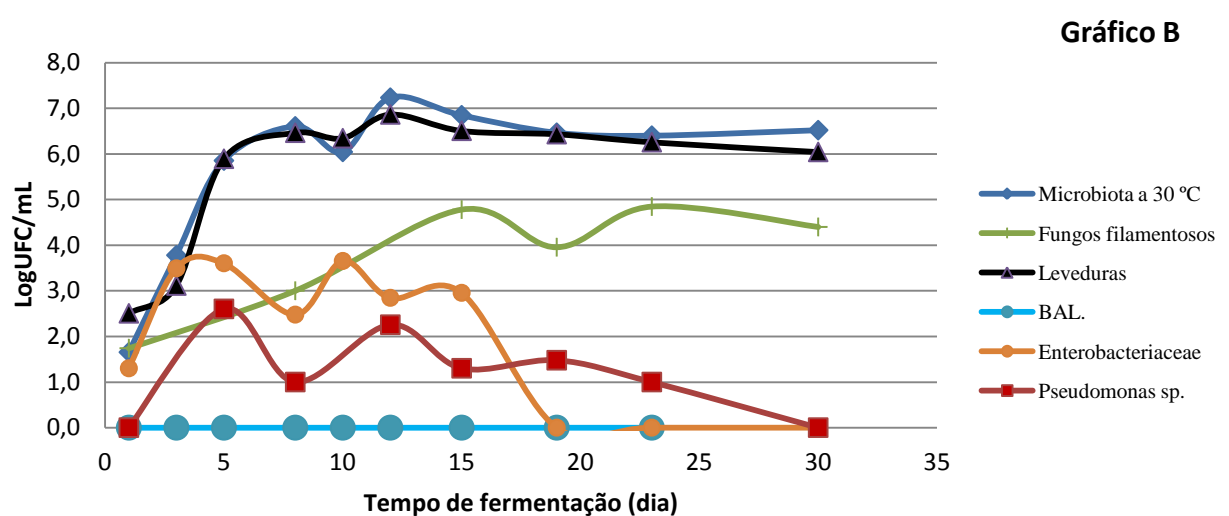


Fig 3.1. Evolução da microbiota durante a fermentação de azeitonas processadas, de acordo com o Processos A e B a 25 °C. Microbiota total a 30 °C, leveduras, fungos filamentosos, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias do género *Pseudomonas* e Bactérias ácido lácticas (BAL).

A partir dos gráficos da Figura 3.1. e no que diz respeito ao líquido fermentativo das azeitonas tratadas segundo o Processo A, verifica-se que ocorreu um crescimento exponencial em todos os grupos de microrganismos pesquisados ao longo dos 5 a 8 primeiros dias de fermentação com exceção das BAL. Após esse período, o crescimento das populações microbianas entrou em fase estacionária, mantendo-se até ao fim do processo, tendo os valores variado entre 3,0 log UFC/mL para as bactérias do género *Pseudomonas*, 7,9 log UFC/mL para a microbiota total a 30 °C e 6,5 log UFC/mL para as bactérias da família *Enterobacteriaceae*. A população de leveduras atingiu valores de 7,0 log UFC/mL de líquido fermentativo ao fim de 5 dias, entrando depois em fase estacionária de crescimento.

De acordo com o Processo B, em que as azeitonas não foram submetidas a lavagens com água, a população de leveduras cresceu exponencialmente até ao 8º dia, a partir do qual entrou em fase estacionária, com valores entre 6,0 e 7,0 log UFC/mL de líquido fermentativo analisado. As bactérias do género *Pseudomonas*, estiveram presentes nos primeiros 12 dias de fermentação com 2,5 log UFC/ mL de líquido fermentativo. Posteriormente observou-se uma diminuição desta população até ao seu desaparecimento por volta do 30º dia da fermentação.

A população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* foi encontrada na salmoura durante os primeiros 15 dias de fermentação com contagens na ordem dos 3,0 log UFC/ mL. A partir daí observou-se um declínio desta população, tornando-se as contagens inferiores a 1 UFC/ mL a partir do 19º dia da fermentação.

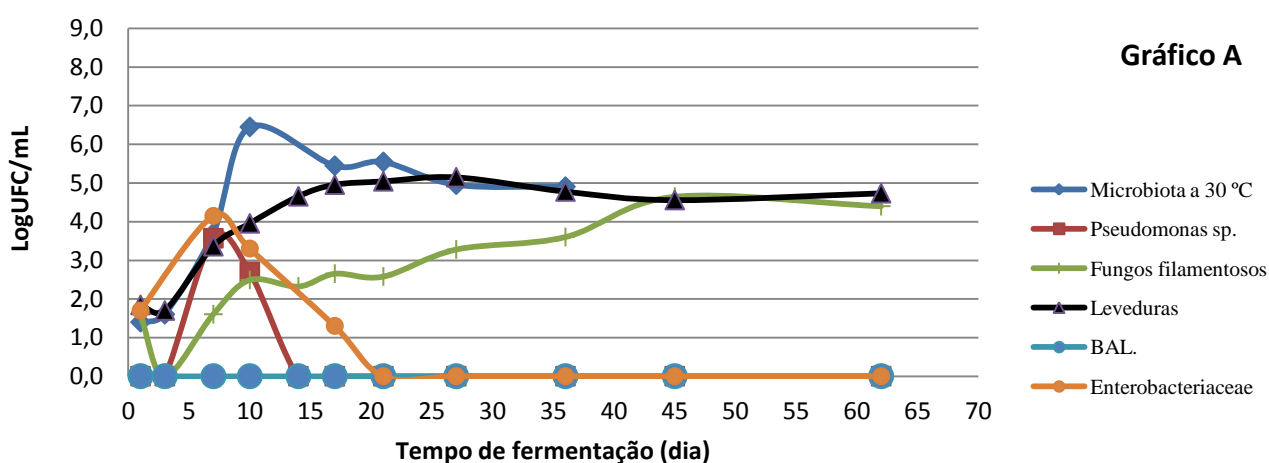
Em relação à população de fungos filamentosos, foi possível observar que esteve presente desde o início das fermentações nos dois processos estudados. No líquido fermentativo preparado de acordo com o Processo A, esta população atingiu 5,0 log UFC/mL ao 8º dia da fermentação, altura em que começou a diminuir atingindo o valor de 3,5 log UFC/mL que se manteve até ao fim do processo. No estudo levado a cabo com o Processo B, esta população manteve-se em crescimento exponencial até ao 15º dia (4,8 log UFC/mL de líquido fermentativo) entrando de seguida numa fase estacionária que se manteve até ao fim do processo.

O número de UFC de BAL detectadas no líquido fermentativo em qualquer dos processos foi inferior a 1 por mL.

3.1.3 Microbiota da fermentação realizada a 18 °C

A evolução da microbiota ao longo do tempo de processamento com vista à obtenção de azeitona de mesa britada está representada na Figura 3.2. Esta figura mostra as alterações nas populações microbianas estudadas no líquido fermentativo da azeitona processada de acordo com Processos A e B, decorridos a 18 °C.

Processo A



Processo B

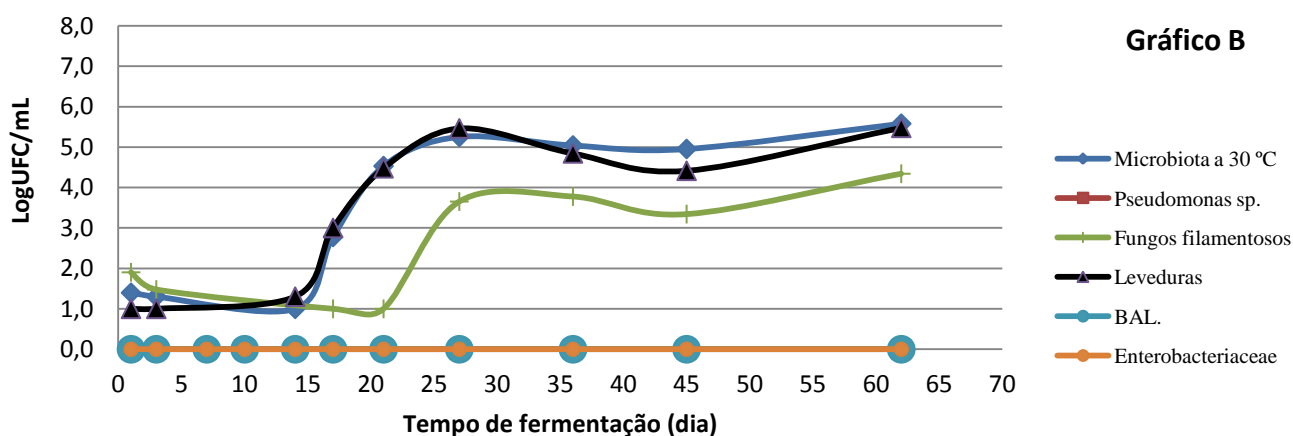


Fig 3.2. Evolução da microbiota durante a fermentação de azeitonas processadas, de acordo com os Processos A e B a 18 °C. Microbiota total a 30 °C, leveduras, fungos filamentosos, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias do género *Pseudomonas*, e Bactérias ácido lácticas (BAL).

Da análise dos gráficos da Figura 3.2. e no que diz respeito ao líquido fermentativo das azeitonas tratadas segundo o Processo A, verifica-se que nos primeiros 8 dias em que se procedeu ao pré tratamento das azeitonas com água, as populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, fungos filamentosos e leveduras encontravam-se em fase de crescimento exponencial. A partir desse momento a microbiota total a 30 °C bem como a população de leveduras entraram em fase estacionária mantendo-se até ao fim da fermentação na ordem dos 5,0 log UFC/mL.

A população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* atingiu o valor máximo de crescimento no 7º dia da fermentação (4,0 log UFC/mL de líquido fermentativo) tendo-se verificado a partir daí um declínio com o desaparecimento total no 20º dia da fermentação.

A população de bactérias do género *Pseudomonas* foi detectada a partir do 7º dia de fermentação com 3,0 log UFC/mL de líquido fermentativo. Contudo, as contagens foram diminuindo não tendo sido detectadas colónias após o 14º dia da fermentação.

Os fungos filamentosos sofreram uma redução no início do processo com o pré-tratamento das azeitonas. A partir do 5º dia verificou-se um aumento desta população até ao final atingindo um valor de 4,0 log UFC/mL.

Quanto ao Processo B (Fig.3.2.) em que as azeitonas britadas foram colocadas directamente em salmoura, observa-se, no que diz respeito à microbiota total a 30 °C e à população de leveduras que permaneceram em fase de adaptação às condições do processo durante os primeiros 15 dias. A população de fungos filamentosos manteve-se no processo em condições de adaptação cerca de 20 dias. De seguida observou-se uma fase de crescimento exponencial em que a microbiota total a 30 °C e a população de leveduras atingiram valores de 5,0 log UFC/mL e os fungos filamentosos de 4,0 log UFC/mL. Não foram detectadas bactérias do género *Pseudomonas* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* nas salmouras das azeitonas preparadas de acordo com o Processo B. O número de UFC de BAL detectadas no líquido fermentativo em qualquer dos dois processos foi inferior a 1 por mL.

3.1.4 Identificação de leveduras

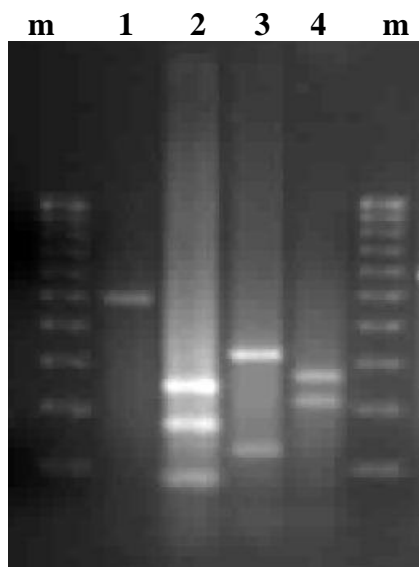
Tendo em conta que as leveduras se revelaram a população microbiana predominante ao longo das fermentações estudadas, tornou-se necessário proceder à sua identificação.

Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

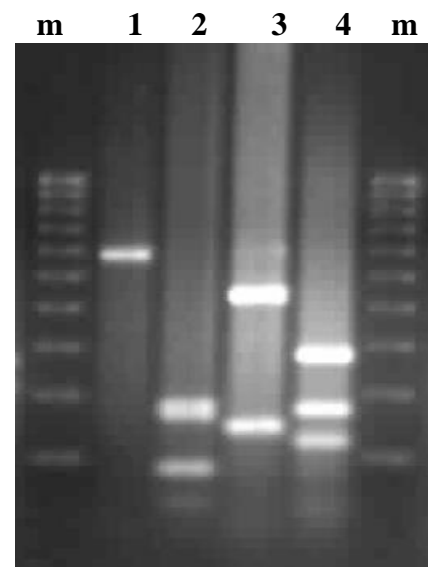
Das fermentações em estudo obtiveram-se 51 isolados de leveduras com base nas características morfológicas das suas colónias. Estes isolados foram identificadas por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP). A amplificação da região 5,8S rRNA-ITS permitiu obter bandas com tamanho compreendido entre 450 pb (*Pichia kluyveri*) e 630 pb (*Candida membranaefaciens*).

Das leveduras isoladas identificaram-se as espécies *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus carnescens*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii*.

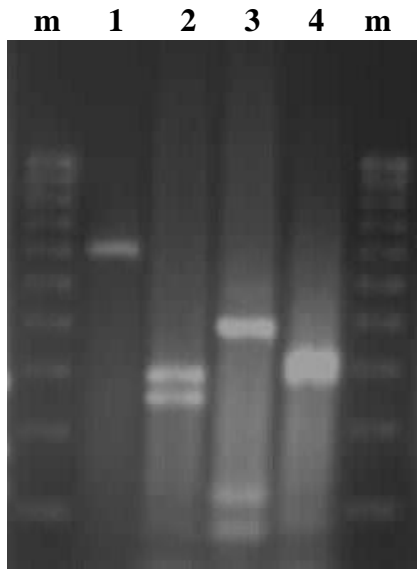
A Figura 3.3. mostra fotografias de géis de RFLP referentes aos perfis das leveduras identificadas (A, B, C, D, E), obtidas após a coloração com brometo de etídio (1,5 mg/L).



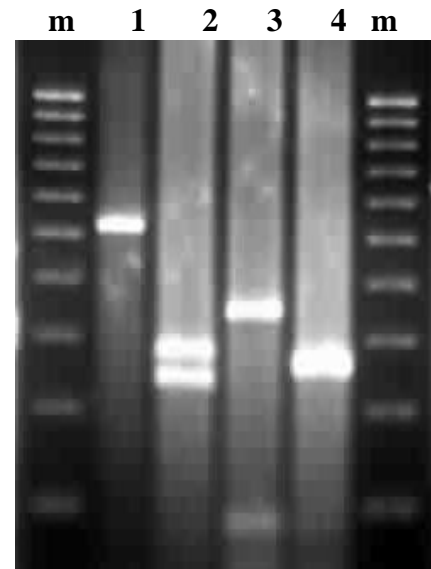
A)



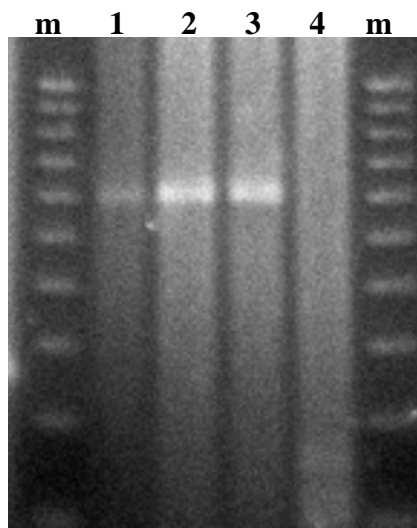
B)



C)



D)



E)

Figura 3.3. Tamanho em pb (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonuclease *CfoI* (2), *HaeIII* (3), e *HinfI* (4) das espécies/gêneros *Cryptococcus sp* (A), *Aureobasidium pullulans* (B), *Candida fermentati* (C), *Cryptococcus carnescens* (D) e *Sporobolomyces odoratus* (E). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 pb DNA ladder Biorad).

Sequenciação parcial do gene 26S rRNA

De cada grupo de leveduras identificadas por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição seleccionou-se cerca de 50 % dos isolados para analisar por sequenciação parcial de DNA e assim confirmar os resultados obtidos. A sequenciação de DNA foi também efectuada em alguns casos em que os perfis obtidos por RFLP foram duvidosos ou não se encontravam referidos na literatura.

A identificação de cada isolado está registada na Tabela XI onde é possível consultar o perfil de restrição e a frequência das leveduras encontradas nas duas fermentações a 25°C e a 18°C.

Tabela XI – Tamanho em pb (pares de bases) dos produtos de PCR e dos fragmentos resultantes da actividade de três endonucleases e frequência do número de espécies de leveduras isoladas nas fermentações (A-Amplificado).

Espécies isoladas	Perfil de restrição				Fermentações (número de isolados)			
	A	<i>CfoI</i> (<i>HaspAI</i>)	<i>HaeIII</i> (<i>bsurI</i>)	<i>HinfI</i>	F 25°C	F 18°C	Soma	(%)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	590	80+180+190	150+450	290+180+120	1	11	12	23,5
<i>Candida fermentati</i>	600	280+300	80+120+400	310+290	1	0	1	2,0
<i>Candida membranaefaciens</i>	650	300+300	80+150+450	320+320	13	9	22	43,1
<i>Cryptococcus carnescens</i>	550	250+290	80+100+350	280+290	1	4	5	9,8
<i>Cryptococcus sp.</i>	500	80+180+250	150+320	220+280	1	4	5	9,8
<i>Pichia guilliermondii</i>	620	300+280	120-400	300+310	0	2	2	3,9
<i>Pichia kluyveri</i>	450	70+70+100+180	80+380	200+250	2	0	2	3,9
<i>Sporobolomyces odoratus</i>	600	600	600	80+120+150+150	1	1	2	3,9
				Total	20	31	51	

Ao longo do período de fermentação observou-se uma sucessão dos diferentes grupos de leveduras identificadas onde uma espécie foi dominante num determinado período de tempo não tendo sido isolada nas fases posteriores, como se pode observar na Tabela XII. A espécie *Aureobasidium pullulans* foi isolada no início dos processos e não foi detectada a partir de 1/3 do processo. Também as espécies *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus sp.* e *Sporobolomyces odoratus* foram isoladas na fase inicial, não tendo sido isoladas posteriormente.

Os isolados pertencentes às espécies *Candida fermentati* e *Candida membranaefaciens*, foram identificados a partir do meio do processo e no caso da *Candida membranaefaciens* foi detectada até ao fim. As espécies *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii* foram isoladas na fase final da fermentação.

Tabela XII – Sucessão de leveduras ao longo do tempo de fermentação

	Início	Meio	Fim
<i>Aeureobasidium pullulans</i>	█		
<i>Candida membranaefaciens</i>		█	█
<i>Candida fermentati</i>		█	
<i>Cryptococcus carnescens</i>	█		
<i>Cryptococcus sp</i>	█		
<i>Pichia kluyveri</i>			█
<i>Pichia guilliermondii</i>			█
<i>Sporobolomyces odoratus</i>	█		

3.2 Parâmetros físico-químicos

O estudo da evolução da microbiota ao longo do tempo foi efectuado em simultâneo com a avaliação do pH, da concentração de açúcares e de compostos fenólicos no líquido fermentativo dos processos de produção de azeitona britada.

3.2.1 Fermentação realizada a 25 °C

pH do líquido fermentativo

As variações de pH ocorridas no líquido fermentativo da azeitona verde britada, apresentam-se na Figura 3.4 que se refere aos Processos A e B realizados a 25°C.

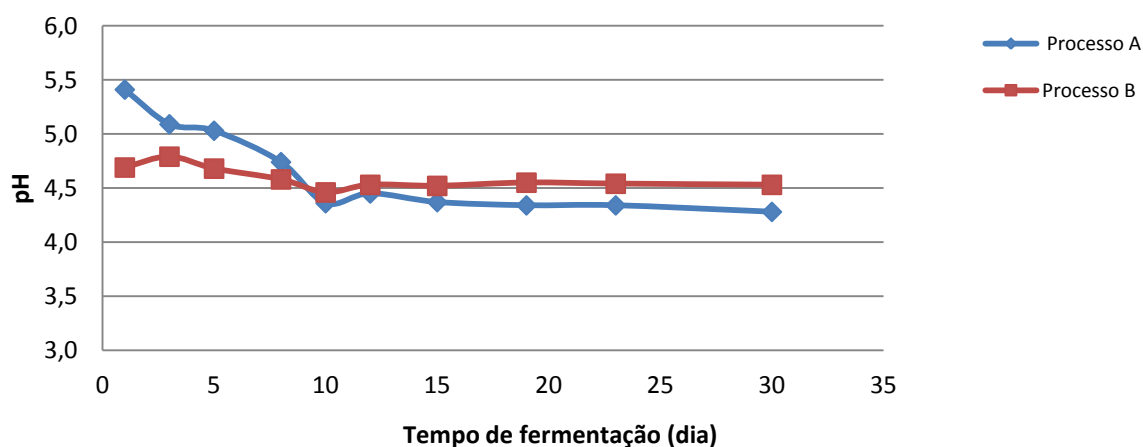


Figura 3.4. Evolução do valor de pH no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 25 °C.

No que diz respeito ao Processo A, observou-se uma diminuição dos valores de pH nos primeiros 10 dias de fermentação de 5,4 para 4,4, tendo-se atingido um valor de 4,2 no final do estudo.

No caso da salmoura da azeitona preparada de acordo com o Processo B, a fermentação iniciou com um valor de pH inferior ao da fermentação desenvolvida com o Processo A. O valor de pH diminuiu de 4,7 no início para 4,5 no final da fermentação.

Açúcares redutores no líquido fermentativo

Ao longo do período de fermentação foi registada a variação da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo da azeitona verde britada, submetida aos Processos A e B realizados a 25°C, como se apresenta na Figura 3.5.

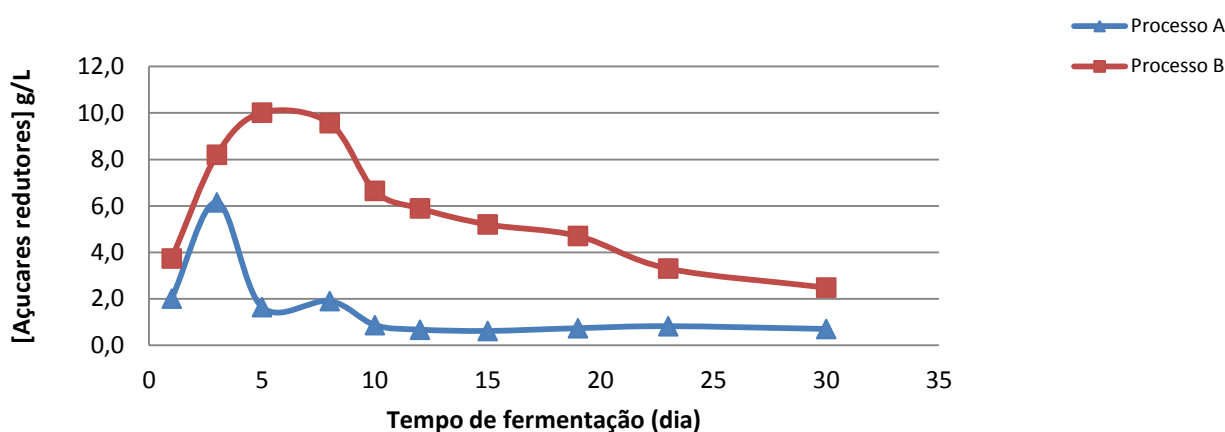


Figura 3.5. Evolução do valor da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 25 °C.

O gráfico da Figura 3.5. permite observar que no Processo A em que a azeitona sofreu um pré-tratamento com água, a concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo aumentou até ao dia 3 tendo atingido 6 g/L a partir do qual começou a diminuir até valores de 1,6 g/L. No Processo B, em que a azeitona foi imediatamente imersa em salmoura, a concentração de açúcares na salmoura subiu até 10 g/L nos primeiros 5 dias e começou a diminuir ao 8º dia verificando-se

essa tendência até ao final. Neste caso quando a fermentação terminou existiam 2,5 g de açúcares redutores por litro de salmoura.

Compostos fenólicos no líquido fermentativo

A variação na concentração de compostos fenólicos ocorridas no líquido fermentativo da azeitona verde britada submetidas aos Processos A e B realizados a 25°C apresenta-se na Figura 3.6.

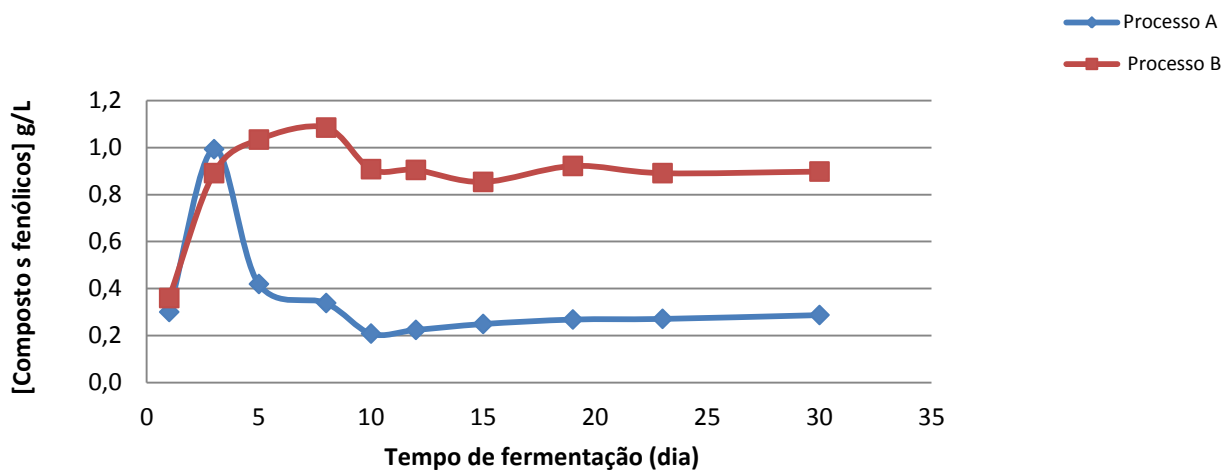


Figura 3.6. Evolução do valor da concentração de compostos fenólicos no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 25 °C.

O gráfico da Figura 3.6. revela que no líquido fermentativo da azeitona preparada de acordo com o Processo A, a concentração de compostos fenólicos aumentou até ao 3º dia de fermentação, atingindo 1 g/L. De seguida, verificou-se um decréscimo acentuado entre o 3º e o 5º dia, a partir do qual se manteve constante até ao final com valores de 0,2 g/L.

No que diz respeito ao Processo B a concentração de compostos fenólicos na salmoura aumentou até ao 8º dia de fermentação, 1,1 g/L, em seguida diminuiu ligeiramente para 0,8g/L e manteve-se constante até ao final.

Cor da superfície das azeitonas ao longo da fermentação a 25 °C

Os gráficos da Figura 3.7. representam a variação da cor da superfície das azeitonas expressa através da medição dos parâmetros L, luminosidade a, passagem da cor vermelha para verde, e b, passagem da cor amarela para azul, ocorridas ao longo da fermentação realizada a 25 °C de acordo com os Processos A e B.

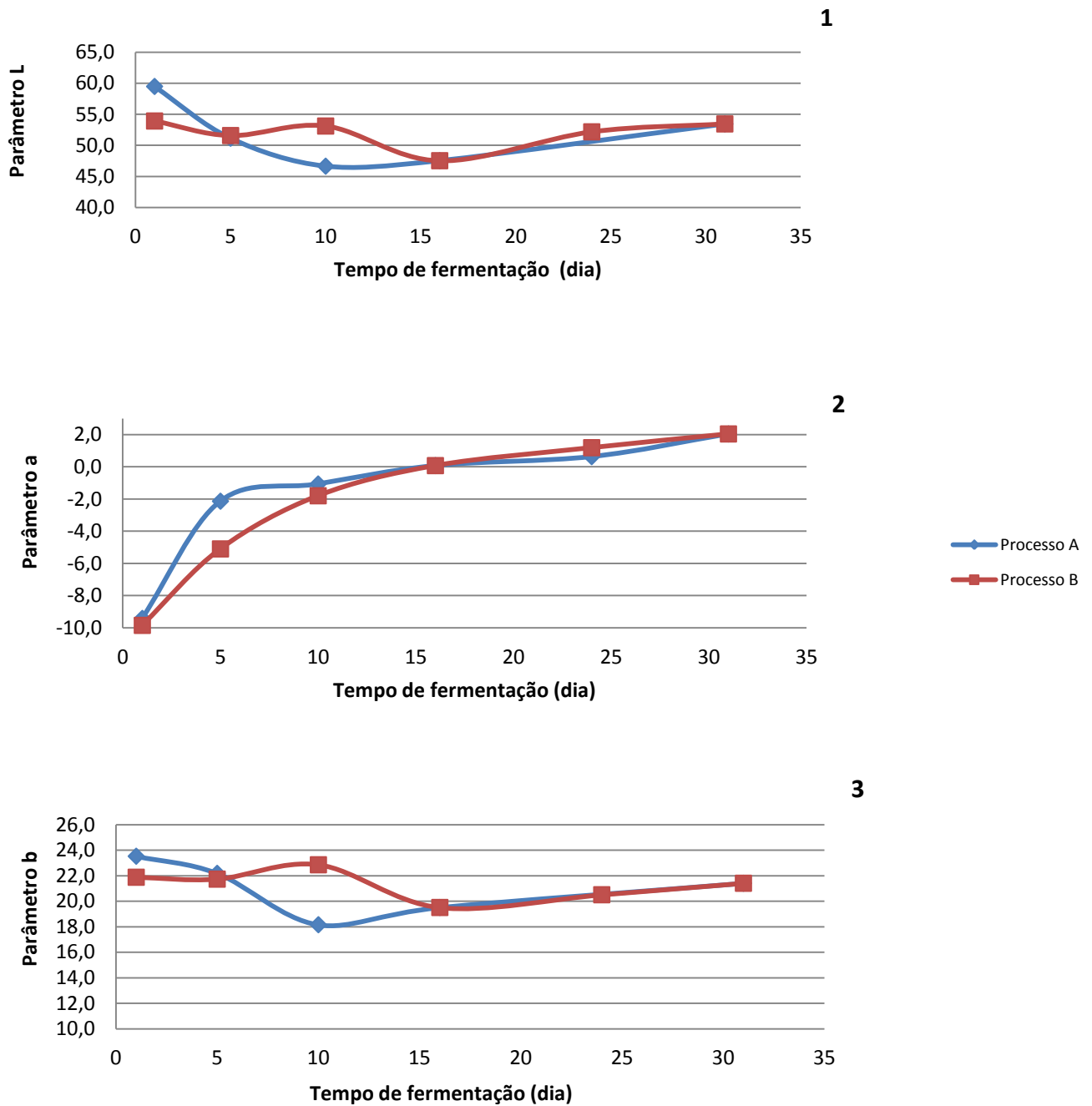


Figura 3.7. Evolução dos parâmetros de cor L, a e b na superfície das azeitonas ao longo da fermentação realizada a 25 °C segundo os Processos A e B.

É possível verificar através do gráfico 1 da Figura 3.7 que a luminosidade na superfície das azeitonas preparadas segundo o Processo A e o Processo B, sofre uma ligeira diminuição nos primeiros 8 a 10 dias e que de seguida se mantém constante ao longo da fermentação. Os valores variaram entre 59,5 e 52,1 nas azeitonas preparadas segundo o Processo A e entre 53,9 e 52,1 nas azeitonas preparadas segundo o Processo B.

Em relação ao parâmetro a, que reflecte a passagem da cor verde para vermelha, registado no gráfico 2 da figura, é possível observar que em ambos os processos de fermentação das azeitonas os valores aumentaram ao longo de toda a fermentação passando de -9,84 para 2,05.

O parâmetro b que mede a passagem da cor azul para a amarela, teve um comportamento muito semelhante nos dois processos de preparação da azeitona britada (gráfico 3). Verificaram-se variações muito pequenas ao longo do tempo passando os valores de 23,5 para 21,4 nas azeitonas preparadas segundo o Processo A e 21,9 para 21,4 nas azeitonas preparadas segundo o Processo B.

3.2.2 Fermentação realizada a 18 °C

pH no líquido fermentativo

As variações de pH ocorridas no líquido fermentativo da azeitona verde britada, encontram-se resumidas na Figura 3.8 que refere os Processos A e B realizados a 18°C.

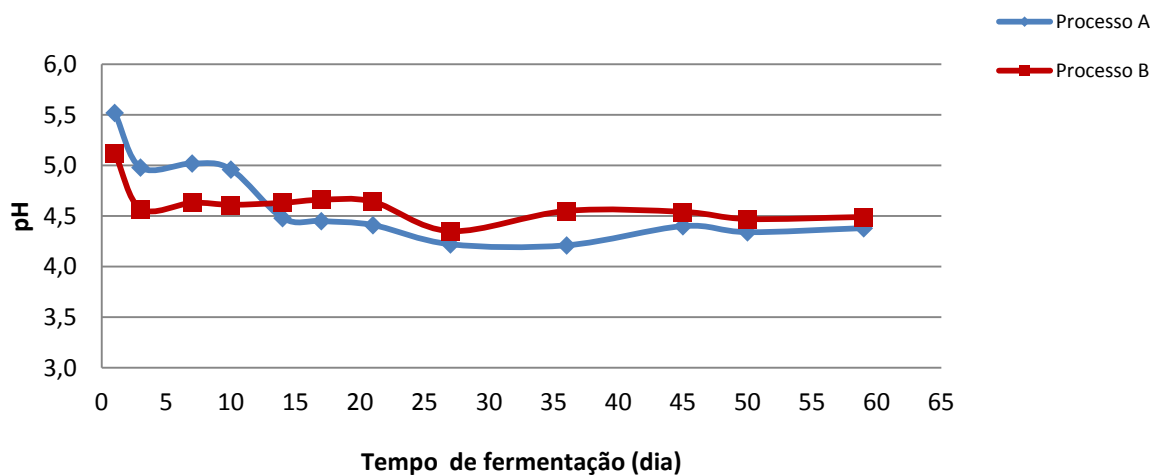


Figura 3.8. Evolução do valor de pH no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 18 °C.

Pela análise do gráfico e no que se refere ao Processo A, observa-se uma variação semelhante à que se verificou para o mesmo parâmetro na fermentação realizada a 25 °C onde ocorreu uma diminuição do pH ao longo do tempo de fermentação. Contudo a 18 °C esta variação ocorreu de uma forma menos acentuada. Os valores de pH baixaram de 5,5 para 4,2 ao longo dos primeiros 25 dias. A fermentação terminou com o valor de pH de 4,3.

No que diz respeito ao Processo B em que a azeitona foi imersa em salmoura após a britagem, o pH no início da fermentação era 5,1 ligeiramente mais baixo que o verificado para o Processo A 5,5. As variações em termos de pH foram pequenas passando de 5,1 no primeiro dia para 4,5 no final da fermentação.

Açúcares redutores no líquido fermentativo

Ao longo do período de fermentação foi registada a variação da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo da azeitona verde britada, submetida aos Processos A e B realizados a 18 °C, como se apresenta na Figura 3.9.

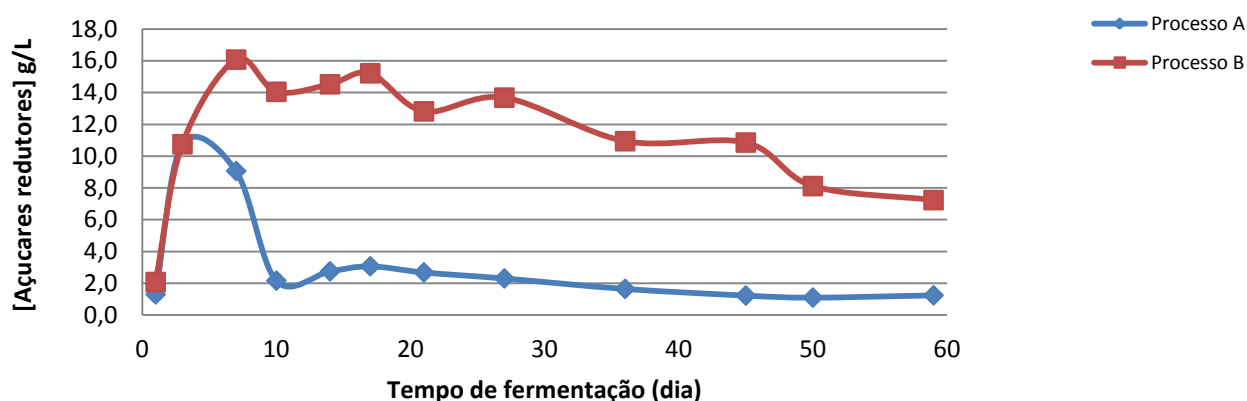


Figura 3.9. Evolução do valor da concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 18 °C.

Pode-se observar através do gráfico da Figura 3.9. que no Processo A em que a azeitona sofreu um pré-tratamento com água, a concentração de açúcares redutores no líquido fermentativo aumentou até ao 3º dia atingindo 11,0 g/L tendo-se observado uma diminuição deste parâmetro até ao 10º dia para 2,0 g/L após o qual se manteve constante.

No Processo B, em que a azeitona foi imediatamente imersa em salmoura, a concentração de açúcares na salmoura subiu até 16 g/L nos primeiros 7 dias. A partir daí verificou-se uma diminuição da concentração de açúcar menos acentuada, comparando com o processo A, verificando-se essa tendência até ao fim do processo em que a concentração de açúcares era de 2,5 g/L.

Compostos fenólicos no líquido fermentativo

A variação na concentração de compostos fenólicos ocorridas no líquido fermentativo da azeitona verde britada submetidas aos Processos A e B realizados a 18 °C encontra-se resumida na Figura 3.10.

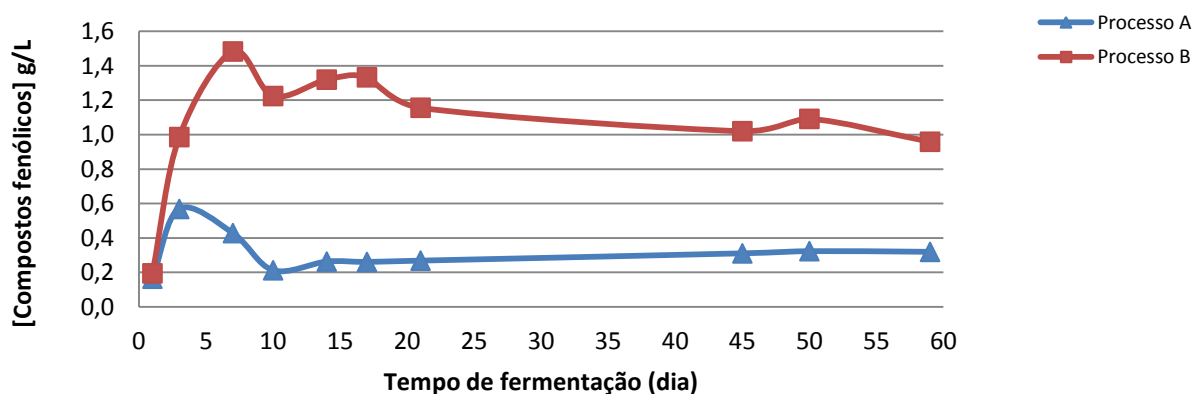


Figura 3.10. Evolução do valor da concentração de compostos fenólicos no líquido fermentativo da azeitona preparada segundo os Processos A e B das fermentações realizadas a 18 °C.

O gráfico da Figura 3.10. mostra que no líquido fermentativo da azeitona preparada de acordo com o Processo A, a concentração de compostos fenólicos aumentou de 0,2 para 0,6 g/L até ao 3º dia de fermentação. De seguida verificou-se uma diminuição para cerca de 0,2 g/L ao 10º dia de fermentação. Estes valores subiram ligeiramente para 0,3g de açúcares redutores por litro de líquido fermentativo analisado que se mantiveram constantes até ao final.

No que diz respeito ao Processo B a concentração de compostos fenólicos determinados na salmoura aumentou de 0,2 para 1,5 g/L até ao 7º dia de fermentação. Posteriormente verificou-se uma ligeira diminuição e os valores mantiveram-se constantes em 1,0 g/L até ao final do processo.

Cor da superfície das azeitonas ao longo da fermentação realizada a 18 °C

Os gráficos 1, 2 e 3 da Figura 3.11 representam respectivamente a variação da cor da superfície das azeitonas submetidas aos Processos A e B, conduzidos a 18 °C, expressa através da medição dos parâmetros L, luminosidade a, passagem da cor verde para vermelha, e b, passagem da cor amarela para azul.

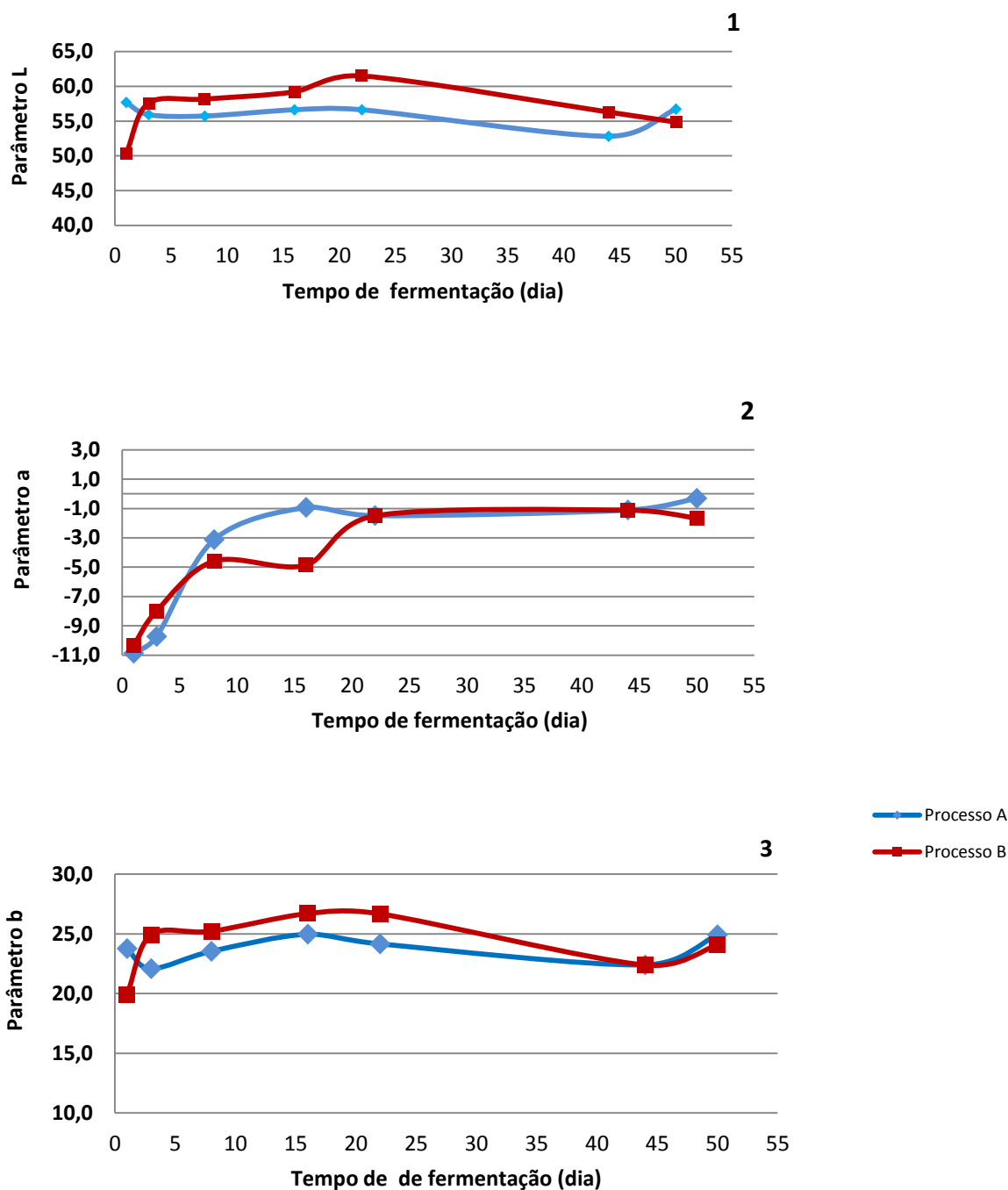


Figura 3.11. Evolução dos parâmetros de cor L, a e b na superfície das azeitonas ao longo da fermentação realizada a 18 °C segundo os Processos A e B.

O gráfico 1 da Figura 3.11. permite verificar que a luminosidade na superfície das azeitonas preparadas segundo o Processo B sofreu um ligeiro aumento de 50,2 para 57,5 nos primeiros 3 dias de fermentação. A partir do 22º dia os valores diminuíram ligeiramente tendo este parâmetro atingido o valor de 54,8 no final da fermentação. Em relação ao Processo A, as variações da luminosidade ocorridas ao longo do processo foram muito pequenas passando de 57,6 no início para 56,7 no final.

Em relação ao parâmetro a, que representa a passagem da cor verde para vermelha, registado no gráfico 2 da Figura, observa-se que em ambos os processos de preparação das azeitonas houve um aumento ao longo da fermentação passando de -10,8 para - 0,3 no processo A e de -10,3 para - 1,6 no processo B.

No que diz respeito ao parâmetro b que mede a passagem da cor azul para a amarela, verificou-se um comportamento muito semelhante nos dois Processos de preparação da azeitona britada (gráfico 3). Não se verificaram variações consideráveis ao longo do tempo, passando os valores de 19,9 para 24,0 no Processo B e 23,7 para 24,9 no Processo A.



DISCUSSÃO

4. Discussão

O presente trabalho teve como objectivo o estudo do processo de produção de azeitona verde britada à escala laboratorial, recorrendo a dois processos tradicionais utilizados no Algarve (Processo A e Processo B). O Processo A consistiu em britar a azeitona verde e submetê-la a um pré tratamento com água que foi substituída a cada dois dias ao longo de uma semana. Após esse período, a água foi substituída por salmoura, 8 % de NaCl (p/v) que se manteve até ao fim da fermentação. O Processo B consistiu em colocar a azeitona em salmoura 8 % de NaCl (p/v) imediatamente após a britagem e mantê-la desta forma até ao fim da fermentação. Os dois processos foram estudados a 25 °C e a 18 °C. A fermentação realizada a 25 °C decorreu ao longo de 30 dias e a realizada a 18 °C durante 60 dias. A microbiota presente e as características físico químicas na salmoura final das fermentações, encontram-se resumidas nas Tabelas XIII e XIV.

Tabela XIII – Microbiota presente no fruto e na salmoura final.

Salmoura (UFC/mL)	Microbiota Total	Leveduras	Fungos Filamentosos	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Bactérias ácido lácticas	
Fruto (UFC/g)	6,0x10 ³	1,4x10 ³	2,2x10 ²	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	
25 °C	A	1,2x10 ⁷	4,4x10 ⁶	2,4x10 ³	2,8x10 ³	5,1x10 ⁶	<1,0x10
	B	3,3x10 ⁶	1,1x10 ⁶	2,5x10 ⁴	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10
Fruto (UFC/g)	2,0x10 ⁴	3,2x10 ³	6,3x10 ³	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	
18 °C	A	3,3x10 ⁵	5,4x10 ⁴	2,5x10 ⁴	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10
	B	3,8x10 ⁵	3,0x10 ⁵	2,2x10 ⁴	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10

Na salmoura de azeitonas preparadas de acordo com os Processos A e B (25 °C), as leveduras foram a população com maior representatividade. No final dos dois Processos esta população era de cerca de 6 log UFC/mL.

A microbiota total a 30 °C no final do Processo A era de 7 log UFC/mL e no Processo B de 6log UFC/mL. De acordo com o Trade Standard Applying to Table olives, (IOOC, 2004), a

população de leveduras na salmoura final pode atingir valores até 10^9 UFC/mL, em fermentações naturais de azeitona. As contagens de leveduras realizadas na salmoura final nos dois Processos, está de acordo com valores referidos em outros estudos realizados em fermentações de azeitona como por exemplo, $6,5 \log$ UFC/mL (Arroyo López *et al.*, 2007), $5 \log$ UFC/mL (Hernández *et al.*, 2006) e 6 e $10 \log$ UFC/mL (Hurtado *et al.*, 2008).

As leveduras parecem ter sido a população microbiana responsável pelas transformações ocorridas na azeitona e na salmoura. A predominância desta população pode ser explicada pela sua tolerância aos compostos fenólicos e às concentrações de NaCl utilizadas (Arroyo-López *et al.*, 2009). Ao longo do seu metabolismo produzem compostos relacionados com propriedades organolépticas desejadas tais como álcoois, acetato de etilo, acetaldeído, ácidos orgânicos (cítrico, acético, succínico) entre outros (Hernandez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008a). Por outro lado, a actividade metabólica de algumas leveduras pode também resultar em deterioração das azeitonas tais como transbordo do líquido fermentativo dos contentores, turvação das salmouras, amolecimento e produção de cheiros e sabores desagradáveis (Hernandez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008a). A azeitona verde britada após a fermentação, constitui um produto com propriedades organolépticas características bastante apreciada pelo seu amargor residual. Contudo, as fermentações levadas a cabo por leveduras autóctones dão origem a produtos com qualidade pouco consistente. Como tal, o uso de culturas starters com características tecnológicas e bioquímicas conhecidas seria útil no sentido de se obter produtos de qualidade consistente minimizando os riscos relacionados com higiene e segurança alimentar.

No que diz respeito às bactérias do género *Pseudomonas* e da família *Enterobacteriaceae*, no Processo A, observou-se que continuaram presentes na fase final da fermentação. As lavagens removeram grande parte dos compostos hidrosolúveis da salmoura com capacidade antimicrobiana que juntamente com a temperatura da fermentação a $25\text{ }^\circ\text{C}$ promoveram o crescimento destes microrganismos. Nestes processos, as lavagens podem levar ao aumento do pH e diminuição da acidez uma vez que os ácidos em solução na salmoura são descartados. Por outro lado, contribuem para a diminuição do sabor amargo do fruto mais rapidamente o que leva a que a azeitona fique pronta a consumir num menor período de tempo comparativamente com processos em que a azeitona é colocada em salmoura e não se efectua lavagens (Processo B) (Arroyo-López *et al.*, 2007). Segundo as recomendações do Trade Standard Applying to Table olives (IOOC, 2004) estes microrganismos devem estar ausentes no produto final.

Nas salmouras das azeitonas produzidas de acordo com o Processo B, observou-se que a população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e do género *Pseudomonas* decresceu desde o início, não tendo sido isoladas colónias destes microrganismos a partir do 20º e do 30º dia respectivamente. Este tipo de crescimento, em que há um aumento inicial seguido de uma diminuição até ao desaparecimento da população, tem sido descrito em fermentações de azeitona (Chorianopoulos *et al.*, 2005; Arroyo-López *et al.*, 2007). Conseguiu-se com este Processo obter um produto final sem estes microrganismos que estão associados a defeitos na azeitona tais como o amolecimento do fruto ou a formação de bolhas de gás entre a polpa e a epiderme vulgarmente conhecido como “olho de peixe” (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são microrganismos indicadores de higiene na determinação de boas práticas de fabrico, logo pretende-se a sua ausência no final da fermentação.

Os fungos filamentosos estavam presentes na salmoura final dos dois processos o que pode ter sido promovido pela temperatura da fermentação e pela própria técnica de amostragem que levava a que de dois em dois dias se abrisse os recipientes de fermentação. A amostragem também levou à destruição do biofilme existente à superfície da salmoura e a sua inclusão no líquido fermentativo. Sabe-se que em fermentações de vegetais, quando as condições de anaerobiose são perturbadas, podem crescer fungos à superfície do recipiente de fermentação tais como *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes fungos podem provocar alterações de textura, sintetizar compostos fétidos e produzir micotoxinas (Hutkins, 2006).

As bactérias ácido lácticas não foram isoladas ao longo das duas fermentações e em ambos os Processos nas condições em que decorreu o estudo. Este facto não está em concordância com estudos realizados em Espanha e na Grécia em que as bactérias ácido lácticas são responsáveis pelos processos fermentativos (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Chammem *et al.*, 2005; Panagou *et al.*, 2006). Em geral, a população microbiana diminui gradualmente com o aumento da concentração de sal na salmoura. No entanto sabe-se que a concentração de NaCl utilizada na salmoura influencia o balanço entre as populações de leveduras e bactérias ácido lácticas. Salmouras com 4 a 6 % de NaCl favorecem a fermentação láctica enquanto que salmouras com concentrações mais elevadas de NaCl afectam o crescimento destes microrganismos e promovem o crescimento de leveduras resultando um produto final menos ácido de pH mais elevado. Concentrações de sal na salmoura de cerca de 8 %, podem induzir a inibição do crescimento de bactérias ácidas lácticas, independentemente da temperatura de fermentação (Tassou *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a concentração de NaCl utilizada e a quantidade de compostos fenólicos nas salmouras, poderá ter inibido o crescimento destes microrganismos.

Em fermentações naturais de azeitona verde, em que esta não é tratada com NaOH para retirar o amargo do fruto, as bactérias ácido lácticas são inibidas devido à presença de compostos fenólicos (Arroyo-López *et al.*, 2008b). Ruiz-Barba *et al.* (1990) estudaram os factores inibitórios da espécie *Lactobacillus plantarum* em azeitonas naturais que não sofreram tratamento alcalino tendo concluído que os compostos fenólicos apresentam um efeito bactericida em relação a este organismo, através de alterações na parede celular e na membrana plasmática. É também descrito por Medina *et al.*, (2008) que o ácido descarboximetil elenólico presente na azeitona verde da variedade Maçanilha, pode levar a um atraso ou mesmo a ausência de fermentação ácido láctica.

Tal como aconteceu na salmoura obtida nos dois processos de preparação de azeitona realizados a 25 °C, também a 18 °C as leveduras foram a microbiota predominante. Neste caso, a temperatura mais baixa, terá condicionado o crescimento microbiano tendo-se verificado o valor final da microbiota total a 30 °C 5log UFC/mL para os dois Processos em estudo, inferior ao observado no estudo realizado a 25 °C que foi de 7log UFC/mL para o Processo A e 6log UFC/mL para o Processo B. A microbiota total a 30 °C apresentava um valor muito semelhante ao observado para a população de leveduras o que sugere que estas constituíam uma fracção muito importante da microbiota envolvida no processo.

A fermentação a 18 °C originou salmouras livres de bactérias do género *Pseudomonas* e de bactérias da família *Enterobacteriaceae* nos dois Processos de (A e B). As bactérias ácido lácticas não foram isoladas ao longo da fermentação a 18 °C em ambos os Processos. A variação de temperatura de 25 °C para 18 °C parece não ter influenciado o crescimento dos fungos filamentosos tendo-se observado valores semelhantes nas duas situações.

As leveduras isoladas ao longo deste trabalho foram identificadas por PCR-RFLP e por sequenciação da região D1/D2 do gene 26s do rDNA. Dos 51 isolados obtidos, identificaram-se as espécies/géneros *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus carnescens*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii*.

Nos Processos A e B da fermentação realizada a 25 °C, isolaram-se *Aureobasidium pullulans*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus sp.*, *Pichia kluyveri* e *Sporobolomyces odoratus*. Nos Processos A e B da fermentação realizada a 18°C foram isoladas as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Candida membranaefaciens*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus sp.*, *Pichia guilliermondii* e *Sporobolomyces odoratus*.

As espécies *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus*, cujos perfis não se encontravam na bibliografia foram identificadas por sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rDNA. Em relação aos restantes 6 perfis ITS-RFLP obtidos, foi confirmada a sua identificação através da mesma técnica.

Na fase inicial da fermentação realizada a 25 °C foram identificados isolados pertencentes ao género *Cryptococcus* e às espécies *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus carnescens*, e *Sporobolomyces odoratus*. A meio da fermentação foram isoladas as espécies *Candida fermentati* e *Candida membranaefaciens*, tendo esta ultima se mantido até ao final. Na fase final da fermentação isolou-se ainda a espécie *Pichia kluyveri*.

No caso da fermentação realizada a 18 °C foram isoladas na fase inicial as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus*. A espécie *Candida membranaefaciens* foi isolada a partir do meio do processo tendo permanecido até ao final. Já na fase final da fermentação isolou-se ainda a espécie *Pichia guilliermondii*.

Verificou-se que leveduras isoladas com maior frequência nas duas fermentações estudadas foram *Candida membranaefaciens* (43,1%), *Aureobasidium pullulans* (23,5%) e *Cryptococcus carnescens*. As leveduras presentes no final da fermentação a 25 °C pertenciam às espécies *Candida membranaefaciens* e *Pichia kluyveri* enquanto que a 18 °C eram *Candida membranaefaciens* e *Pichia guilliermondii*.

O género *Aureobasidium* pertence à família *Dothioraceae*. A espécie *A. pullulans* não é fermentativa. Foi descrita em azeitonas verdes britadas da variedade Maçanilha preparada segundo processos industriais no Algarve (Alves *et al.*, 2010) e em azeitonas pretas da variedade Conservolea produzida de acordo com o processo Grego (Nisiotou *et al.*, 2009). Este microrganismo produz um pigmento negro (melanina). No início as colónias são amarelas tornando-se negras ao fim de 6-8 dias devido à produção de clamidósporos. É uma levedura típica da microbiota do solo, principalmente marinho, água, ambientes salinos, vegetais e é saprófito em

folhas e madeira. É utilizada em diferentes processos devido à sua capacidade para produzir o composto pululano e enzimas extra celulares tais como lipases, proteases, esterases e hemicelulases. O pululano é um polissacarídeo solúvel em água de grande importância económica muito utilizado na indústria alimentar, farmacêutica, agrícola e química. Este composto origina uma solução de alta viscosidade em baixas concentrações e pode ser usado na impermeabilização ao oxigénio em filmes e fibras, como espessantes ou colas resistentes a gorduras usadas sobretudo na indústria alimentar (Sing *et al.*, 2008; Deshpande *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2008).

Aureobasidium pullulans é um dos microrganismos mais utilizados no biocontrolo de enfermidades pós-colheita em frutos e vegetais e apresenta actividade antagonista em relação ao fungo filamentosos *Botrytis cinerea* em morangos, maçãs e uvas. Algumas espécies de *Aureobasidium pullulans* foram consideradas capazes de controlar o crescimento de microrganismos não desejáveis (Lima *et al.*, 1997).

Cryptococcus sp., *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus*, são grupos pertencentes ao Filo Basidiomycota. Incluem leveduras normalmente associadas à microbiota existente em plantas, solos e meios aquáticos caracterizando-se por formar colónias rosa, salmão, laranja ou brancas (Fell *et al.*, 2001). *Cryptococcus* sp foram isolados em azeitonas correspondendo a 50 % da microbiota total sugerindo a sua presença como um contaminante natural deste fruto (Hernández *et al.*, 2006). Os isolados do género *Cryptococcus* e das espécies *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus*, foram isoladas na fase inicial das fermentações em estudo. Estas leveduras foram substituídas por leveduras fermentativas nas fases mais avançadas da fermentação.

Candida membranaefaciens pertence ao género *Candida* e ao Filo Ascomycota. É uma levedura típica da microbiota do solo principalmente marinho, água e ambientes salinos, com grande interesse económico por produzir grandes quantidades de riboflavina (vitamina A). Esta vitamina possui inúmeras aplicações fisiológicas no homem e em outros animais (Lin *et al.*, 2008). Foi a levedura com maior representatividade nos Processos A e B das fermentações em estudo. Anteriormente foi identificada em azeitona de mesa da variedade Arberquina na fase final do processo de fermentação (Hurtado *et al.*, 2008).

Pichia kluyveri e *Pichia guilliermondii* pertencem ao Filo Ascomycota. São leveduras características da microbiota do solo, insectos, vegetais e bebidas. *Pichia guilliermondii* caracteriza-se por ser uma levedura capaz de crescer em meio de cultura selectivo suplementado com cicloheximida (1000 ppm) e está associada à produção de compostos

voláteis em fermentações (Sangorrin *et al.*, 2007). Possui a enzima β glucosidase, demonstra elevada capacidade de degradação de lipídios através de esterases e fraca capacidade pectinolítica (Aponte *et al.*, 2010). As características tecnológicas destes microrganismos são um contributo importante em fermentações naturais onde o fruto é colocado em salmoura sem tratamento prévio com solução de NaOH. As β -glucosidases e esterases catalisam a ruptura das ligações glicosídicas e éster das moléculas de oleuropeína. É referida como estirpe killer isolada em azeitona verde de mesa, com elevada capacidade de acção contra leveduras responsáveis por causar deterioração (Hernández *et al.*, 2008).

Pichia kluyveri foi referida como a levedura com maior representatividade em processos tradicionais de preparação de azeitona de mesa, em que ocorrem fermentações naturais e onde o fruto é colocado em salmoura sem tratamento prévio com solução de NaOH (Oliveira *et al.*, 2004; Aponte *et al.*, 2010). É uma espécie muito estudada pelo seu fenótipo killer, produtora de toxinas (Oliveira *et al.*, 2004; Sangorrin *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2008;).

Pichia guilliermondii e *Pichia kluyveri*, foram descritas como a microbiota predominante em fermentação de azeitonas verdes de diferentes variedades incluindo a Maçanilha de acordo com o método Siciliano e em azeitonas pretas da variedade Conservolea produzida de acordo com método Grego. A actividade desta população parece ter sido responsável pela produção das propriedades sensoriais típicas da azeitona verde de mesa produzida naquela região (Aponte *et al.*, 2010). Estas espécies foram isoladas no presente trabalho na fase final da fermentação.

De acordo com o Codex Alimentarius (66/1981) e a NP 3034 (1987) o pH final das azeitonas naturais fermentadas deve ser igual ou inferior a 4,5. De acordo com as recomendações do Standard Applying to Table olives, (IOOC, 2004) este parâmetro não deve ser superior a 4,3. Os valores de pH obtidos para o Processo A das duas fermentações foram igual ou inferior ao limite máximo permitido, (Tabela XIV). Por outro lado, o Processo B originou salmouras com um valor de pH ligeiramente mais elevado, o que sugere que pode não ser suficientemente baixo para inibir a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* (Nout e Rombouts, 1992). A acidificação deste produto com ácidos orgânicos, pode ser uma solução para contornar este problema.

Tabela XIV – Composição química na salmoura final.

		pH	Açúcares redutores (g/L)	Compostos fenólicos (g/L)
25 °C	A	4,28	0,69	0,28
	B	4,53	2,47	0,88
18 °C	A	4,38	1,23	0,32
	B	4,49	7,22	0,95

A concentração final de açúcares redutores e de compostos fenólicos na salmoura do Processo A foi de 0,69 g/L e de 0,28 g/L respectivamente. A salmoura final referente ao Processo B continha 2,47 g/L de açúcares redutores e 0,88 g/L de compostos fenólicos para os processos desenvolvidos a 25 °C. No que diz respeito aos processos conduzidos a 18 °C, para o processo A a concentração final de açúcares redutores e de compostos fenólicos na salmoura era de 1,23 g/L e de 0,32 g/L. Para o Processo B os valores finais de açúcares redutores e de compostos fenólicos na salmoura foi de 7,22g/L e 0,95 g/L respectivamente.

A evolução da concentração de compostos fenólicos na salmoura apresentou um comportamento semelhante relativamente ao observado no que diz respeito à concentração de açúcares redutores. Em ambos os Processos, durante os primeiros dias de fermentação verificou-se um aumento nesses valores resultante da difusão dos nutrientes para a salmoura facilitada pelo processo da britagem que expõe os tecidos do fruto. Contudo, os valores atingidos no Processo B foram superiores aos verificados para o Processo A. De seguida, para o Processo A verifica-se um decréscimo acentuado na concentração destes compostos na salmoura resultado da fase das lavagens com água. A partir deste ponto os valores referentes à concentração de compostos fenólicos mantêm-se constantes até ao final e os referentes à concentração de açúcares redutores continua a descer até ao final.

Para o Processo B a concentração de compostos fenólicos sofre uma ligeira diminuição seguida de uma estabilização até ao final. Já no que diz respeito à concentração de açúcares redutores verifica-se uma diminuição até ao fim do processo resultado do seu consumo por parte dos microrganismos

Os dois processos de preparação de azeitona de mesa (Processo A e Processo B), afectaram o produto final no que diz respeito ao pH, à concentração de compostos fenólicos à sobrevivência

das bactérias da família *Enterobacteriaceae* nas salmouras bem como as características organoléticas da azeitona.

No Processo A, as lavagens com água removeram do líquido fermentativo os ácidos produzidos pelos microrganismos e os compostos fenólicos libertados pela azeitona. Estas condições resultaram no crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* a 25 °C. A presença destas bactérias representa um risco de deterioração do produto. Contudo, observou-se que a remoção dos compostos fenólicos pelas lavagens, levou a que o amargo da azeitona desaparecesse mais rapidamente e as azeitonas preparadas nestas condições adquiriram as características organoléticas desejadas mais cedo.

As azeitonas preparadas de acordo com o Processo B, que são colocadas directamente em salmoura, precisam de mais tempo para atingir as características organoléticas desejadas mas por outro lado o risco de deterioração por bactérias da família *Enterobacteriaceae* é menor.

A 25 °C as azeitonas preparadas de acordo com os Processo A e B necessitaram de menos tempo de fermentação para adquirir as propriedades sensoriais típicas mas é necessário que após a fermentação, o produto seja armazenado a temperatura de refrigeração de forma a prevenir a possível deterioração resultante da continuação do processo fermentativo.

Os resultados obtidos nos processos realizados à temperatura de 25 °C sugerem que a difusão dos nutrientes da azeitona para a salmoura é favorecida, influenciando o tipo e quantidade de microbiota presente. Esta temperatura é bastante comum em Agosto e Setembro quando se inicia a produção tradicional de azeitona verde britada. Como tal, é necessário, neste período que os produtores controlem o tempo fermentação de modo a evitar a deterioração da azeitona e conseguir produtos de qualidade.

De forma a obter azeitona verde de mesa de qualidade consistente tem que se ter especial atenção às condições iniciais da salmoura e à fase da fermentação.

No que diz respeito ao desenvolvimento da cor das azeitonas ao longo dos Processo de fermentação A e B realizados a 25 °C, verificou-se uma diminuição inicial do valor do parâmetro que avalia a luminosidade \underline{L} , e no parâmetro \underline{b} que avalia a passagem da cor amarela para azul

(Tabela XV). Contudo, no Processo B a diminuição do parâmetro \underline{b} foi quase nula. Isto indica-nos que a cor das azeitonas torna-se ligeiramente mais escura.

O parâmetro \underline{a} variou da mesma forma para as azeitonas preparadas de acordo com os dois Processos realizados às duas temperaturas, da região negativa (valor inicial -9,84) que corresponde à cor verde atingindo valores positivos (2,75), e entrando no domínio da cor vermelha. Este

comportamento está relacionado com a perda da cor verde e com o aparecimento de pigmentos castanhos. A troca de magnésio por hidrogénio na molécula de clorofila resulta na perda da cor verde, devido à produção de feofitinas que são castanhas (Martins e Silva, 2002; Gandul-Rojas *et al.*, 2004).

Tabela XV – Variação da cor das azeitonas ao longo das fermentações

		L		a		b	
		inicial	final	inicial	final	inicial	final
25 °C	A	59,5	52,1	-9,84	2,75	23,5	21,4
	B	53,9	52,1	-9,84	2,75	21,9	21,4
18 °C	A	57,6	56,7	-10,87	-0,31	23,7	24,9
	B	50,2	54,8	-10,33	-1,66	19,9	24,0

Sugestões de trabalho futuro

Estes resultados contribuem para se conhecer melhor o processo de obtenção de azeitona verde britada, um produto tradicional fermentado muito apreciado. Contudo, outros estudos se sugerem tais como avaliação da natureza dos compostos fenólicos presentes na azeitona de mesa e a sua interferência na dinâmica da microbiota existente. A determinação de propriedades tecnológicas das leveduras isoladas neste processo é também importante no sentido de se seleccionarem espécies que possam ser utilizadas como culturas starters.

5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que as condições iniciais da salmoura afectam o valor de pH, a concentração de compostos fenólicos e a evolução dos microrganismos em especial das bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp.

O Processo B em que as azeitonas foram directamente colocadas em salmoura após a britagem, para as duas temperaturas em estudo, originou um produto final com um valor de pH ligeiramente acima do recomendado mas com um conteúdo em compostos fenólicos mais elevado e sem bactérias da família *Enterobacteriaceae* o que sugere que este processo é mais indicado para a produção de azeitona britada. No Processo A em que as azeitonas foram submetidas a um pré tratamento de lavagens com água, no estudo a 25 °C detectaram-se bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp. até ao final. Já no estudo efectuado à temperatura de 18 °C estes dois grupos de microrganismos deixaram de ser detectados a meio do processo não estando presente no final da fermentação.

As leveduras foram a população microbiana com maior representatividade nas fermentações naturais estudadas neste trabalho. Foi possível identificar todas as espécies isoladas ao longo do tempo através de PCR-RFLP e por sequenciação da região D1/D2 do gene 26S do rRNA. A combinação destes dois métodos revelou-se adequada na identificação das leveduras associadas ao processo de fermentação natural de azeitonas verdes do Algarve.

As espécies *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus carnescens*, *Candida fermentati*, *Candida membranaefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii* foram identificadas neste trabalho. *Cryptococcus carnescens* e *Sporobolomyces odoratus* foram isolados pela primeira vez em ambientes associados à produção de azeitona de mesa. *Candida membranaefaciens* foi a levedura predominante em ambos os Processos A e B realizados a 18 °C e a 25 °C, tendo permanecido até ao final das fermentações.

Os resultados obtidos sugerem que à temperatura de 25 °C se obtém um produto pronto a consumir com as características desejadas, num espaço de tempo mais curto mas com uma qualidade que não o permite conservar por muito tempo quando comparado com o produto obtido à temperatura de 18 °C que precisa de um maior período de tempo para atingir as características desejadas mas a sua qualidade permite que se conserve por períodos de tempo mais longos.

A produção de azeitona recorrendo a operações de pré-lavagens com água (Processo A) conduz a produtos finais com um risco superior de degradação devido á presença de bactérias da família *Enterobacteriaceae* principalmente quando conduzidas à temperatura de 25 °C.

A adição de culturas starters de microrganismos de propriedades tecnológicas conhecidas pode ser útil, nestes processos tradicionais permitindo aos produtores um controlo do desenvolvimento da fermentação.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- Allouche, Y., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, P., Gaforio, J.J., and Beltrán, G. (2009) *Triterpenic Content and Chemometric Analysis of Virgin Olive Oils from Forty Olive Cultivars*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3604-3610.
- Alves, M.C., Gonçalves, T., and Quintas, C. (2012) *Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives*. *Food Control* 23, 363-368.
- Andrikopoulos, N. (2010) *Estudios in vivo sobre actividad antioxidante y anticancerígena de las aceitunas de mesa*. III Congreso Internacional de la Aceituna de mesa. Fundación para el Fomento y Promoción de la Aceituna de Mesa. Sanlúcar la Mayor.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, M.C., and Moshetti, G. (2010) *Study of green Sicilian table olive fermentation through microbiological, chemical and sensory analyses*. *Food Microbiology* 27, 163-170.
- Arroyo-López, F. N., Duran-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., and Garrido-Fernandez, A. (2006) *Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives*. *Food Microbiology* 23, 791-796.
- Arroyo-López, F. N., Duran-Quintana, M. C., Romero, C., Rodriguez-Gomez, F., and Garrido-Fernandez, A. (2007) *Effect of storage process on the sugars, polyphenols, color and microbiological changes in cracked Manzanilla-Alorena table olives*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7434-7444.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Duran-Quintana, M. C., Rodriguez-Gómez, F., Romero-Barranco, C., and Garrido-Fernández, A. (2008a) *Improvement of the storage process for cracked table olives*. *Journal of Food Engineering* 89, 479-487.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernandez, A. (2008b) *Role of yeasts in table olive production*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189-196.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Segóvia-Bravo, K. A., Garcia-Garcia, P., Duran-Quintana, M. C., Romero, C., Rodriguez-Gómez, F., and Garrido-Fernández, A. (2009) *Instability profile of fresh packed "seasoned" Manzanilla-Alorena table olives*. *Lwt-Food Science and Technology* 42, 1629-1639.
- Barnet, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. (1990) *Yeasts: Characteristics and identification*. Second edition. University Press, Cambridge
- Boskou, G., Salta, N. F., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., and Andrikopoulos, N.K. (2004) *Antioxidante capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market*. *Food Chemistry* 94, 558-564.
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A. H., and Garrido, A. (1995) *Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish Style green olive processing*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2702-2706.

- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M. R., Altieri, C., and Sinigaglia, M. (2005) *Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles*. Food Technology and Biotechnology 43, 289-294.
- Castro, A., Garcia, P., Romero, C., Brenes, and M. Garrido, (2007) *A.Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions*. Journal of Food Engineering 80, 1206-1212.
- Chammem, N., Kachouri, M., Mejri, M., Peres, C., Boudabous, A., and Hamdi, M. (2005) *Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process*. Bioresource Technology 96, 1311-1316.
- Cocolin, L., and Ercolini, D. (2008) *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*, Springer, New York.
- Codex Alimentarius 66-1981, *Codex Standard for table olives*.
- Chorianopoulos, N. G., Boziaris, I. S., Stamatiou, A., and Nychas, G. J. E. (2005) *Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels*. Food Microbiology 22, 117-124.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galleti, P., and Zappia, V. (2001) *Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil*. Drug Metabolism and Disposition 29, 1492-1498.
- Deacon, J. W. (2006). Fungal biology. Blackwell Publishing, England.
- De la Torre, J. E., Moya, E. R., Bota, E., and Sancho, J. (1993) *Physical chemical and microbiological studies of the fermentation of Arbequina green olives*. Grasas y Aceites 44, 44-46.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., and Lynch, J. M. (1992) *Aureobasium pullulans in applied microbiology- A status report*. Enzyme and Microbial Technology 14, 514-527.
- Durán Quintana, M.C., García García, P., and Garrido Fernández, A., (1986) *Fermentación en medio aeróbico de aceitunas negras maduras en salmuera con inyección alternante de aire*. Grasas y Aceites 37, 242-249.
- Eskin, K., Robinson, D. (2001) *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. CRC Press, New York.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999) *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 329-337.
- Fell, J.W. Boekhout, T., Fonseca, A., and Sampaio J.P. 2001 Basidiomycetous yeasts. The mycota VII. Systematics and Evolutions. Part B. (McLaughling, E. G. and Lemke, P.A., eds.). Springer-Verlag, Berlin.

- Ferreira, N., Belloch, C., Querol, A., Manzanares, P., Vallez, S., and Santos, A. (2009) *Yeast Microflora Isolated From Brazilian Cassava Roots: Taxonomical Classification Based on Molecular Identification*. *Current Microbiology* 4, 287-293.
- Gandul-Rojas, B., Roca, M., and Mínguez-Mosquera, M. (2004) *Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (Olea europaea) cv. Hojiblanca*. *Journal of Plant Physiology* 161, 499-507.
- Garcia, P. G., Quintana, M. C. D., and Fernández, A. G. (1986) *Packing of naturally black olives fermented in an aerobic medium*. *Grasas y Aceites* 37, 92-96.
- Garcia, P., Brenes, M., and Garrido, A. (1992) *Rapid indirect method for determining the sodium content of table olives*. *Analyst* 117, 173-176.
- Garrido, A., Garcia, P., and Brenes, P. (1995) *Olive fermentations*. Biotechnology, Weinheim, Germany.
- Garrido-Fernández, A., Fernandez Díez, M.J., and Adams, M.R. (1997) *Table olive. Production and Processing*. Chapman & Hall, London.
- González Cancho, F., (1966) *Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes estilo español*. *Revista de Ciencia Aplicada* 108, 24-31.
- González Cancho, F., Nosti Vega, M., Durán Quintana, M.C., Garrido fernández, A., and Fernández Díez, M.I. (1975) *El proceso fermentativo de las aceitunas negras maduras en salmuera*. *Grasas y Aceites* 26, 297-309.
- Guillamón, J., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A. (1998) *Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. *Archives of Microbiology* 169, 387-392.
- Hernández, A., Martin, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F., and Cordoba, M. G. (2006) *Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives*. *Food Microbiology* 24, 346-351.
- Hernández, A., Martin, A., Cordoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., and Perez-Nevado, F. (2007) *Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives*. *International Journal of Food Microbiology* 121, 178-88.
- Huang, Y. C., Chang, Y. H., and Shao, Y. Y. (2006) *Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan*. *Food Chemistry* 98, 529-538.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., and Rozes, N. (2008) *Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives*. *Food Research International* 41, 738-744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozes, N. (2009) *Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives*. *Food Microbiology* 26, 827-833.

- Hutkins, R. W. (2006) *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, London.
- IOOC (International Olive Oil Council) (2004) *Trade Standard applying to table olives*. IOOC editions. Madrid.
- Kailis, S., Harris, D. (2007) *Producing table olives*. Landlinks Press. Collingwood
- Kouraba, K., Ribes, G., Blanco, R., Revuelta, J., and Barranco, N. (2004) *Suitability of olive varieties for mechanical harvester shaking*. *Olivae* 101, 39-43.
- Kountouri, A.M., Kaliora, Andriana, C., Lemonica, K., and Andrikopoulos, N.K. (2009) *In-vitro gastric cancer prevention by a polyphenol-rich extract from olives through induction of apoptosis*. *European Journal of Cancer Prevention* 18, 33-39.
- Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. (1998) *Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Llanos-Frutos R, MT Fernandez-Espinar and A Querol. (2004) *Identification of species of the genus Candida by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85 (3), 175-185.
- Lin, W., Zhenming, C., Lixi, Y., Zhe, C., and Dechao, Z. (2008) *Occurrence and Diversity of Candida Genus in Marine Environments*. *Oceanic and Coastal Sea Research* 4, 416-420.
- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F., and Salerno, M. (1997) *Effectiveness of Aureobasidium pullulans and Candida oleophila against postharvest strawberry rots*. *Postharvest Biology and Technology* 10, 169-178.
- Liu, Z. Q., Chi, Z. M., Wang, L., and Li, J. (2008) *Production, purification and characterization of an extracellular lipase from Aureobasidium pullulans HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils*. *Biochemical Engineering Journal* 40, 445-451.
- Mafra, I., Barros, A. S., and Coimbra, M. A. (2007) *The combined effects of black oxidising table olive process and ripening on the cell wall polysaccharides of olive pulp*. *Carbohydrate Polymers* 68, 647-657.
- Maldonado, M. B., Zuritz, C. A., and Assof, M. V. (2008) *Diffusion of glucose and sodium chloride in green olives during curing as affected by lye treatment*. *Journal of Food Engineering* 84, 224-230.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., and Spencer Martins, I. (1992) *Characterization of the yeasts populations in olive brines*. *Letters in Applied Microbiology* 14, 279-283.
- Marsilio, V., Campestre, C., and Lanza, B. (2001) *Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing*. *Food Chemistry* 74, 55-60.

- Marsilio, V., Russi, F., Lannucci, E., and Sabatini, N. (2008) *Effects of alkali neutralization with CO₂ on fermentation, chemical parameters and sensory characteristics in Spanish-style green olives (Olea europaea L.)*. Lwt-Food Science and Technology 41, 796-802.
- Martin, A.R., and Maurice, M.O., (2008) Food Microbiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Martins, R. C., and Silva, C. L. M. (2002) *Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (Phaseolus vulgaris, L.)*. International Journal of Refrigeration-Revue Internationale Du Froid 25, 966-974.
- Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M., and Garcia, A. (2008) *Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety*. Food Chemistry 110, 932-937.
- Medina, E., Garcia, A., Romero, C., Castro, A., and Brenes, M. (2009) *Study of anti-lactic acid bacteria compounds in table olives*. International Journal of Food Science & Technology 44, 1286-1291.
- Montaño, A., Decastro, A., Rejano, L., and Sanchez, A. H. (1992) *Analysis of zapatera olives by and high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography 594, 259-267.
- Mrak, E.M., Vaughn, R.H., Millar, M.W., Phaff, H.J. (1956) *Yeasts occurring in brines during the fermentation and storage of green olives*. Food Technology 10, 416-419.
- Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., and Panagou, E.Z. (2009) *Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions*. Journal of Applied Microbiology 108, 396-405.
- Nout, M., Rombouts, F. (1992) *Fermentation preservation of plant foods*. Journal of Applied Bacteriology. Symp. 37 (suppl.): 1365-1375.
- NP 3034:1987 (1ª Edição) Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação.
- NP 4405: (2002) Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias 30 °C.
- NP 3277-2: (1987) Regras gerais para a contagem de bolores e leveduras.
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., and Tassou, C. C. (2002) *Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine*. Letters in Applied Microbiology 34, 173-177.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., and Peres, C. (2004) *Biotechnology of olive fermentation of "Galega" Portuguese variety*. Grasas y Aceites 55, 219-226.
- Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, C. Z. (2006) *Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method*. Food Microbiology 23, 199-204.

- Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C., and Nychas, G. J. E. (2008) *Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria*. Food Microbiology 25, 348-358.
- Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., and Estevinho, L.M. (2008) *Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects*. Food and Chemical Toxicology 46, 2895-2902.
- Querol, A., and Fleet, G., (2006) *Yeasts in food and beverages*. Springer-Verlag, Berlin.
- Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., and Caggia, C. (2004) *Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives*. International Journal of Food Microbiology 90, 9-14.
- Ray, B. (2001) *Fundamental Food Microbiology*, CRS Press, Washington.
- Robinson, R. (1988) *Developments in Food Microbiology*, Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., Lopez-Lopez, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2010) *Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing*. Food Microbiology 27, 604-612.
- Ruiz-Barba, J. L. (1990) *Bactericidal Effect of Phenolic Compounds from Green Olives on Lactobacillus Plantarum*. Systematic and Applied Microbiology 13, 60-62.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. (2002) *Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA*. Microbiological Research 157, 267-274.
- Sabatini, N., and Marsilio, V. (2008) *Volatile compounds in table olives (Olea Europea L., Nocellara del Belice cultivar)* Food Chemistry 107, 1522-1528.
- Saija, A., and Ucella, N. (2001) *Olive biophenols: functional effects on human wellbeing*. Food Science and Technology 11, 357-363.
- Sánchez, A. H., de Castro, A., Rejano, L., and Montañó, A. (2000) *Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, 5975-5980.
- Sangorrin, P.M., Lopes, A. C., Jofré, V., Querol, A., and Caballero, C. A. (2008) *Spoilage yeasts from Patagonian cellars: Characterization and potential biocontrol based on killer interactions*. 24, 945-953.
- Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2002) *The viral killer system in yeast: from molecular biology to application*. FEMS Microbiology 26, 257-276.

- Segóvia Bravo, K. A., Arroyo Lopez, F. N., Garcia Garcia, P., Duran Quintana, M. C., and Garrido Fernández, A. (2007) *Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on their polyphenol content and on Lactobacillus pentosus and Saccharomyces cerevisiae growth.* International Journal of Food Microbiology 114, 60-68.
- Segóvia-Bravo, K. A., Jaren-Galan, M., Garcia-Garcia, P., and Garrido-Fernandez, A. (2008) *Characterization of Polyphenoloxidase from the Manzanilla Cultivar (Olea europaea pomiformis) and Prevention of Browning Reactions in Bruised Olive Fruits.* Proceedings of the 2008 Joint Central European Congress 1, 259-270.
- Segóvia-Bravo, K. A., Jaren-Galan, M., Garcia-Garcia, P., and Garrido-Fernandez, A. (2009) *Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved.* Food Chemistry 114, 1380-1385.
- Segovia Bravo, K., Jarén-Galán, M., García-García, P., and Garrido-Fernández, A. (2010) *Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts.* Food Chemistry 123, 741-746.
- Singh, R. S., Saini, G. K., and Kennedy, J. F. (2008) *Pullulan: Microbial sources, production and applications.* Carbohydrate Polymers 73, 515-531.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C., and Wichers, H.J. (2000) *Oleuropein and related compounds.* Journal of Food and Agriculture 80, 1013-1023.
- Spencer, J.F.T., Spencer, A.L.R., (2001) *Food Microbiology Protocols*, Humana Press Inc, New Jersey.
- Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., and Nychas, G. J. E. (2001) *Survival of Escherichia 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, 3-11.
- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and 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, 605-615.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Majo, D., Giammanco, S., and Guardia, M. (2005) *The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health.* Nutrition Research Reviews 18, 98-112.
- Turantas, F., Gonsurgur, Y., Dincer, A.H., Unlucturk, A., Guvenç, U., and Zorlu, N., (1999) *Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives.* Journal of Science of Food and Agriculture 79, 1197-1202.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322 eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wood, B. J. B., ed. (1998) *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1. Blackie Academic & Professional, Glasgow.