



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Contribuição para o estudo de produção de azeitona de mesa da
cultivar Cobrançosa: Caracterização microbiológica*

Tânia Isabel da Palma Mateus

Trabalho Final de Mestrado em Tecnologia dos Alimentos

2015



UA Ig

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Contribuição para o estudo de produção de azeitona de mesa da
cultivar Cobrançosa: Caraterização microbiológica*

Tânia Isabel da Palma Mateus

Trabalho apresentado ao Instituto Superior de Engenharia para obtenção do
Grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas

Professora Doutora Paula Maria Carrasquinho Pires Cabral

2015

*Contribuição para o estudo de produção de azeitona de mesa da
cultivar Cobrançosa: Caracterização microbiológica*

Declaração de autoria de trabalho

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

Tânia Isabel da Palma Mateus

© Tânia Isabel da Palma Mateus

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

Agradecimentos

A realização desta tese não seria possível sem o apoio de todos. Por isso queria deixar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram, cada um da sua forma, especialidade ou competência, para a realização da mesma.

Em primeiro lugar quero agradecer à professora Doutora Célia Quintas pela, orientação, disponibilidade, simpatia, paciência, carinho, apoio e por todos os conhecimentos técnico-científicos transmitidos ao longo deste trabalho.

À professora, Doutora Paula Cabral por todo o apoio, disponibilidade, compreensão e esclarecimentos técnico-científicos prestados.

A todas as pessoas presentes nos laboratórios de Microbiologia, Química e Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Alimentar pela colaboração, simpatia e boa disposição, proporcionando um agradável ambiente de trabalho, assim como uma boa integração. Agradeço, de forma especial às técnicas Sílvia Madeira, Eng^a Clarisse Ramalho e Eng^a Neusa Rodrigues.

Um especial agradecimento ao David Santo por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, ajuda, paciência e boa disposição.

Às minhas colegas Cíntia Saúde, Jéssica Prata e Tânia Barros pela ajuda, motivação e boa disposição.

Ao senhor Hélder Madeira pelo fornecimento das azeitonas utilizadas neste estudo.

Aos meus pais, irmão, sobrinho e madrinha por todo orgulho e força que demonstraram ao longo deste percurso, sem eles nada disto seria possível.

A todos os meus amigos, em especial à Cláudia Dias, Vanessa Ladeira, Vera Alves e Gonçalo Oliveira que de uma forma ou de outra, sempre me apoiaram.

Muito Obrigada !!!

Resumo

A produção de azeitona de mesa inteira retalhada da cultivar Cobrançosa e de azeitona de mesa inteira britada da cultivar Maçanilha Algarvia resulta em produtos com características organolépticas distintas mas com um teor de sal elevado. O objetivo do presente trabalho foi estudar o processamento da azeitona retalhada verde e mista e o efeito de diferentes combinações de sais na fermentação e qualidade microbiológica das azeitonas retalhadas (NaCl e KCl) e britadas (NaCl, KCl e CaCl₂). As fermentações foram monitorizadas através da avaliação de parâmetros microbiológicos (microrganismos mesófilos, fungos, bactérias ácido lácticas e enterobactérias) e, no final do processo fermentativo, avaliaram-se os parâmetros de segurança alimentar na azeitona. As amostras foram analisadas de acordo com as metodologias "standard" e utilizando o meio Chromocult para coliformes e *Escherichia coli*. As leveduras foram identificadas por análise de restrição da região ITS 5,8S rDNA e por sequenciação da região D1-D2 do gene do rRNA 26S. No final dos processos fermentativos não foram detetadas enterobactérias, como *E. coli* e *Salmonella* sp., nem *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As leveduras predominantes na azeitona Cobrançosa foram: *Zygorulasporea mrakii*, *Candida molendinolei*, *Candida diddensiae* e *Citeromyces matritensis*. No caso da azeitona Maçanilha as principais leveduras identificadas no final da fermentação foram *Candida boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Priceomyces carsonii* e *Z. mrakii*. A presença de outros sais na salmoura, para além do sódio, conduziu à produção de azeitonas de mesa de excelente qualidade microbiológica. De acordo com os regulamentos da Comissão Europeia (2073/2005, 1441/2007) as azeitonas produzidas satisfazem os critérios de higiene e segurança alimentar.

Palavras-chave: Azeitona de mesa, Cultivar Cobrançosa, Cultivar Maçanilha Algarvia, parâmetros de segurança alimentar, leveduras.

Abstract

The traditional preparation of split olives of the Cobrançosa cultivar and green olives of the Maçanilha Algarvia cultivar, originate food products with excellent organoleptic properties but with high salt concentration. The objective of this work was to study the producing process of split green and turning color olives and the effect of different salt combinations in the fermenting brines on the microbiological quality of split (NaCl, KCl) and cracked (NaCl, KCl, CaCl₂) table olives. During the fermentation period, the mesophilic microbiota, fungi, lactic-acid bacteria and enterobacteria were monitored. At the end of fermentation, the safety microbial parameters were evaluated. Samples were analysed according to standard methodologies and using Chromocult Agar (coliforms and *Escherichia coli*). The yeasts obtained were identified by restriction analysis of the ITS-5.8S rDNA-region and 26S rDNA partial sequencing. At the end of all the fermentations, enterobacteria, including *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* were not. The main yeasts identified at the end of the Cobrançosa fermentations were *Zygorhizula mrakii*, *Candida molendinolei*, *Candida diddensiae*, and *Citeromyces matritensis*. In the case of Maçanilha olives, the predominant yeasts were *Candida boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Priceomyces carsonii* and *Z. mrakii*. The presence of salts in the brine, other than sodium, led to the production of table olives with excellent microbiological quality. According to the regulations of the European Commission (2073/2005, 1441/2007) the olives produced meet the criteria of food hygiene and safety.

Keywords: Table olives, Cobrançosa cultivar, Maçanilha Algarvia cultivar, safety microbial parameters, yeasts.

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. Dieta Mediterrânea e a Azeitona	3
1.2. Azeitona	5
1.2.1. Azeitonas de mesa: Definição	6
1.2.2. Classificação das azeitonas de mesa	6
1.3. Métodos de produção de azeitona de mesa	8
1.3.1. Produção de azeitona de mesa - Fermentação natural	10
1.4. Microrganismos na fermentação	13
1.4.1. Segurança e qualidade das azeitonas de mesa.....	17
1.5. Redução do teor de cloreto de sódio	18
1.6. Objetivos	20
2. Materiais e Métodos.....	22
2.1. Metodologia de produção de azeitona de mesa	22
2.1.1. Azeitona Cobrançosa retalhada	22
2.1.2. Azeitona Maçanilha bridada	23
2.2. Amostragem.....	23
2.3. Parâmetros microbiológicos	24
2.3.1. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.....	24
2.3.2. Contagem de leveduras	24
2.3.3. Contagem de fungos filamentosos.....	25

2.3.4. Contagem de bactérias ácido lácticas	25
2.3.5. Contagem de enterobactérias e <i>Escherichia coli</i>	25
2.3.6. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3.7. Contagem de bactérias do género <i>Pseudomonas</i> sp.	25
2.3.8. Contagem de microrganismos psicrotróficos.....	25
2.3.9. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	26
2.3.10. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.4. Identificação de leveduras	27
2.4.1. Isolamento de leveduras.....	27
2.4.2. Extração de DNA	28
2.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
2.4.4. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)	30
2.4.5. Sequenciação parcial do gene do rRNA 26S	31
2.6. Modelização	32
2.7. Análise Sensorial.....	32
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Azeitona Cobrançosa.....	34
3.1.1. Variação da população microbiana nas diferentes fermentações.....	34
3.1.2. Qualidade e segurança microbiológica	37
3.1.3. Identificação de leveduras.....	38
3.2. Azeitona Maçanilha Algarvia	46
3.2.1. Variação da população microbiana nas diferentes fermentações.....	46
3.2.2. Qualidade e segurança microbiológica	49
3.2.3. Identificação de leveduras.....	50
4. Conclusão.....	57
4.1. Perspetivas futuras	59
5. Referências Bibliográficas.....	61

Anexos	71
Anexo I - The effect of reduction in the microbiological quality of craked green table olives of the maçanilha algarvia cultivar	71

Índice de Figuras

1.1.	Evolução da produção de azeitonas de mesa em Portugal e Espanha nos últimos 10 anos.	2
1.2.	Pirâmide da dieta mediterrânica (para população adulta).....	4
1.3.	Diferentes estados de maturação das azeitonas, verdes (A), mistas (B) e pretas (C).	7
1.4.	Fluxograma de produção da azeitona Cobrançosa verde/mista retalhada.	11
1.5.	Fluxograma de produção da azeitona Maçanilha verde britada.....	12
2.1.	A) Azeitona Cobrançosa; B) Azeitona Maçanilha.	22
2.2.	A) Recolha da amostra de salmoura; B) Recolha da amostra de azeitona..	24
3.1.1.	Crescimento das populações de leveduras (○) e microrganismos mesófilos (●) ao longo das fermentações da azeitona Cobrançosa	35
3.1.2.	<i>Aureobasidium pullulans</i> (Grupo I). A1) Aspeto macroscópico das colónias. A2) Aspeto microscópico das colónias (x 1000). A3) Perfil de RFLP.	38
3.1.3.	Exemplos de perfis de RFLP. A) <i>Candida adriatica</i> (Grupo II); B) <i>Candida molendinolei</i> (Grupo VI).....	40
3.2.1.	Crescimento das populações de leveduras (○) e enterobactérias (●) ao longo da fermentação das azeitona verde Maçanilha Algarvia nas cinco salmouras com diferentes combinações de cloretos.	47

Índice de Tabelas

1.1.	Espécies de leveduras encontradas em azeitona de mesa, produzidas por fermentação natural.	15
2.1.	Preparação das diferentes fermentações de azeitona da cultivar Cobrançosa. ...	23
2.2.	Concentrações das diferentes salmouras.....	23
2.3.	Plano de amostragem da azeitona de mesa retalhada.	23
2.4.	Plano de amostragem da azeitona de mesa britada.	23
2.5.	Número de isolados das diferentes fermentações, ao longo do processo fermentativo da azeitona Cobrançosa.....	27
2.6.	Mistura para PCR (Mix) (Região 5,85-ITS).....	29
2.7.	Condições da amplificação da PCR.	30
2.8.	Reações de restrição.	30
2.9.	Mistura para PCR (Mix) (rRNA 26S).	301
3.1.1.	Taxa específica de crescimento (\pm desvio padrão) obtida pelo ajuste dos dados de crescimento de leveduras e mesófilos com modelo de Baranyi.....	36
3.1.2.	Resultados dos parâmetros de higiene e segurança microbiológica (Log UFC/g) nas azeitonas da cultivar Cobrançosa.	37
3.1.3.	Grupos/perfis de RFLP obtidos a partir da restrição da região ITS-5,8S e identificação correspondente após a comparação das sequências de DNA dos isolados com as presentes no GenBank (NCBI).	39
3.1.4.	Espécies identificadas na fermentação A (Azeitona verde - 8% NaCl), ao longo do processo fermentativo.	42
3.1.5.	Espécies identificadas na fermentação B (Azeitona mista - 8% NaCl) ao longo do processo fermentativo.....	43
3.1.6.	Espécies identificadas na fermentação C (Azeitona mista - 4% NaCl + 4% KCl), ao longo do processo fermentativo.....	44
3.2.1.	Parâmetros cinéticos (\pm desvio padrão) obtidos pelo ajuste dos dados de sobrevivência de enterobactérias ao modelo Baranyi.....	48
3.2.2.	Resultados dos parâmetros de higiene e segurança microbiológica (Log UFC/g) nas azeitona da cultivar Maçanilha.....	50
3.2.3.	Grupos/perfis de RFLP obtidos a partir da restrição da região ITS-5,8S rDNA de 100 isolados de leveduras e identificação correspondente após comparação das sequências de DNA dos isolados com as presentes no GenBank (NCBI).....	51

3.2.4. Espécies de leveduras identificadas nas azeitonas de mesa de cultivar Maçanilha Algarvia, produzidas em salmouras com diferentes combinações de sais.	52
--	----

Lista de Abreviaturas

APT	Água peptonada tamponada
ATCC	"American Type Culture Collection"
BAL	Bactérias ácido lácticas
BLAST	"Basic Local Alignment Sequence Tool"
BP	"Baird Parker"
BSA	"Brilliance <i>Salmonella</i> Agar"
CBS	"Centraalbureau voor Schimmelcultures"
DBVPG	"Industrial Yeast Collection"
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F1	Fermentador 1 (Azeitona verde – Maçanilha – 8,0 % NaCl)
F2	Fermentador 2 (Azeitona verde – Maçanilha – 4,0 % NaCl + 4,0 % KCl)
F3	Fermentador 3 (Azeitona verde – Maçanilha – 4,0 % NaCl + 4,0 % CaCl ₂)
F4	Fermentador 4 (Azeitona verde – Maçanilha – 4,0 % KCl + 4,0 % CaCl ₂)
F5	Fermentador 5 (Azeitona verde – Maçanilha – 2,7 % NaCl + 2,7 % KCl + 2,7 % CaCl ₂)
FA	Fermentador A (Azeitona verde – Cobrançosa – 8 % NaCl)
FB	Fermentador B (Azeitona mista – Cobrançosa – 8 % NaCl)
FC	Fermentador C (Azeitona mista – Cobrançosa – 4 % NaCl + 4 % KCl)
ITS	"Internal Transcribed Spacer"
MEA	"Malt Extract Agar"
MRS	"Man Rugosa and Sharpe"
ND	Não detetado
NI	Número de isolados
NRRL	"Agricultural Research Culture Collection"
p	Porção
pb	Pares de Bases
p/v	Percentagem em massa/volume
PCA	"Plate Count Agar"
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction")
RB	"Rose Bengal Chloramphenicol Agar" (Rosa de Bengala)
RFLP	Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphisms")

RV	"Rapapport-Vassiliadis"
TSA	"Tryptic Soy Agar"
VRBD	"Violet Red Bile Dextrose"
XLD	"Xylose Lysine Deoxycholate"
YM	"Yeast Malt Agar"
ZIM	"Collection of Industrial Microorganisms"

Introdução



1. Introdução

O setor da olivicultura, tem um papel importante em Portugal estendendo-se por aproximadamente 351000 hectares de olival, dos quais 97,5 % são destinados à produção de azeite e apenas 2,5 % à produção de azeitona de mesa (INE, 2014). Estão descritas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) com aptidões distintas, sendo algumas utilizadas para a produção de azeitona de mesa (a) e outras para a produção de azeite (b). Existem ainda algumas com dupla aptidão (c). As variedades mais comuns cultivadas em Portugal são: a) Galega, Gordal, Negrinha e Azeiteira; b) Madural, Verdeal Transmontana e Picual; c) Cobrançosa, Carrasquenha, Redondil, Conserva, Maçanilha, Maçanilha Algarvia, Cordovil de Serpa e de Castelo Branco, Verdeal de Serpa e Bical de Castelo Branco (Nogueira, 2012).

O azeite e a azeitona de mesa têm um papel importante no padrão alimentar da Dieta Mediterrânica, a qual está associada à redução de algumas doenças cardiovasculares e crónicas (Charoenprasert & Mitchell, 2012; Hutkins, 2006).

Na região mediterrânica a azeitona de mesa pode constituir um alimento, um aperitivo ou apenas um ornamento. No passado, foi o alimento principal de muitas refeições incluindo o pequeno-almoço.

Segundo os dados disponíveis do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2014), Portugal é o quarto maior produtor da União Europeia, depois de Espanha (maior produtor mundial), Grécia e Itália. A produção média anual em Portugal, nos últimos 10 anos, rondou cerca de 12000 toneladas de azeitonas de mesa (Figura 1.1), em contrapartida em Espanha a produção média anual ascende a 500000 toneladas por ano.

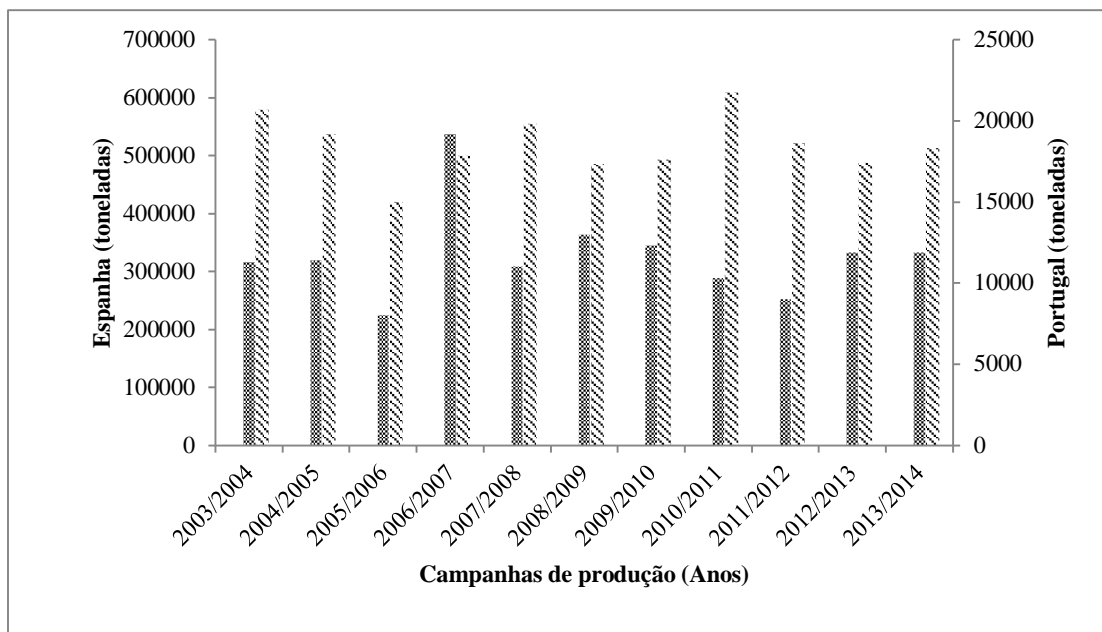


Figura 1.1. Evolução da produção de azeitonas de mesa em Portugal e Espanha nos últimos 10 anos. ■ Espanha ■ Portugal (COI, 2014).

1.1. Dieta Mediterrânea e a Azeitona

O termo "Dieta Mediterrânea" inclui um padrão alimentar à base de alimentos de origem vegetal (cereais, frutos, legumes, nozes, sementes, azeitonas, azeite), descrito pela primeira vez em 1960, com base na observação dos hábitos alimentares de algumas populações da região do Mediterrâneo. Vários estudos científicos têm demonstrado que o padrão alimentar incluído na Dieta Mediterrânea, está associado a uma diminuição nas taxas de incidência de hipertensão, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, alguns tipos de cancro, doenças neuro-degenerativas e a uma redução na prevalência de fenótipos de risco (Bach-Faig *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2010; Huang & Sumpio, 2008; López-Miranda *et al.*, 2010; Panagiotakos *et al.*, 2006; Tuck & Hayball, 2002).

O padrão alimentar mediterrânico pode ser representado sob a forma de uma pirâmide (Figura 1.2), encontrando-se na base os alimentos que devem ser consumidos mais frequentemente e no topo os alimentos a ingerir raramente ou ocasionalmente. A pirâmide fornece indicações sobre a frequência com que se devem ingerir os diferentes alimentos (diária, semanal e mensal) (Bach-Faig *et al.*, 2011; Panagiotakos *et al.*, 2006). A expressão "Dieta mediterrânea" inclui vários conceitos fundamentais para um estilo de vida saudável, tais como a prática regular de atividade física moderada, descanso adequado, convivência e a utilização de alimentos sazonais, frescos e minimamente processados e ainda um estado de hidratação adequado (Bach-Faig *et al.*, 2011).

A cada refeição principal é recomendado o consumo de 1-2 porções (p) de cereais de preferência integrais, o consumo de 2 p de hortícolas no mínimo, crus ou cozinhados e com texturas e cores variadas, a ingestão de 1-2 p de fruta fresca com texturas e cores diferentes. O azeite está no centro da pirâmide, sendo a principal fonte de gordura utilizada quer para o tempero quer para a confeção. A utilização de ervas aromáticas, especiarias, cebola ou alho traduz uma excelente forma de introduzir diversidade de aromas e sabores aos alimentos, contribuindo para a redução da adição de sal (Bach-Faig *et al.*, 2011).

Diariamente é recomendado o consumo de 1-2 p de frutos oleaginosos, sementes ou azeitonas. Em relação aos laticínios é aconselhado o consumo de 2 p, sendo preferidos os iogurtes e os queijos e outros produtos fermentados (Bach-Faig *et al.*, 2011).



Figura 1.2. Pirâmide da dieta mediterrânea (para população adulta) (Bach-Faig *et al.*, 2011).

Semanalmente é sugerida a ingestão mínima de 2 p de pescado e de leguminosas secas, 2 p de carnes magras, 2-4 p de ovos e no máximo, 2 p de carnes vermelhas e 1p de carnes processadas. O consumo de doces não deve ultrapassar 2 p por semana (Bach-Faig *et al.*, 2011; Panagiotakos *et al.*, 2006).

A maioria dos alimentos consumidos no padrão alimentar mediterrânico também está presente noutros modelos alimentares saudáveis. No entanto, o que difere de todas as outras dietas saudáveis é que, a principal fonte lipídica é o azeite, que constitui a gordura utilizada em culinária na região do Mediterrâneo. O azeite tem sido proposto como o fator chave associado aos benefícios na saúde da Dieta Mediterrânica, uma vez que este tem um teor elevado de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) (ácido oleico) e um baixo teor de ácidos gordos saturados (Huang & Sumpio 2008; López-Miranda *et al.*, 2010).

As azeitonas de mesa são também uma fonte de lípidos saudáveis, para além de possuírem vitaminas (vitamina E), fibras, proteínas, minerais, ácidos triterpénicos e compostos fenólicos, incluindo os antioxidantes. O teor de compostos fenólicos tem um papel importante na prevenção de doenças crónicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e cancro, entre outras (Andrikopoulos, 2010; Bach-Faig *et al.*, 2011; Brenes, 2010; Medina *et al.*, 2012; Muñoz, 2010).

Estudos realizados por Andrikopoulos & Boskou (2010) mostram que é possível eliminar até 50 % dos efeitos negativos do consumo de alimentos processados por fritura

(numa porção de 150 g de batatas fritas), pelo consumo de 20 azeitonas (ou 10 azeitonas em combinação com outras fontes de antioxidantes). Também foi demonstrado que o consumo diário aproximado de 10 a 12 azeitonas de mesa, permite uma ingestão de cerca de 40-45 mg por dia de compostos fenólicos.

O consumo regular de azeitonas fornece as necessidades energéticas adequadas, tem benefícios nutricionais e é um dos alimentos que contribui para as propriedades saudáveis da Dieta Mediterrânica (Muñoz, 2010). Contudo, um dos aspetos negativos das azeitonas é a presença, em muitos casos, de NaCl em elevada quantidade e o sal é um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de hipertensão em muitos indivíduos.

1.2. Azeitona

A azeitona apresenta a estrutura básica de uma drupa, constituída por três partes, o epicarpo (pele), o mesocarpo (polpa) que constitui cerca de 70 a 80 % do fruto e o endocarpo (caroço). As azeitonas apresentam um tamanho de 2 a 3 cm e pesam entre 1,5 a 12 g, porém possuem certas diferenças na sua morfologia e composição que as distinguem de outras drupas, visto que contêm um menor teor em açúcar e um maior teor em óleo. Na composição destes frutos podem ocorrer pequenas oscilações, que dependem essencialmente da variedade, condições culturais e do estado de maturação do fruto (Bianchi, 2003; Charoenprasert & Mitchell, 2012; Hammami, 2011).

A colheita das azeitonas acontece a partir de Setembro até ao início do Inverno, e o estado de maturação varia de acordo com a cultivar e com as características desejadas para o produto final (Galanakis, 2011; Ghanbari *et al.* 2012). A azeitona pode apresentar colorações distintas, dependendo do estado de maturação que variam desde o verde ao negro-púrpura (Cabezas, 2011; Pinheiro *et al.*, 2005).

Portugal possui cultivares próprias que se distinguem geneticamente das cultivares espanholas. Entre as cultivares portuguesas destacam-se a Carrasquenha, a Cobrançosa, a Cordovil de Castelo Branco, a Cordovil de Serpa, a Galega, a Maçanilha Algarvia e a Redondal (IOC. Sd; Lopes *et al.*, 2004)

A cultivar **Cobrançosa** é produzida fundamentalmente nas regiões de Trás-os-Montes e do Alentejo, para a produção de azeite. O seu fruto tem um tamanho médio, elipsoidal, com o diâmetro máximo na parte mediana, apresenta uma forma apical

pontiaguda ou arredondada, a sua cavidade peduncular é pequena e tem uma profundidade média. O seu epicarpo é avermelhado, aquando da viragem de cor, e vermelho escuro ou negro quando os frutos estão maduros. O mesocarpo é de consistência rija e aderente ao endocarpo que é grande, alongado ou elipsoidal e de forma apical pontiaguda. Esta cultivar possui um bom rendimento em azeite (Bartolini et al., 2005; Leitão *et al.*, 1986). Recentemente tem sido utilizada na produção de azeitona de mesa.

A cultivar **Maçanilha Algarvia** ou **Maçanilha de Tavira** é cultivada no Algarve e distingue-se geneticamente da Maçanilha cultivada no Alentejo ou da cultivar Manzanilla espanhola (Lopes *et al.*, 2004). Inicialmente, foi utilizada como azeitona de mesa e posteriormente, observou-se que apresentava boas características para a produção de azeite. O fruto da cultivar Maçanilha apresenta um tamanho médio, esferoidal e forma apical com ligeira depressão, possui uma cavidade peduncular ampla e medianamente profunda. Contém um epicarpo avermelhado, aquando de viragem de cor, e negro quando os frutos estão maduros. O seu mesocarpo é de consistência branda e não se mostrando aderente ao endocarpo. A variedade recebe esta designação devido à forma do seu fruto que se assemelha a uma pequena maçã (Leitão *et al.*, 1986).

1.2.1. Azeitonas de mesa: Definição

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004) e a norma NP 3034 (2012), as azeitonas de mesa podem definir-se como: “Preparado a partir de frutos sãos, das variedades cultivadas da oliveira (*Olea europaea* L.) que são escolhidas para a produção de azeitonas cujo volume, forma, relação polpa/caroço, características da polpa, gosto, firmeza e facilidade de desprendimento do caroço as tornam particularmente adequadas para o processamento. Os frutos são tratados para remover o seu amargor e preservados por fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem adição de conservantes. As azeitonas de mesa podem ser embaladas com ou sem líquido de cobertura”.

1.2.2. Classificação das azeitonas de mesa

O COI (2004) classifica as azeitonas de mesa de acordo com o grau de maturação, o processo de elaboração e a sua forma de apresentação. Estas classificações são também referidas a NP 3034 (2012).

Assim, de acordo com o estado de maturação em que são colhidas, existem três tipos de azeitonas de mesa: “i) **Azeitonas verdes:** frutos colhidos quando tenham atingido o seu tamanho definitivo e antes da coloração característica da maturação. A sua cor pode variar de verde a amarelo palha; ii) **Azeitonas mistas:** frutos colhidos durante a mudança de coloração, mas antes da sua maturação completa, de tons rosados, acastanhados ou esverdeados; iii) **Azeitonas pretas:** frutos colhidos quando completamente amadurecidos ou pouco antes da maturação completa ser atingida. A sua cor pode variar de negro-avermelhado a castanho-escuro passando por tons violáceos” (Figura 1.3).



Figura 1.3. Diferentes estados de maturação das azeitonas, verdes (A), mistas (B) e pretas (C).

Tendo em conta o processo de elaboração, as azeitonas de mesa podem ser classificadas em: “i) **Azeitonas tratadas:** Azeitonas verdes, mistas ou pretas submetidas a tratamento alcalino e posteriormente embaladas em salmoura, na qual se desenvolve a fermentação parcial ou total e finalmente conservadas ou não por adição de agentes acidificantes; ii) **Azeitonas ao natural:** Azeitonas verdes, mistas ou pretas colocadas diretamente em salmoura, na qual se desenvolve uma fermentação parcial ou total e finalmente conservadas ou não por adição de agentes acidificantes; iii) **Azeitonas desidratadas:** Azeitonas verdes, mistas ou pretas que foram ou não submetidas a um tratamento alcalino suave, conservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas em sal seco e/ou calor ou por outro processo tecnológico; iv) **Azeitonas oxidadas:** Azeitonas verdes ou mistas conservadas em salmoura, fermentadas ou não posteriormente escurecidas por oxidação em meio alcalino e embaladas em recipientes hermeticamente fechados submetidos a esterilização. A coloração preta deve ser uniforme; v) **Especialidades:** Azeitonas que podem ser preparadas por diversos processos ou como complemento das preparações acima apresentadas”. A azeitona verde britada e a azeitona mista retalhada são exemplos de especialidades.

Finalmente, de acordo com a forma de apresentação as azeitonas podem ser designadas por: “i) **Azeitonas inteiras** com ou sem pedúnculo, com a sua forma natural e cujo caroço não é removido: - Azeitonas britadas submetidas a um processo mecânico

em que a polpa é aberta sem quebrar o caroço, que permanece inteiro e intacto no interior do fruto; - Azeitonas retalhadas são golpeadas no sentido longitudinal por cortes na pele e parte da polpa. ii) **Azeitonas descaroçadas**, em que o seu caroço é removido mantendo a sua forma natural: - Azeitonas em metades são cortadas em duas partes aproximadamente iguais, perpendicularmente ao maior eixo do fruto; - Azeitonas em quartos são divididas em quatro partes aproximadamente iguais, perpendicularmente ao maior eixo do fruto; - Azeitonas laminadas são cortadas no sentido longitudinal em mais que quatro partes aproximadamente iguais; - Azeitonas em rodelas são divididas no sentido transversal em segmentos de espessuras regularmente uniforme; - Azeitonas em pedaços são cortadas em pequenos pedaços sem forma definida; - Azeitonas partidas são acidentalmente partidas durante o processo de descaroçamento ou recheamento; - Azeitonas recheadas são recheadas com um ou mais produtos apropriados (pimento, cebola, amêndoa, aipo, limão entre outros) ou com pastas naturais preparadas a partir destes. iii) **Pasta de azeitona** é obtida exclusivamente a partir de polpa de azeitona moída, podendo ou não ser adicionados outros ingredientes”.

1.3. Métodos de produção de azeitona de mesa

As azeitonas requerem um conjunto de transformações físico-químicas e microbiológicas, com o objetivo de torná-las adequadas para consumo, mantendo as suas características e a sua conservação por um maior período de tempo (Bianchi, 2003; Dabbou *et al.*, 2012). O principal objetivo do processamento das azeitonas de mesa é a remoção do amargor natural dos frutos, atribuído maioritariamente à oleuropeína, que é o composto fenólico mais abundante nas azeitonas não processadas (Arroyo-López *et al.*, 2008; Charoenprasert & Mitchell, 2012).

As azeitonas de mesa com maior expressão no circuito comercial internacional são as azeitonas verdes tratadas (Ex. Estilo espanhol - 50 % da produção total), as azeitonas pretas de fermentação natural (Ex. Estilo Grego - 25 % da produção total), e as azeitonas pretas oxidadas (Ex. Estilo Californiano - 25 % da produção total) (Bautista-Gallego *et al.*, 2011a; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2010; Piga *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2004).

As **azeitonas tratadas** como as produzidas de acordo com o método Espanhol, são recolhidas no estado de maturação verde e são submetidas a um tratamento com uma

solução de 2 % a 5 % (p/v) de hidróxido de sódio (a concentração de NaOH depende da temperatura, da cultivar, e do grau de maturação da fruta) para que ocorra a eliminação do sabor amargo pela hidrólise alcalina da oleuropeína. Posteriormente, as azeitonas são lavadas repetidamente com água para remover o excesso de base. Após a lavagem, os frutos são colocados em salmoura, contendo 6 % a 8 % (p/v) de NaCl, onde se desenvolve uma fermentação láctica (Charoenprasert & Mitchell, 2012; Montañó *et al.*, 2003; Panagou & Katsaboxakis, 2006; Parinos *et al.*, 2007).

As **azeitonas ao natural**, como as produzidas de acordo com o método Grego, são colhidas quando o fruto atinge o seu estado final de maturação (cor negra). Após a colheita, as azeitonas são lavadas e colocadas em salmoura com concentração entre 8 a 10 % (p/v) de NaCl, sem pré-tratamento com NaOH (Cardoso *et al.*, 2010; Hutkins, 2006; Nychas *et al.*, 2002; Piga *et al.*, 2005). Inicia-se uma fermentação natural e “espontânea”, que é conduzida maioritariamente por leveduras, mas também por bactérias ácido lácticas (BAL) e bactérias Gram-negativas (Kanavouras *et al.*, 2005; Panagou *et al.*, 2011). A microbiota é determinada pela disponibilidade de substratos, pelo teor de sal, valor de pH e da temperatura, bem como das condições de anaerobiose ou aerobiose utilizadas e dos compostos antimicrobianos presentes, como os compostos fenólicos (Cardoso *et al.*, 2010; Nychas *et al.*, 2002; Piga *et al.*, 2005; Tassou *et al.*, 2002).

E por último, outra forma de processamento são as **azeitonas oxidadas**, conhecidas por estilo Californiano. As azeitonas são colhidas quando a sua cor está a começar a mudar, antes de atingir a sua plena maturação, são submetidas a um tratamento com uma a cinco soluções de hidróxido de sódio (1 % a 2 %, p/v), por períodos de tempo variáveis para conseguir uma penetração progressiva do NaOH na polpa, não podendo atingir o caroço (Marsilio *et al.*, 2001). No fim de cada tratamento alcalino a azeitona é lavada com água, na qual é injetado ar sob pressão verificando-se a oxidação dos compostos fenólicos com desenvolvimento da cor negra. Depois de obtida a cor desejada, a azeitona continua a ser lavada e oxidada até se atingir aproximadamente um pH 8. Posteriormente esta azeitona é embalada e esterilizada (Bianchi, 2003; Marsilio *et al.*, 2001).

Existem vários tipos de processamento de azeitona de mesa tradicionais, típicas de certas regiões, que são menos conhecidos no mercado internacional (Dabbou *et al.*, 2012). Os métodos utilizados na produção de azeitona de mesa tradicional variam muito

de acordo com a região, sendo de salientar, que a fermentação natural das azeitonas é o processo mais comum e também o mais utilizado na região do Algarve.

1.3.1. Produção de azeitona de mesa - Fermentação natural

Quando se pretende processar azeitonas de mesa, por fermentação natural, os frutos devem ser colhidos em estado de maturação conveniente, apresentando uma textura firme (Cardoso *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2006). Os frutos podem mostrar várias colorações, desde verde a avermelhado-escuro ou negros e são igualmente ideais para a preparação deste tipo de azeitona, dependendo assim da região de produção e da época de colheita (Fernández *et al.*, 1997).

A fermentação natural de azeitona de mesa é um processo lento, devido à difusão dos compostos solúveis através do epicarpo da azeitona para o meio fermentativo, nomeadamente açúcares e compostos fenólicos tais como a oleuropeína (Gómez *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008). Os microrganismos utilizam os açúcares difundidos na salmoura durante a fermentação, e convertem-nos em ácidos orgânicos, nomeadamente o ácido láctico, o ácido acético e o ácido málico (Hutkins, 2006). No final da fermentação, as azeitonas devem apresentar um valor de pH inferior a 4,3 e uma acidez livre superior a 0,3 % expressa em ácido láctico (NP 3034, 2012; COI, 2004).

As azeitonas produzidas segundo este método, com ou sem aditivos aromáticos, têm um sabor característico, pois conservam um ligeiro amargor, devido à presença de compostos fenólicos residuais, originando um produto de alto valor nutritivo, com uma textura e cor característicos (Barranco *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Kanavouras *et al.*, 2005; Cabezas, 2011; Panagou *et al.*, 2011).

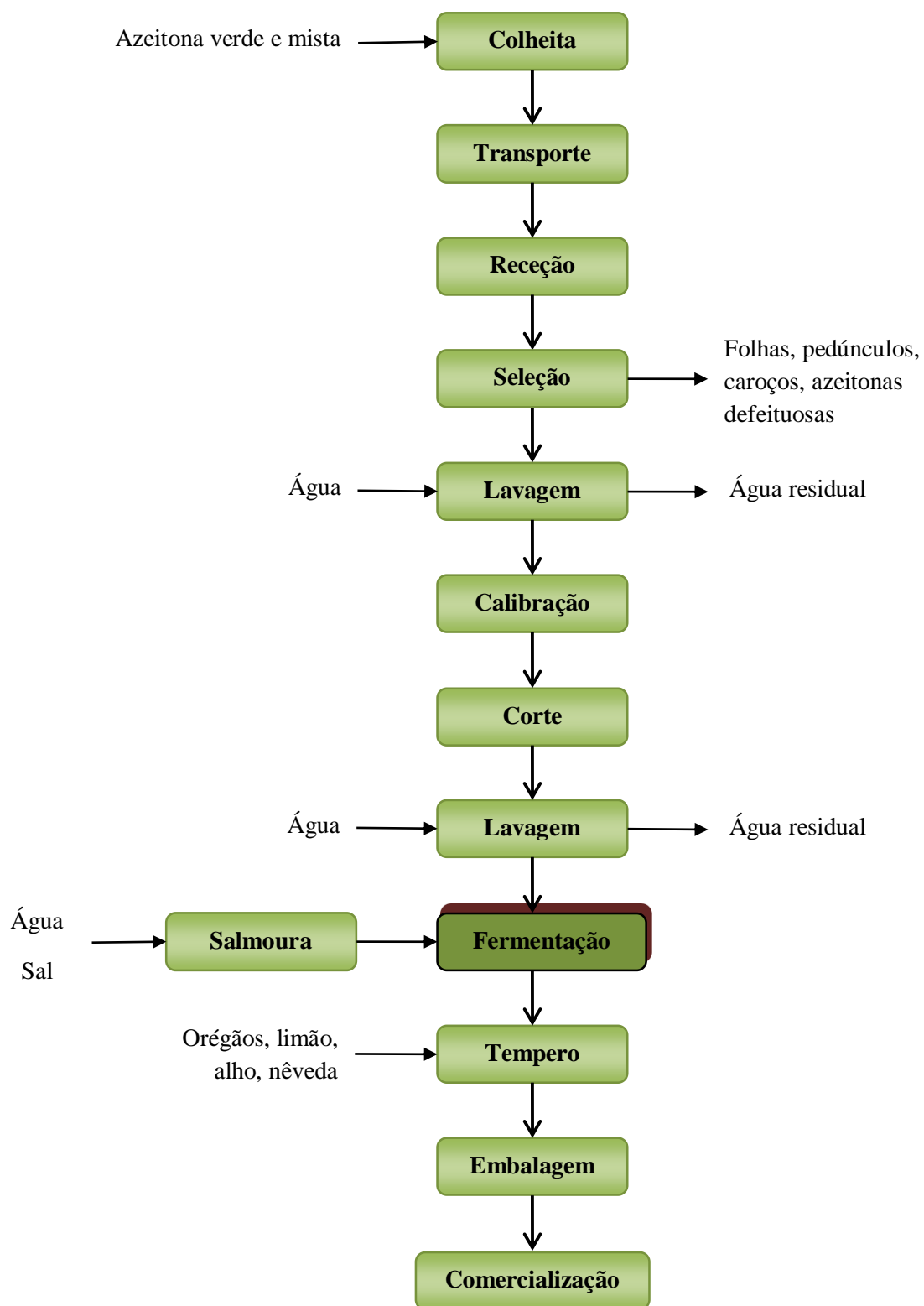


Figura 1.4. Fluxograma de produção da azeitona Cobrançosa verde/mista retalhada.

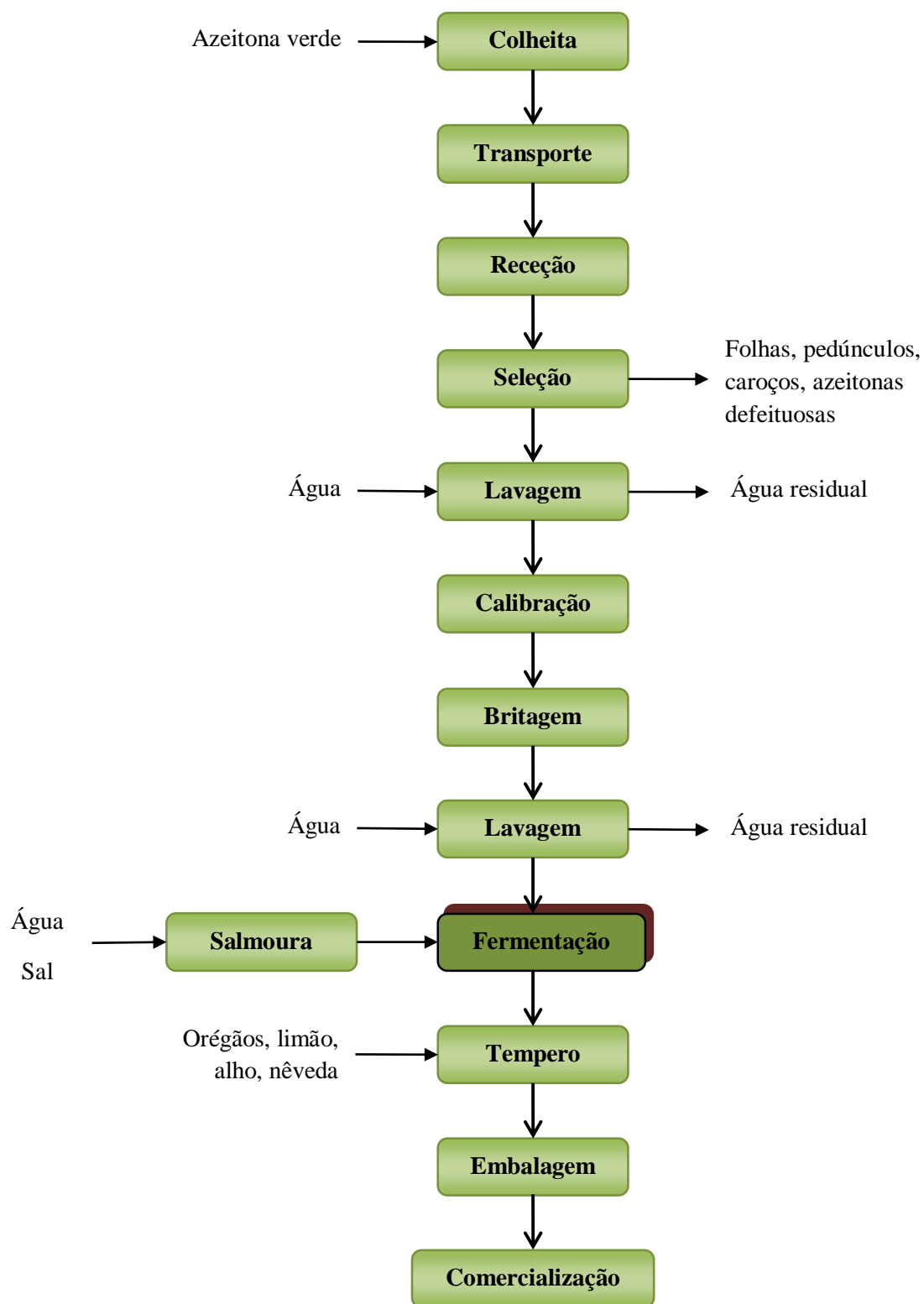


Figura 1.5. Fluxograma de produção da azeitona Maçanilha verde britada (Alves, 2010; Saúde, 2014).

No Algarve produzem-se azeitonas de mesa naturais, das variedades Maçanilha Algarvia (verdes), Cobrançosa (verdes, mistas e negras) e Galega (negras). A forma de apresentação privilegiada nesta região são as azeitonas inteiras, podendo ser britadas ou retalhadas. A britagem e o corte longitudinal (azeitonas retalhadas) das azeitonas constituem formas de acelerar os processos fermentativos, pois permitem o aumento de difusão dos compostos fermentescíveis das azeitonas para a salmoura. Os diagramas de fabrico das azeitonas retalhadas e das azeitonas britadas apresentam-se nas figuras 1.4 e 1.5, respetivamente.

1.4. Microrganismos na fermentação

Os microrganismos desempenham um papel importante no processo fermentativo da azeitona, sendo estes que determinam o sabor, o aroma e a qualidade do produto final. Os grupos microbianos envolvidos neste processo fermentativo são principalmente as (BAL), as leveduras e as bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Alves *et al.*, 2012; Bautista-Gallego *et al.*, 2011a; Panagou & Katsaboxakis, 2006). No decorrer da fermentação, a predominância de um grupo microbiano sobre outro depende de vários fatores, tais como a concentração de sal, o pH inicial, oxigénio disponível, a capacidade de difusão dos nutrientes do fruto para o meio e a temperatura a que decorre o processo (Nisiotou *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos, por exemplo, inibem o crescimento das BAL (Oliveira *et al.*, 2004).

Na primeira fase, o grupo microbiano que domina o processo são as bactérias Gram negativas, a maioria, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A segunda fase é caracterizada por um crescimento progressivo de BAL e leveduras, e uma diminuição gradual de bactérias Gram-negativas (Panagou & Katsaboxakis, 2006). Na última fase, quando o crescimento de BAL supera o crescimento de leveduras, a fermentação láctica é favorecida e obtém-se um produto com um valor de pH baixo, como nas azeitonas do estilo espanhol. No entanto, quando as leveduras superam o crescimento de BAL, as azeitonas possuem um sabor mais suave com um pH mais alto, como as azeitonas no estilo grego e nas azeitonas britadas da cultivar Maçanilha Algarvia (Alves *et al.*, 2012).

As leveduras desempenham um papel importante na fermentação de azeitonas de mesa, em especial no processo de fermentação natural (Arroyo-López *et al.*, 2006), mas podem apresentar um duplo papel neste tipo processo. Estão associadas à produção de

compostos que são relevantes para o desenvolvimento do flavor e do aroma e para as características de preservação deste alimento fermentado. No entanto, em certas condições de processamento e embalagem, as leveduras podem ter um papel negativo, pois são responsáveis pela produção de CO₂, amolecimento dos frutos, turvação das salmouras, produção de biofilmes e, provavelmente, produção de sabores desagradáveis (Alves *et al.*, 2012).

A presença de leveduras está também relacionada com o tipo de azeitonas (verdes ou maduras) e também depende dos diferentes processos que são utilizados (artesanal ou industrial) (Botta & Cocolin, 2012). Assim, a identificação da microbiota que ocorre durante o processo fermentativo é muito importante, pois contribui para compreender o papel de cada grupo microbiano na transformação de azeitona um alimento edível.

As espécies de leveduras dominantes na fermentação de azeitonas pertencem maioritariamente, aos géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Wickerhamomyces* e *Zygorulaspota* (Arroyo-López *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008; Bevilacqua *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010).

Na tabela 1.1. estão representadas algumas das espécies predominantes na fermentação natural de azeitona de mesa, de diferentes tipos de azeitonas e diferentes cultivares.

Tabela 1.1. Espécies de leveduras encontradas em azeitona de mesa, produzidas por fermentação natural.

Cultivar	Estado de maturação	Tipo de azeitona	Espécie	Referência
Maçanilha	Verde	Inteira	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Candida diddensiae</i> <i>Candida oleophila</i> <i>Candida quercitrusa</i> <i>Citeromyces matritensis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygorulasporea mrakii</i>	Alves <i>et al.</i> , 2012
			<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida fermentati</i> <i>Candida membranifaciens</i> <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Sporobolomyces odoratus</i>	Rodrigues, 2011
Manzanilla Hojiblanca	Verde	Inteira	<i>Candida boidinii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia galeiformis</i> <i>Pichia membranifaciens</i>	Rodríguez- Gómez <i>et al.</i> , 2010
Cobrançosa	Verdes, mistas e pretas	Inteira	<i>Pichia membranifaciens</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> <i>Candida ishiwadae</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Pichia manshurica</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida lipolytica</i>	Nogueira, 2012
	Mistas	Retalhada	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	
Negrinha de Freixo	Mistas	Inteira	<i>Candida boidinii</i> <i>Candida norvegica</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Galactomyces reessii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pichia manshurica</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula graminis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Borges, 2013

Tabela 1.1. Espécies de leveduras encontradas em azeitona de mesa, produzidas por fermentação natural (continuação).

Aloreña			<i>Candida diddensiae</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Zygosaccharomyces mrakii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Gordal	Verde	Inteira	<i>Candida tropicalis</i> <i>Pichia galeiformis</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Bautista-Gallego <i>et al.</i> , 2011a
Manzanilla			<i>Candida tropicalis</i> <i>Pichia galeiformis</i> <i>Candida thaimueangensis</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Itrana bianca, Itrana nera, Peranzana, Nocellara del Belice, Cellina di Nardò, Bella di Cerignola	Verde	Inteira	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Pichia galeiformis</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Candida ishiwadae</i>	Tofalo <i>et al.</i> , 2013
Nocellara dell'Etna	Verde	Inteira	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Candida diddensiae</i> <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> <i>Candida aaseri</i>	Muccilli <i>et al.</i> , 2011
Manzanilla	Verde	Inteira	<i>Pichia anomala</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Candida maris</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida humicola</i> <i>Candida zeylanoides</i> <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Trichosporum cutaneum</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula minuta</i> <i>Torulasporea delbrueckii</i>	(Hernández <i>et al.</i> , 2007)

1.4.1. Segurança e qualidade das azeitonas de mesa

As fermentações naturais dependem, da microbiota autóctone que não é controlada, podendo resultar em produtos finais inapropriados que podem abrigar microrganismos indesejáveis. Além disso, as azeitonas são um produto fermentado que está pronto-a-comer, sendo, normalmente, consumidas sem serem submetidas a qualquer tratamento térmico. Nestas circunstâncias podem ocorrer contaminações com microrganismos patogénicos, constituindo um problema de saúde pública. A contaminação das azeitonas pode ser devida à colheita dos frutos do solo, à falta de higiene do pessoal nos diferentes procedimentos, à limpeza e higienização inadequada dos equipamentos, e provavelmente à lavagem inadequada das azeitonas antes da fermentação (Panagou *et al.*, 2013). Se não forem aplicadas as regras de higiene adequadas, após o processamento, as azeitonas poderão ser contaminadas devido a problemas de recontaminação ou contaminação cruzada.

Os alimentos fermentados são geralmente menos implicados em infeções de origem alimentar ou intoxicações. Contudo, vários agentes patogénicos têm sido relatados como capazes de sobreviver ao processo de fermentação (Panagou *et al.*, 2013).

Apesar dos surtos de intoxicação alimentar, associados ao consumo de azeitonas não serem graves, existem vários estudos recentes que têm indicado a capacidade de sobrevivência de certos microrganismos patogénicos, embora em baixos números no produto final. Especificamente, os diferentes agentes patogénicos relatados em estudos durante a fermentação referem-se a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, coliformes e *Bacillus cereus*. Também foram relatados surtos de botulismo devido a *Clostridium botulinum*, associados às azeitonas de mesa (Argyri *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2008).

Por outro lado, foram realizadas pesquisas de mercado em Itália, Portugal e Grécia para determinar o perfil microbiológico e a presença de microrganismos patogénicos em azeitonas de mesa comercializadas. Os resultados mostraram que as condições de fermentação adequadas, juntamente com boas práticas de higiene durante e após o processo asseguram a ausência de bactérias patogénicas em azeitonas (Grounta *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012).

1.5. Redução do teor de cloreto de sódio

O processo de fermentação com vista à produção de azeitona de mesa ocorre em salmoura onde o cloreto de sódio (NaCl) tem um papel importante. O NaCl contribui para reduzir a atividade da água, o que ajuda a controlar o crescimento de microrganismos indesejáveis, facilitar o crescimento de microrganismos fermentativos e a melhorar as características organolépticas do produto final (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012; Panagou *et al.*, 2011).

No entanto, o consumo excessivo de sal está associado à hipertensão arterial, ao acidente vascular cerebral, à insuficiência cardíaca, à osteoporose, à obesidade, à diabetes, a doenças renais, entre outras (He & MacGregor, 2009).

Nos últimos anos tem existido uma recomendação das autoridades reguladoras para a reduzir a ingestão de sódio devido à sua implicação na hipertensão arterial. A pressão arterial elevada é um fator de risco para as doenças cardiovasculares, sendo a principal causa de morbilidade e mortalidade na Europa. Atualmente, em média, 75 % da ingestão de sódio é proveniente dos alimentos processados, 10 a 12 % ocorre naturalmente nos alimentos e o restante corresponde ao sal adicionado em casa (Panagou *et al.*, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um nível de consumo de sal da população de menos de 5 grama por pessoa por dia, para a prevenção de doença cardiovascular (DCV). Contudo, a ingestão de sal na maioria dos países da Região Europeia está muito acima da quantidade indicada (Graça, 2013; Moreno-Baquero *et al.*, 2013). Em Portugal, a quantidade de sal presente na alimentação é sensivelmente o dobro daquela que é recomendada pela OMS, tornando-se por isso urgente reduzir, de forma progressiva, a quantidade de sal na alimentação (Graça, 2013).

Uma forma de reduzir a ingestão diária de consumo é através da reformulação dos produtos alimentares (Graça, 2013).

Uma alimentação com baixo teor de sódio e rica em potássio (K) e cálcio (Ca) é recomendada para reduzir a pressão arterial e proteger contra osteoporose e o cancro do cólon. Além disso, o cloreto de cálcio e o cloreto de potássio estão entre os minerais permitidos pela União Europeia na preparação de alimentos ou suplementos alimentares (Bautista-Gallego *et al.*, 2010; Bautista-Gallego *et al.*, 2011b).

Apesar do impacto do teor de sódio nas azeitonas de mesa ser limitado, porque estas são consumidas numa proporção reduzida, é importante uma composição mais equilibrada, para melhorar a imagem da azeitona de mesa e a alimentação do consumidor (Bautista Gallego *et al.*, 2011). De acordo com estudos recentes, o teor final de sódio nas azeitonas é de 16 g/Kg de polpa, para uma porção de 15 g, o que significa uma contribuição de 0,24 g para a ingestão diária de sódio (Moreno-Baquero *et al.*, 2013).

Os efeitos negativos do consumo elevado de cloreto de sódio (NaCl) podem ser superados pela substituição deste sal por outros sais, com efeitos favoráveis para a saúde humana, tais como o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de magnésio (MgCl₂) e o cloreto de cálcio (CaCl₂) (Bautista-Gallego *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011).

A substituição do NaCl na produção de azeitonas de mesa por outros sais mostrou perspectivas interessantes e demonstrou que o NaCl pode ser substituído por KCl e/ou CaCl₂ em diversas proporções, sem alterar o perfil de fermentação habitual em azeitonas de cultivar Gordal (Bautista-Gallego *et al.*, 2011c), em azeitonas Conservolea (Panagou *et al.*, 2011) e em azeitonas Manzanilla-Aloreña (Bautista-Gallego *et al.*, 2010).

1.6. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de azeitona de mesa inteira retalhada da cultivar Cobrançosa e estudar o efeito de diferentes combinações de sais na fermentação e qualidade microbiológica de azeitonas da cultivar Cobrançosa (NaCl e KCl) e de azeitonas inteiras britadas da Cultivar Maçanilha Algarvia (NaCl, KCl e CaCl₂).

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

a) Cultivar Cobrançosa

- Estudar a variação da microbiota (microrganismos mesófilos aeróbios, leveduras, enterobactérias e bactérias ácido lácticas) ao longo do processo fermentativo de azeitona ao natural inteira retalhada em salmouras constituídas por NaCl (8 %) e por NaCl (4 %) e KCl (4%).
- Identificar as espécies de leveduras ao longo do processo de fermentação.
- Pesquisar os parâmetros microbiológicos de segurança alimentar nos produtos finais.

b) Cultivar Maçanilha Algarvia

- Estudar a variação da microbiota (leveduras, enterobactérias e bactérias ácido lácticas) ao longo do processo fermentativo de azeitona ao natural inteira britada em salmouras constituídas por 8 % NaCl, 4 % NaCl + 4 % KCl, 4 % NaCl + 4 % CaCl₂, 4 % KCl + 4 % CaCl₂ e 2,7 % NaCl + 2,7 % KCl + 2,7 % CaCl₂.
- Identificar as espécies de leveduras predominantes no final do processo fermentativo.
- Pesquisar os parâmetros microbiológicos de segurança alimentar nos produtos finais.

Materiais e Métodos



2. Materiais e Métodos

2.1. Metodologia de produção de azeitona de mesa

As azeitonas da cultivar Cobrançosa (Figura 2.1.A) foram colhidas nos diferentes graus de maturação, em Novembro de 2013, por produtores da região do Alentejo, enquanto as azeitonas da cultivar Maçanilha Algarvia (Figura 2.1.B) foram colhidas, verdes, manualmente em Outubro de 2012 por produtores da região de Tavira. As azeitonas, foram transportadas até à fábrica Hélder Madeira Comércio e Indústria de Azeitonas, Lda (Tavira), onde ocorreu a primeira fase do processamento das mesmas.



Figura 2.1. A) Azeitona Cobrançosa; B) Azeitona Maçanilha.

Após a lavagem, calibragem e corte (Cobrançosa) ou britagem (Maçanilha Algarvia) (Figuras 1.4 e 1.5), as azeitonas foram lavadas, pesadas e imersas em salmoura a 2 %, sendo de imediato transportadas para o Laboratório de Processamento de Alimentos do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve.

2.1.1. Azeitona Cobrançosa retalhada

No que diz respeito à azeitona Cobrançosa, como esta apresentava diferentes estados de maturação (verde, mista e preta) separaram-se os frutos verdes dos maduros (pretos) e dos que apresentavam um estado misto de maturação (coloração rosada, acastanhada ou esverdeado). Prepararam-se fermentações com salmouras contendo NaCl e com uma mistura de NaCl e KCl. As diferentes fermentações foram preparadas de acordo com a tabela 2.1, decorreram durante 134 dias a uma temperatura média de 20 °C.

Tabela 2.1. Preparação das diferentes fermentações de azeitona da cultivar Cobrançosa.

Fermentação	Azeitona		Salmoura		
	Tipo	Quantidade (Kg)	NaCl (%)	KCl (%)	Quantidade (L)
A	Verde	9,000	8,00	0,00	6,000
B	Mista	10,883	8,00	0,00	7,500
B	Mista	11,119	8,00	0,00	8,500
C	Mista	11,806	4,00	4,00	7,500

2.1.2. Azeitona Maçanilha bridada

As azeitonas verdes bridadas da cultivar Maçanilha Algarvia, foram escorridas e imersas em salmouras de diferentes concentrações (Tabela 2.2). Foram preparados 10 fermentadores e cada um deles continha 8 Kg de azeitona e 7,4 L de salmoura.

As fermentações foram realizadas em duplicado a uma temperatura média de 18,9 °C, durante um período de 162 dias, com início a 26 de Outubro de 2012.

Tabela 2.2. Concentrações das diferentes salmouras.

Salmoura	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1	8,0	0,0	0,00
2	4,0	4,0	0,00
3	4,0	0,0	4,00
4	0,0	4,0	4,00
5	2,7	2,7	2,7

2.2. Amostragem

De modo a seguir a evolução dos processos fermentativos, as amostras de salmoura e azeitona foram recolhidas dos respetivos fermentadores de acordo com os planos de amostragem estabelecidos (Tabelas 2.3 e 2.4).

Tabela 2.3. Plano de amostragem da azeitona de mesa retalhada.

Tempo (Dias)										
0	2	7	10	14	21	28	49	64	91	134

Tabela 2.4. Plano de amostragem da azeitona de mesa bridada.

Tempo (Dias)										
0	4	11	18	24	36	50	79	92	128	162

A recolha das amostras foi realizada em condições de assepsia (Figura 2.2). As amostras de salmoura foram recolhidas para tubos "Falcon" de 50 ml e as azeitonas foram colocadas em sacos estéreis, procedendo-se de imediato às análises microbiológicas.

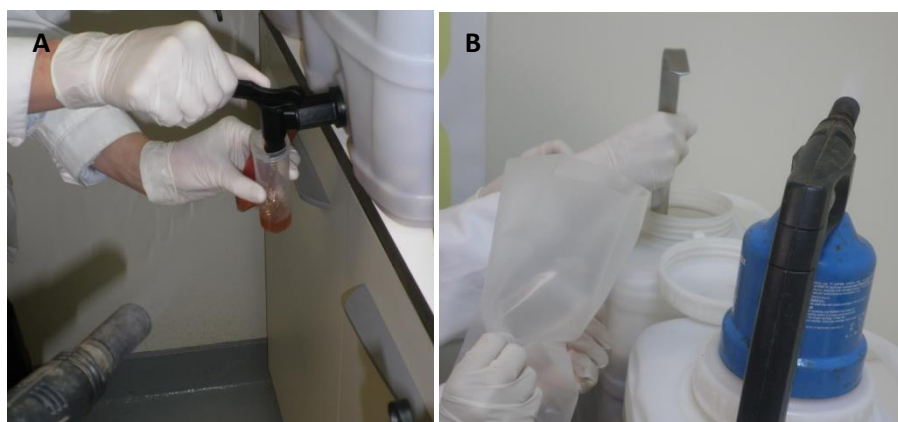


Figura 2.2. A) Recolha da amostra de salmoura; B) Recolha da amostra de azeitona.

2.3. Parâmetros microbiológicos

Para realizar as análises microbiológicas, misturaram-se 12,5 g de azeitona e 12,5 g de salmoura com 225 ml de solução de "Ringer" (Merck). Esta mistura foi posteriormente homogeneizada, durante 2 minutos (min) em sacos de polietileno estéreis. Após a homogeneização, efetuou-se uma série de diluições sucessivas com solução de "Ringer" (Merck). Posteriormente, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

2.3.1. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios

Procedeu-se à inoculação por incorporação, em duplicado, de 1 ml de cada uma das diluições decimais na superfície do meio de cultura "Plate Count Agar" (PCA) (Scharlau). As placas foram incubadas a 30 °C durante 3 dias.

2.3.2. Contagem de leveduras

Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura "Malt Extract Agar" (MEA) (Scharlau), pH 5. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias.

2.3.3. Contagem de fungos filamentosos

Procedeu-se à inoculação por espalhamento, em duplicado, de 0,1 ml de cada uma das diluições decimais na superfície do meio de cultura "Rose Bengal Chloramphenicol Agar" (RB) (Scharlau). As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias.

2.3.4. Contagem de bactérias ácido lácticas

Procedeu-se à inoculação por incorporação, em duplicado, de 1 ml de cada uma das diluições decimais no meio de cultura "Man Rugosa and Sharpe Agar" (MRS) (Merck), suplementado com ácido sórbico (0,14 %). Após inoculação e solidificação colocou-se uma segunda camada do mesmo meio de cultura. As placas foram incubadas a 30 °C durante 3 dias (BS ISO 15214:1998).

2.3.5. Contagem de enterobactérias e *Escherichia coli*

Procedeu-se à inoculação por incorporação de 1 ml de cada uma das diluições decimais, em duplicado, no do meio de cultura "Chromocult Agar" (Merck) com pH 6,8 e do meio de cultura "Violet Red Bile Dextrose Agar" (VRBD) (Scharlau). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas (h).

2.3.6. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições decimais, em duplicado, na superfície do meio de cultura "Baird Parker Agar" (BP) (Biokar), enriquecido com solução de gema de ovo e com telurito de potássio. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 h (ISO 6888-1:1999 (E)).

2.3.7. Contagem de bactérias do género *Pseudomonas* sp.

Procedeu-se à inoculação por espalhamento, em duplicado, de 0,1 ml de cada uma das diluições decimais na superfície do meio de cultura "Cetrimide Agar" (Scharlau). As placas foram incubadas a 42 °C durante 48 h.

2.3.8. Contagem de microrganismos psicrótróficos

Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura PCA. As placas foram incubadas a 6,5 °C durante 10 dias.

2.3.9. Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada em quatro fases diferentes: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, inoculação e por fim a confirmação (UNE-EN ISO 6579:2002).

Pré-enriquecimento: Misturaram-se 12,5 g de azeitona e 12,5 g de salmoura em frascos "Duran", com 225 ml de uma solução de Água Peptonada Tamponada (APT) (Oxoid), seguindo-se uma incubação a 37 °C durante 24 h.

Enriquecimento seletivo: Após a incubação adequada, retirou-se do meio de pré-enriquecimento, 0,1 ml para tubos com 10 ml do meio de cultura de enriquecimento "Rapaport-Vassiliadis" (RV) (Oxoid) e 1 ml para tubos com 10 ml do meio de cultura "Muller Kauffmann Tetrathionate – Novobiocin broth" (MKTTn) (Oxoid). Estas culturas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h.

Inoculação: Dos tubos que apresentaram uma reação positiva, procedeu-se à inoculação de uma ansada para a superfície de placas que continham os meios de cultura "Brilliance *Salmonella* Agar base" (BSA) (Oxoid), e "Xylose Lysine Deoxycholate Agar" (XLD) (Scharlau), em duplicado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Após a sua incubação, pesquisou-se a presença de colónias típicas que no meio de cultura BSA são roxas e no caso do meio XLD são vermelhas. O aparecimento de colónias típicas implicaria a sua confirmação através de testes bioquímicos e/ou moleculares adequados.

2.3.10. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada em quatro fases diferentes: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, inoculação e por fim a confirmação (ISO 11290-1:1996).

Pré-enriquecimento: Misturaram-se se 12,5 g de azeitona e 12,5 g de salmoura, em frascos Duran com 225 ml de solução de APT (Oxoid) seguindo-se uma incubação a 30 °C durante 24 h.

Enriquecimento seletivo: Do meio de pré-enriquecimento retirou-se 0,1 ml para tubos que com 10 ml de "Fraser broth" (Scharlau). Os tubos foram incubados a 37 °C durante 48 h.

Inoculação: Dos tubos que apresentaram uma reação positiva, procedeu-se à inoculação de uma ansada na superfície de placas com meio de cultura "Palcam Agar" (Scharlau), em duplicado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Após a incubação, pesquisou-se a presença de colónias típicas de *L. monocytogenes* que são verdes escuras com halos escuros. O aparecimento de colónias típicas implicaria a sua confirmação através de testes bioquímicos e/ou moleculares adequados.

2.4. Identificação de leveduras

2.4.1. Isolamento de leveduras

Após a contagem das leveduras nas placas de MEA (Scharlau), selecionaram-se aleatoriamente as colónias isoladas de acordo com a sua morfologia e repicaram-se para placas com "Yeast Malt Agar" (YM) (Scharlau). Após 3 dias de incubação a 25 °C foram observadas ao microscópio para verificar que se tratavam de leveduras e se eram colónias puras. Sempre que necessário, repicou-se novamente para assegurar a pureza das culturas.

Ao longo das fermentações das azeitonas da cultivar Cobrançosa, recolheram-se 420 isolados em cinco momentos diferentes (Tabela 2.5.) De cada placa recolheu-se um número total de isolados entre 18 a 45 colónias, em cada momento de amostragem, nos diferentes processos fermentativos.

Tabela 2.5. Número de isolados das diferentes fermentações, ao longo do processo fermentativo da azeitona Cobrançosa.

Fermentação	Tempo (dia)					Total
	2	7	21	49	134	
A) Azeitona verde; 8 % NaCl	20	19	19	22	18	98
B) Azeitona mista; 8 % NaCl	39	45	45	43	45	217
C) Azeitona mista; 4 % NaCl + 4 % KCl	20	20	20	22	23	105
Total	79	84	84	87	90	420

No caso das azeitonas da cultivar Maçanilha Algarvia, apenas foi feita a identificação de leveduras no final dos processos fermentativos, ou seja, ao fim de 162 dias, tendo-se recolhido um total de 100 isolados das diferentes fermentações (cerca de 20 isolados de cada fermentação).

As culturas puras de leveduras foram crescidas em 2 ml de meio YM (0,5 % peptona, 0,3 % extrato de levedura, 0,3 % malte, 1 % glucose) a 25 °C numa incubadora orbital (IKA KS 4000i). Após cerca de 16 h, as culturas (0,6 ml) foram colocadas em criotubos contendo 0,4 ml de glicerol (100 %) e congeladas a -80 °C, para analisar posteriormente.

2.4.2. Extração de DNA

As leveduras cresceram em meio de cultura líquido YM (0,5 % peptona, 0,3 % extrato de levedura, 0,3 % malte, 1 % glucose), a 25 °C durante 16 h com agitação numa incubadora orbital (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 pellet de células com água destilada ultra pura estéril. Procedeu-se novamente a uma centrifugação a 12000 rpm a 4 °C durante 5 min.

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao pellet 500 µl da solução de sorbitol 0,9 M e 30 µl de uma solução de litícase 1 mg/ml. Após agitação, incubou-se durante 60 minutos a 37 °C, posteriormente centrifugou-se durante 5 min a 12000 rpm a 4 °C.

Substituiu-se o sobrenadante por 500 µl de uma solução 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA e adicionou-se ainda 13 µl de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 %. Posteriormente, agitou-se e incubou-se a 65 °C durante 5 min. Adicionou-se 200 µl de acetato de potássio 5 M e colocou-se no gelo durante 10 min. Centrifugou-se 15 min a 13000 rpm a 4 °C.

Retirou-se o sobrenadante para um novo "eppendorf" contendo 700 µl de isopropanol (-20 °C) e incubou-se novamente à temperatura ambiente durante 10 min. Após uma nova centrifugação durante 15 min a 12000 rpm a 4 °C, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 500 µl de etanol a 70 %. Realizou-se uma centrifugação durante 3 min a 4 °C a 12000 rpm e retirou-se cuidadosamente o etanol e o seu excesso com papel absorvente.

Deixou-se evaporar o etanol a 37 °C. Ressuspendeu-se o DNA com 50 µl de água ultra pura estéril e armazenou-se a -20 °C, para posterior quantificação da concentração de DNA extraído.

2.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação da região 5,8S-ITS ("Internal Transcribed Spacer") realizou-se de acordo com Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Utilizaram-se os primers ITS1 (0,5 µM) (5'-CGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (0,5 µM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Prepararam-se as reações de PCR num volume de 70 µl de acordo com a tabela 2.6. Distribuiu-se 67 µl da Mix em cada tubo de PCR e adicionou-se 3 µl de solução de DNA (50-500 ng) de cada isolado. Preparou-se ainda um tubo de controlo da reação onde o DNA foi substituído por água ultra pura estéril.

Tabela 2.6. Mistura para PCR (Mix) (Região 5,8S-ITS).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
Primer Forward ITS 1	1,4	1 µM
Primer Reverse ITS 4	1,4	1 µM
Desoxiribonucleótidos (Promega)	7	250 µM
MgCl₂ (Promega)	7	2,5 mM
Tampão	14	1x
DNA Polimerase (Promega)	0,5	5 unidades
Água ultra pura estéril	35,7	
DNA	3	
Total	70	

As reações de PCR decorreram nas condições referidas na tabela 2.7. num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler). Os produtos de PCR foram separados num gel de agarose (1 %) preparado com TAE (1x) contendo uma concentração final de 0,5 µl/ml de brometo de etídio, através de uma corrida de eletroforese (90 V). Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (NZYDNA Ladder V, Nzytech). Os géis foram visualizados no sistema G-Box Syngene- Genesys 10 UV Scanner.

Tabela 2.7. Condições da amplificação da PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação Inicial	95	5
Desnaturação	95	1
Annealing	55	1
Extensão	72	1
Extensão final	72	7

2.4.4. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

Os produtos resultantes das reações de PCR (uma alíquota constituída por 1 µl) foram digeridos com as endonucleases de restrição *Cfo* I (Sigma), *Hae* III (Promega) e *Hinf* I (Bioron) (Tabela 2.8). As misturas foram incubadas 12 h a 37 °C e os fragmentos de restrição foram separados em géis de agarose 3 % em tampão TAE (1x). Após eletroforese (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 (NZYDNA Ladder V, Nzytech).

Tabela 2.8. Reações de restrição.

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

A análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição foi utilizada para agrupar os diferentes isolados com padrões de restrição idênticos. Posteriormente, 10 a 20 % dos isolados incluídos nos diferentes grupos foram identificados por sequenciação parcial do gene do rRNA 26S.

2.4.5. Sequenciação parcial do gene do rRNA 26S

A identificação das leveduras incluídas em cada grupo de RFLP foi realizada por sequenciação parcial do gene do rRNA 26S. Procedeu-se à amplificação parcial do gene do rRNA 26S, nomeadamente os domínios D1 e D2, utilizando os primers NL 1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL 4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') descritos por Kurtzman e Robnett (1998). A mistura para a reação de PCR realizou-se de acordo com a tabela 2.9.

As amplificações decorreram num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler) através de um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 min, annealing a 55,5 °C durante 1 min e extensão a 72 °C durante 1 min. No final, ocorreu um passo de extensão a 72 °C, durante 7 min.

Tabela 2.9. Mistura para PCR (Mix) (rRNA 26S).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
Primer Forward NL 1	1,4	1 µM
Primer Reverse NL 4	1,4	1 µM
Desoxiribonucleótidos (Promega)	7	250 µM
MgCl ₂ (Promega)	7	2,5 mM
Tampão	14	1x
DNA Polimerase (Promega)	0,5	5 unidades
Água ultra pura estéril	35,7	
DNA	3	
Total	70	

Os produtos amplificados foram separados num gel de agarose (1 %) em TAE (1x) contendo 7 µl de brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (NZYDNA Ladder V, Nzytech).

Os produtos resultantes da amplificação foram sequenciados, recorrendo aos Serviços de Biologia Molecular do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve.

As sequências de DNA obtidas foram comparadas com as depositadas na base de dados "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ("BLAST- Basic Local Alignment Sequence Tool").

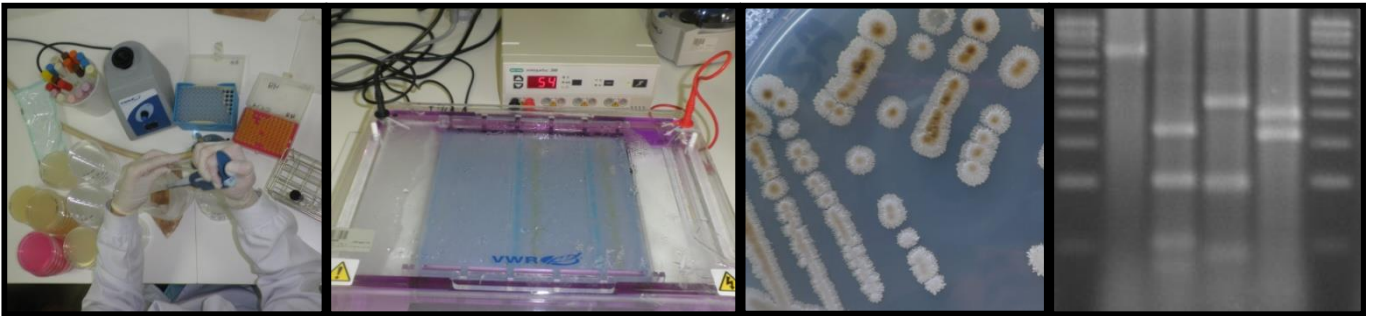
2.6. Modelização

Os dados experimentais, foram ajustados ao modelo de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1994), após a conversão para Logaritmo (Log) das unidades formadoras de colónias por massa de azeitona obtidas ao longo dos processos fermentativos, utilizando o modelo trilinear no "software" DMFit (Institute of Food Investigação, Reading, Reino Unido).

2.7. Análise Sensorial

No final das fermenta es de azeitonas da cultivar Cobrançosa e Maçanilha, estas foram avaliadas em rela o aos seguintes atributos sensoriais: aspeto, firmeza, aroma, acidez, amargor, teor de sal, sabor e aprecia o global. Contudo, os resultados obtidos não são apresentados neste relatório por não fazerem parte dos objetivos do presente trabalho.

Resultados e Discussão



3. Resultados e Discussão

Durante as fermentações das azeitonas de mesa da cultivar Cobrançosa e Maçanilha Algarvia, estudou-se a dinâmica das populações microbianas ao longo do tempo, na azeitona e na salmoura. Os resultados obtidos encontram-se descritos seguidamente.

3.1. Azeitona Cobrançosa

3.1.1. Variação da população microbiana nas diferentes fermentações

Foram realizadas três fermentações independentes de azeitona retalhada da cultivar Cobrançosa, em diferentes estados de maturação e em salmouras diferentes: Fermentação A - azeitona verde numa salmoura de 8 % NaCl (FA), Fermentação B - azeitona mista numa salmoura de 8 % NaCl (FB) e Fermentação C - azeitona mista numa salmoura de 4 % NaCl + 4% KCl (FC). A dinâmica das populações de microrganismos mesófilos aeróbios e leveduras durante as fermentações está representada na Figura 3.1.1. No primeiro dia, quando todas as fermentações foram preparadas, os microrganismos mesófilos e as leveduras apresentaram números de $1,78 \pm 0,00$ (FA), $2,07 \pm 0,23$ (FB), $2,46 \pm 0,08$ (FC) Log UFC/g, e de $2,15 \pm 0,21$ (FA), $2,31 \pm 0,23$ (FB) e $2,45 \pm 0,21$ (FC) Log UFC/g, respetivamente. As contagens de microrganismos mesófilos foram semelhantes às contagens de leveduras, sugerindo que as leveduras possam ser um dos principais grupos microbianos responsáveis pelas fermentações naturais de azeitonas da cultivar Cobrançosa. Estes microrganismos foram também o grupo predominante em azeitonas de mesa verdes das cultivares Maçanilha e Negrinha de Freixo como referido por Alves *et al.* (2012) e Pereira *et al.* (2015), respetivamente. Ao longo do período de fermentação não foram detetadas enterobactérias e bactérias ácido lácticas (BAL).

A ausência de BAL tem sido descrita em diferentes produções de azeitonas de mesa na Sicília (Aponte *et al.*, 2010), na Eslovénia (Valencic *et al.*, 2010) e em Portugal (Alves *et al.*, 2012). Os principais fatores que explicam a ausência de BAL, nas azeitonas de mesa verdes britadas são a elevada concentração inicial de NaCl e a composição das drupas em compostos inibidores naturais, tais como os compostos fenólicos. Tassou *et al.* (2002) verificaram que as concentrações elevadas de NaCl impediram o crescimento de BAL, tendo facilitado o crescimento e atividade das leveduras que produzem produtos finais com menor acidez livre que resultam em valores de pH mais elevados. Em relação

aos compostos fenólicos, Medina *et al.* (2008) identificaram a forma de-aldeídica do ácido deca-carboxi-metil elenólico (EDA) ou o hidroxitirosol do ácido deca-carboxi-metil elenólico (HyEDA) como os principais inibidores de BAL.

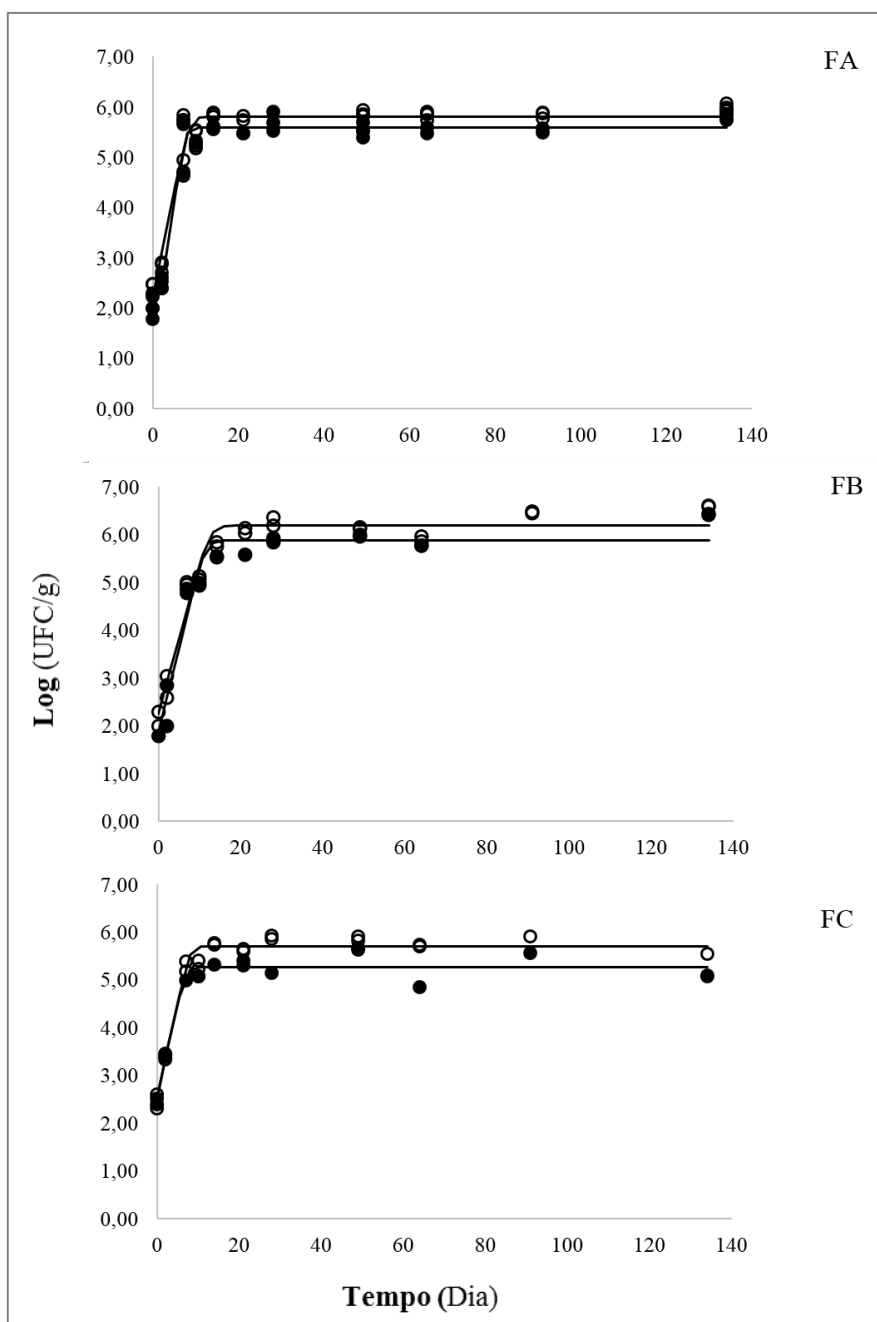


Figura 3.1.1. Crescimento das populações de leveduras (○) e microrganismos mesófilos (●) ao longo das fermentações da azeitona Cobrançosa (FA - Azeitona verde: 8 % NaCl, FB - Azeitona mista: 8 % NaCl, FC - Azeitona mista: 4 % NaCl + 4% KCl).

No que diz respeito às enterobactérias não foram detetadas colónias viáveis em qualquer das fermentações, o mesmo ocorreu em azeitonas de mesa das cultivares Brandofino, Castricana, Nocellara del Belice, e Passalunara (Aponte *et al.*, 2010). Isto pode ter ocorrido devido ao elevado teor de compostos fenólicos na azeitona Cobrançosa.

Para cada fermentação, estimou-se a taxa específica de crescimento (Tabela 3.1.1) dos microrganismos mesófilos e leveduras, utilizando o modelo de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1994). Em relação aos microrganismos mesófilos, os valores do coeficiente de determinação (R^2) variaram entre 0,93 a 0,97 e o erro padrão do ajuste do modelo (se) variou de 0,24 a 0,37. Observou-se um aumento da população de mesófilos, caracterizada pelas taxas específicas de crescimento de $0,358 \pm 0,0427$, $0,611 \pm 0,0575$ e $0,401 \pm 0,0752$ dia⁻¹ nas fermentações A, B e C, respectivamente. No sétimo dia de fermentação o número de mesófilos atingiu os níveis de $4,83 \pm 0,06$ (FA), $5,20 \pm 0,58$ (FB) e $4,99 \pm 0,00$ (FC) Log UFC/g, tendo-se seguido uma fase estacionária até ao final dos processos, onde se obteve contagens finais de $6,43 \pm 0,02$ (FA), $5,80 \pm 0,06$ (FB) $5,09 \pm 0,01$ (FC) Log UFC/g.

Tabela 3.1.12. Taxa específica de crescimento (\pm desvio padrão) obtida pelo ajuste dos dados de crescimento de leveduras e mesófilos com modelo de Baranyi (R^2 - coeficiente de determinação, se -erro padrão).

Parâmetros	FA - Azeitona verde 8 % NaCl		FB - Azeitona mista 8 % NaCl		FC - Azeitona mista 4 % NaCl + 4 % KCl	
	Leveduras	Mesófilos	Leveduras	Mesófilos	Leveduras	Mesófilos
R^2	0,96	0,93	0,96	0,97	0,98	0,95
se	0,30	0,37	0,28	0,24	0,19	0,24
Taxa específica de crescimento (dia ⁻¹)	$0,316 \pm 0,0283$	$0,358 \pm 0,0427$	$0,427 \pm 0,031$	$0,611 \pm 0,0575$	$0,408 \pm 0,0319$	$0,401 \pm 0,0752$

No que diz respeito à dinâmica da população de leveduras, os valores do coeficiente de determinação (R^2) variaram entre 0,96 a 0,98 e o erro padrão do ajuste do modelo (se) variou de 0,19 a 0,30. As taxas específicas de crescimento da população de leveduras foram de $0,316 \pm 0,0283$, $0,427 \pm 0,031$ e $0,408 \pm 0,0319$ dia⁻¹ nas fermentações A, B e C, respectivamente. No sétimo dia de fermentação, o número de leveduras atingiu os níveis de $4,98 \pm 0,06$ (FA), $5,28 \pm 0,60$ (FB) e $5,28 \pm 0,14$ (FC), Log UFC/g, tendo-se seguido uma fase estacionária até ao final dos processos com os números de $6,60 \pm 0,01$ (FA), $5,98 \pm 0,07$ (FB) e $5,54 \pm 0,00$ (FC) Log UFC/g. Em fermentações de azeitonas naturais italianas (Aponte *et al.*, 2010; Cocolin *et al.*, 2013), obtiveram-se valores semelhantes nas contagens finais de leveduras.

A taxa específica de crescimento das leveduras, na fermentação de azeitona verde com 8 % NaCl (FA) ($0,316 \pm 0,0283$ dia⁻¹) foi inferior à calculada nas fermentações realizadas com azeitona mista ($0,427 \pm 0,031$ dia⁻¹). A taxa específica de crescimento da população de mesófilos, na fermentação de azeitona verde ($0,358 \pm 0,0427$ dia⁻¹) também

foi inferior à calculada na fermentação de azeitona mista com 8 % NaCl (FB) ($0,611 \pm 0,0575 \text{ dia}^{-1}$). Estes resultados podem explicar-se devido à elevada concentração de determinados compostos fenólicos nos frutos verdes, que diminui ao longo do amadurecimento das azeitonas (Charoenprasert & Mitchell, 2012; Othman *et al.*, 2009). A presença de cloreto de potássio na fermentação C, não afetou o crescimento das leveduras mas causou uma diminuição na taxa específica de crescimento dos mesófilos.

3.1.2. Qualidade e segurança microbiológica

No final da fermentação, as azeitonas produzidas foram caracterizadas em relação aos parâmetros de segurança microbiológica *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Além disso, a presença de *Pseudomonas* sp., enterobactérias, *Escherichia coli*, BAL, leveduras, bolores, *Staphylococcus aureus*, microrganismos psicrotróficos e mesófilos foram também enumerados no produto final (Tabela 3.1.2).

Tabela 3.1.2. Resultados dos parâmetros de higiene e segurança microbiológica (Log UFC/g) nas azeitonas da cultivar Cobrançosa (ND- Não detetado).

Microrganismos	FA	FB	FC
	Azeitona verde 8 % NaCl	Azeitona mista 8 % NaCl	Azeitona mista 4 % NaCl + 4% KCl
Leveduras	6,60 ± 0,01	5,98 ± 0,07	5,54 ± 0,00
Bolores	<1	<1	<1
Mesófilos	6,43 ± 0,02	5,80 ± 0,06	5,09 ± 0,01
BAL	<1	<1	<1
Enterobactérias	<1	<1	<1
Psicrotróficos	<1	<1	<1
<i>Pseudomonas</i> sp.	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i>	<1	<1	<1
<i>Salmonella</i> sp.	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND

A microbiota predominante foram as leveduras e não foram encontradas BAL, enterobactérias, *Pseudomonas*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, bolores, psicrotróficos e *E. coli* nas azeitonas de mesa produzidas nas diferentes fermentações. De acordo com o regulamento da Comissão Europeia (EC, 2005; EC, 2007), as azeitonas de mesa produzidas cumpriram os critérios microbiológicos de segurança alimentar.

3.1.3. Identificação de leveduras

As leveduras são um grupo de microrganismos normalmente encontrado durante o processamento de azeitona de mesa, que podem contribuir para melhorar a fermentação e o produto final, mas também podem ser responsáveis pela deterioração, na fermentação e durante o tempo de prateleira dos produtos embalados e assim causar graves perdas económicas (Alves *et al.*, 2015; Arroyo-Lopez *et al.*, 2012).

Das três fermentações em estudo, obtiveram-se 420 isolados de leveduras recolhidas nos dias 2, 7, 21, 49 e 134 de fermentação, tendo em conta as características morfológicas e microscópicas das suas colónias (Figura 3.1.2. A1 e A2- *Aureobasidium pullulans*). Os diferentes isolados de leveduras recolhidos ao longo das fermentações, foram inicialmente agrupados em 17 perfis de RFLP (Figura 3.1.2. A3- *A. pullulans*) da região ITS-5,8S rDNA (Tabela 3.1.3), utilizando as enzimas de restrição *Cfo* I, *Hae* III e *Hinf* I. Em seguida, identificou-se um número representativo de leveduras em cada grupo de RFLP recorrendo à análise das sequências de DNA dos domínios D1/D2 do gene do rRNA 26S que foram comparados com as sequências de estirpes tipo depositadas no "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) "GenBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Tabela 3.1.3) (Čadež *et al.*, 2012; Fell *et al.*, 2000; Kurtzman & Robnett, 1998; Kurtzman *et al.* 2008; Kurtzman & Robnett, 2013; Zalar *et al.*, 2008).

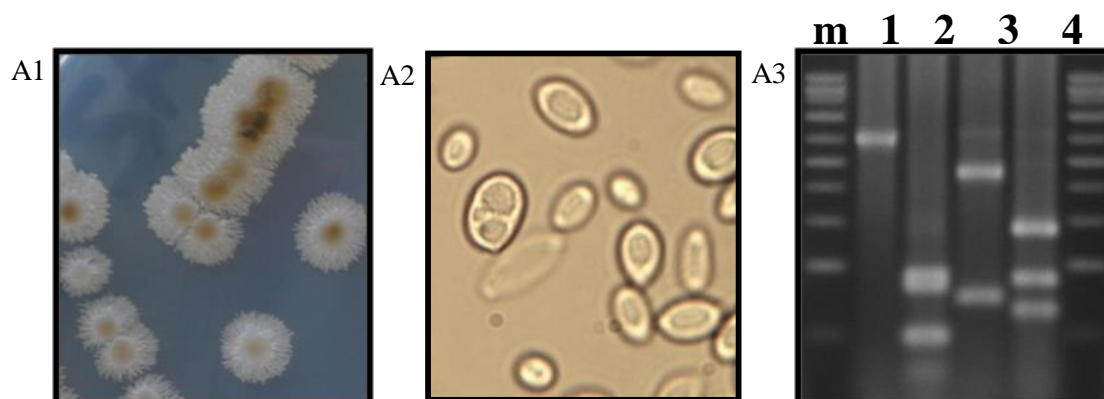


Figura 3.1.2. *Aureobasidium pullulans* (Grupo I). A1) Aspeto macroscópico das colónias. A2) Aspeto microscópico das colónias (x 1000). A3) Perfil de RFLP. 1- Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5,8S rDNA amplificada por PCR; 2- Restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo* I; 3- *Hae* III; 4- *Hinf* I; m- Corresponde às bandas do marcador de DNA..

Tabela 3.1.3. Grupos/perfis de RFLP obtidos a partir da restrição da região ITS-5,8S e identificação correspondente após a comparação das sequências de DNA dos isolados com as presentes no "GenBank" (NCBI) (CBS -"Centraalbureau voor Schimmelcultures", Holanda; DBVPG - "Industrial Yeast Collection", Perugia, Itália; NRRL - "Agricultural Research Culture Collection", EUA; ZIM - "Collection of Industrial Micro-organisms", Ljubljana, Eslovénia).

GRUPOS DE LEVEDURAS ISOLADAS					IDENTIFICAÇÃO		
Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição da região ITS- 5,8S rDNA					Sequenciação do domínio D1/D2 do gene 26S rRNA		
Nº Grupo RFLP	Produto PCR (bp)	Fragmentos de Restrição (bp)			Número de isolados	Isolamento (%)	Espécies / Estirpe tipo / "GenBank" Número de acesso
		<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I			
I	580	170+170+90	450+140	270+170+120	23	5,5	<i>Aureobasidium pullulans</i> / Strain CBS 146.30/ FJ150916
II	620	200+130+130+105+50	410+95+70+50	310	5	1,2	<i>Candida adriatica</i> / Strain ZIM 2334/ HE574661.1
III	750	340+310+100	730	390+195+160	7	1,7	<i>Candida boidinii</i> / Strain NRRL Y-2332/ JQ689009.1
IV	630	295+170+130	420+130+70	315+315	67	16,0	<i>Candida diddensiae</i> / Strain NRRL Y-7589 / U45750.1
V	630	295+295	410+150+90	320+320	1	0,2	<i>Candida friedrichii</i> / strain CBS 4114 / HQ283384
VI	650	600	575+75	325+325	83	19,8	<i>Candida molendinolei</i> / Strain DBVPG 5508/ JN688665
VII	630	295+295	420+140+80	320+320	4	1,0	<i>Candida oleophila</i> / Strain NRRL Y-2317/ U45793.1
VIII	630	295+170+130	420+130+70	315+315	7	1,7	<i>Candida</i> sp.
IX	710	320+200+100	450+200+100	400+310	51	12,1	<i>Citeromyces matritensis</i> / Strain NRRL Y-2407/ EF550346.1
X	550	290+260	375+100	270+270	5	1,2	<i>Cryptococcus</i> sp.
XI	620	300+300	410+140+100	300+300	3	0,7	<i>Debaryomyces hansenii</i> / Strain NRRL Y-7426/ JQ689041.1
XII	500	270+120+90	350+100+60	290+200	18	4,3	<i>Pichia membranifaciens</i> / Strain NRRL Y-2026/ EU057561.1
XIII	660	300+300	400+215	345+215	1	0,2	<i>Cystobasidium</i> sp.
XIV	640	320+240+80	425+215	340+225+75	8	1,9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> / Strain CBS 316 / AF070432.1
XV	850	375+325+150	325+230+170+125	375+365+110	1	0,2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / Strain NRRL Y-12632/ JQ689017.1
XVI	620	600	550+70	220+180+150+70	19	4,5	<i>Sterigmatomyces halophilus</i> / Strain CBS 4609/ AF177416.1
XVII	650	290+280+80	390+115+80	300+190+130	117	27,9	<i>Zygorulasporea mrakii</i> / Strain NRRL Y-12654/ JQ689015.1

O Grupo I de RFLP, formado por 23 isolados foi identificado como *Aureobasidium pullulans* pois as sequências da região D1/D2 obtidas apresentaram uma homologia de 100 % com a estirpe tipo da mesma espécie CBS 146 (número de acesso: FJ150916.1). O Grupo II, com 5 isolados, foi identificado como *Candida adriatica* (Figura 3.1.3), pois as suas sequências apresentaram uma homologia de 99 % com as da estirpe tipo ZIM 2334 (HE574661.1) dessa espécie. O Grupo III incluiu 7 isolados cujas sequências D1/D2 apresentam semelhanças elevadas (99 %) com sequências da estirpe tipo NRRL Y-2332 (JQ689009.1) de *Candida boidinii*. As sequências do Grupo IV (64 isolados) apresentaram 100 % de homologia com a estirpe tipo de *Candida diddensiae* NRRL Y-7589 (U45750.1), enquanto o Grupo V constituído apenas por 1 isolado, apresentou uma homologia de 99 % com a estirpe tipo de *Candida friedrichii* CBS 4114 (HQ283384). As sequências dos 83 isolados do Grupo VI, mostraram uma similaridade de 100 % com a estirpe tipo DBVPG 5508 de *Candida molendinolei* (Figura 3.1.3) (número de acesso: JN688665). As sequências D1/D2 obtidas a partir dos 4 isolados pertencentes ao Grupo VII, foram identificadas como *Candida oleophila*, pois apresentavam uma homologia de 100 % com a estirpe tipo NRRL Y-2317/ U45793.1 dessa espécie (Frutos *et al.*, 2004).

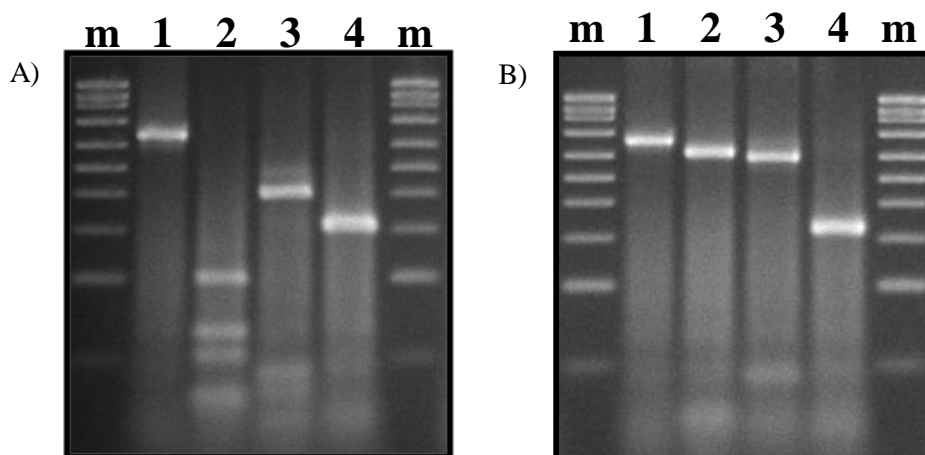


Figura 3.1.3. Exemplos de perfis de RFLP. A) *Candida adriatica* (Grupo II); B) *Candida molendinolei* (Grupo VI). 1- Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5,8S rDNA amplificada por PCR; 2- Restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo* I; 3- *Hae* III; 4- *Hinf* I; m- Corresponde às bandas do marcador de DNA.

Os isolados do Grupo VIII foram designados por *Candida* sp., dado que as suas sequências apresentavam uma homologia acima de 99 % com três espécies diferentes: *Candida vaughaniae* CBS 8583 (HQ283381.1), *Candida diddensiae* NRRL Y-7589 (U45750.1) e *Candida* aff. *naeodendra/diddensiae* (HE863821.1). As sequências obtidas do Grupo IX apresentaram uma similaridade de 98% com a estirpe tipo NRRL Y-2407 de *Citeromyces matritensis* (número de acesso EF550346.1). Os isolados dos Grupos X e XIII foram identificados como *Cryptococcus* sp. e *Cystobasidium* sp., respetivamente, não tendo sido possível identificar as suas espécies. O Grupo XI apresentou apenas três isolados pertencentes à espécie *Debaryomyces hansenii*, que apresentou uma homologia de 100 % com a estirpe tipo NRRL Y-7426 (número de acesso: JQ689041.1), enquanto o Grupo XII incluiu 18 isolados identificados como *Pichia membranifaciens* devido à sua homologia de 98 % com a estirpe tipo NRRL Y-2026 (EU057561.1).

Os Grupos XIV e XV incluíram isolados cujas sequências dos domínios D1/D2 apresentaram 99 % de homologia com as das estirpes tipo de *Rhodotorula mucilaginosa* (CBS 316/ AF070432.1) e de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-12632/ JQ689017.1), respetivamente. As sequências D1/D2 obtidas a partir dos 19 isolados, pertencentes ao grupo XVI, foram identificadas como *Sterigmatomyces halophilus* pois apresentaram uma homologia de 99 % com a estirpe tipo CBS 4609 (AF177416.1) da referida espécie. O último grupo foi constituído por 117 isolados pertencentes à espécie *Zygorulasporea mrakii* pois as suas sequências apresentaram uma similaridade de 100 % com a estirpe tipo NRRL Y-12654 (número de acesso: JQ689015.1) da mesma espécie.

As diferentes espécies de leveduras e as frequências de isolamento obtidas a partir das três fermentações, encontram-se descritas nas tabelas 3.1.4, 3.1.5 e 3.1.6. Em geral, observou-se uma maior diversidade de espécies deste grupo de microrganismos na FB (Azeitona mista: 8 % NaCl).

Na tabela 3.1.4 está representada a sucessão de leveduras no decorrer da fermentação de azeitona verde numa salmoura de 8 % NaCl (FA). A população de leveduras identificadas no segundo dia de fermentação, foi composta por 6 espécies (a frequência de isolamento encontra-se dentro de parêntesis), *C. diddensiae* (50 %), *A. pullulans* (15 %), *C. molendinolei* (15 %), *D. hansenii* (10 %), *S. halophilus* (5 %) e *Cystobasidium* sp. (5 %). A partir do sétimo dia de fermentação, as espécies com baixas percentagens de isolamento, 5 a 10 %, não foram detetadas. *Cryptococcus* sp. (5 %) e *C.*

oleophila (11 %) apenas foram isoladas neste dia, tendo também sido identificada *Cit. matritensis* (21 %) que se manteve até ao dia 49 desta fermentação, com 9 % dos isolados, e *Z. mrakii* (21 %) que foi isolada até ao final da fermentação (6 %). No último dia de fermentação, foram isoladas pela primeira vez a espécie *C. adriatica* (22 %) e um grupo de leveduras designadas por *Candida* sp. (11 %), juntamente com as espécies *C. molendinolei* (44 %), *C. diddensiae* (11 %) e *P. membranifaciens* (6 %). As leveduras dominantes, no decorrer do processo fermentativo de azeitona verde foram as espécies *Z. mrakii*, *C. diddensiae* e *C. molendinolei* (20 a 27 % dos isolados da FA).

Tabela 3.1.4. Espécies identificadas na fermentação A (Azeitona verde – 8 % NaCl), ao longo do processo fermentativo.

Espécies Identificadas	Período de fermentação (dia)										Total (%)
	2		7		21		49		134		
	Número de isolados (NI) e frequência de isolamento (%)										
	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	1	5,0									1,0
<i>Cystobasidium</i> sp.	1	5,0									1,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2	10,0									2,0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	15,0	3	15,8							6,1
<i>Candida diddensiae</i>	10	50,0	3	15,8	4	21,1	2	9,1	2	11,1	21,4
<i>Candida molendinolei</i>	3	15,0	2	10,5	2	10,5	5	22,7	8	44,4	20,4
<i>Zygorulasporea mrakii</i>			4	21,1	11	57,9	10	45,5	1	5,6	26,5
<i>Citeromyces matritensis</i>			4	21,1	2	10,5	2	9,1			8,2
<i>Cryptococcus</i> sp.			1	5,3							1,0
<i>Candida oleophila</i>			2	10,5							2,0
<i>Pichia membranifaciens</i>							3	13,6	1	5,6	4,1
<i>Candida adriatica</i>									4	22,2	4,1
<i>Candida</i> sp.									2	11,1	2,0
Total	20	100	19	100	19	100	22	100	18	100	100

Na tabela 3.1.5 está representada a sucessão de leveduras no decorrer da fermentação de azeitona mista numa salmoura de 8 % NaCl (FB). No segundo dia foi identificada uma população de leveduras, composta por 8 espécies (a frequência de isolamento encontra-se dentro de parêntesis), *S. halophilus* (33 %), *C. diddensiae* (23 %) e *A. pullulans* (23 %), *R. mucilaginosa* (8 %), *Cryptococcus* sp. (5 %), *D. hansenii* (3 %), *C. oleophila* (3 %) e *S. cerevisiae* (3 %). No decorrer do processo, a maioria destas espécies não foram isoladas, com exceção de *C. diddensiae*, que foi isolada até ao final da fermentação. *C. friedrichii* (2 %) apenas foi identificada no sétimo dia de fermentação e, neste dia, foram ainda isoladas espécies que continuaram até ao final da fermentação.

No dia 134 da fermentação, quando esta terminou detetou-se pela primeira vez a espécie *C. adriatica* (22 %) e um grupo de leveduras identificadas por *Candida* sp. (11 %). A restante população foi identificada como *Z. mrakii* (36 %), *C. molendinolei* (33 %), *C. diddensiae* (9 %), *Cit. matritensis* (9 %) e, por fim, *C. boidinii* (2 %) e *P. membranifaciens* (2 %).

Tabela 3.1.5. Espécies identificadas na fermentação B (Azeitona mista – 8 % NaCl) ao longo do processo fermentativo.

Espécies Identificadas	Período de fermentação (dia)										Total (%)
	2		7		21		49		134		
	Número de isolados (NI) e frequência de isolamento (%)										
	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	
<i>Candida oleophila</i>	1	2,6									0,5
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	2,6									0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	2,6									0,5
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	13	33,3									6,0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	7,7	3	6,7							2,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	9	23,1	4	8,9							6,0
<i>Cryptococcus</i> sp.	2	5,1	1	2,2							1,4
<i>Candida diddensiae</i>	9	23,1	13	28,9	7	15,6			4	8,9	15,2
<i>Candida friedrichii</i>			1	2,2							0,5
<i>Candida boidinii</i>			1	2,2	1	2,2			1	2,2	1,4
<i>Candida molendinolei</i>			9	20,0	11	24,4	7	16,3	15	33,3	19,4
<i>Citeromyces matritensis</i>			9	20,0	3	6,7	13	30,2	4	8,9	13,4
<i>Zygorulasporea mrakii</i>			4	8,9	18	40,0	19	44,2	16	35,6	26,3
<i>Pichia membranifaciens</i>					3	6,7	4	9,3	1	2,2	3,7
<i>Candida</i> sp.					2	4,4			3	6,7	2,3
<i>Candida adriatica</i>									1	2,2	0,5
Total	39	100	45	100	45	100	43	100	45	100	100

Na tabela 3.1.6 está representada a sucessão de leveduras no decorrer da fermentação de azeitona mista numa salmoura de 4 % NaCl + 4 % KCl (FC). No início da fermentação, foram identificadas sete espécies de leveduras (a frequência de isolamento encontra-se dentro de parêntesis), *C. diddensiae* (35 %), *S. halophilus* (25 %), *A. pullulans* (15 %), *R. mucilaginosa* (10 %), *Cryptococcus* sp. (5 %), *C. oleophila* (5 %) e *Cit. matritensis* (5 %). Com a progressão da fermentação, a maioria das espécies não foram detetadas com exceção de *C. diddensiae* e *Cit. matritensis*, que foram identificadas até ao final da fermentação. No segundo momento de identificação (dia 7) foram isoladas espécies que se mantiveram até ao final do processo fermentativo, tais como *C. molendinolei*, *Z. mrakii* e *C. boidinii*. A população de leveduras presente no final desta

fermentação foi formada por *C. molendinolei* (35 %) e *Z. mrakii* (35 %), *C. diddensiae* (9 %), *C. boidinii* (9 %), *P. membranifaciens* (9 %) e *Cit. matritensis* (4 %).

Tabela 3.1.6. Espécies identificadas na fermentação C (Azeitona mista – 4 % NaCl + 4 % KCl), ao longo do processo fermentativo.

Espécies Identificadas	Período de fermentação (dia)										Total (%)
	2		7		21		49		134		
	Número de isolados (NI) e frequência de isolamento (%)										
	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	
<i>Candida oleophila</i>	1	5,0									1,0
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	5,0									1,0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	10,0									1,9
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	5	25,0									4,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	15,0	1	5,0							3,8
<i>Citeromyces matritensis</i>	1	5,0	6	30,0	4	20,0	2	9,1	1	4,3	13,3
<i>Candida diddensiae</i>	7	35,0	2	10,0			2	9,1	2	8,7	12,4
<i>Candida molendinolei</i>			3	15,0	5	25,0	5	22,7	8	34,8	20,0
<i>Zygorulaspora mrakii</i>			6	30,0	10	50,0	10	45,5	8	34,8	32,4
<i>Candida boidinii</i>			2	10,0					2	8,7	3,8
<i>Pichia membranifaciens</i>					1	5,0	3	13,6	2	8,7	5,7
Total	20	100	20	100	20	100	22	100	23	100	100

O maior número de espécies isoladas pertence ao filo Ascomycota e aos géneros *Candida*, *Citeromyces*, *Zygorulaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Aureobasidium* e *Debaryomyces*. As espécies restantes, estão incluídas no filo Basidiomycota e pertencem aos géneros *Rhodotorula*, *Sterigmatomyces*, *Cystobasidium* e *Cryptococcus*. Entre as espécies identificadas, *Zygorulaspora mrakii*, *C. molendinolei*, *C. diddensiae* e *Citeromyces matritensis*, foram isoladas mais frequentemente representando, em conjunto, 75,6 % do total de isolados.

Após os primeiros dois ou sete dias, já não era possível isolar leveduras basidiomicetes nas fermentações devido provavelmente, à diminuição da concentração de oxigénio nos fermentadores, uma vez que esses microrganismos são aeróbios. Estes grupos estão frequentemente associados com a filosfera e o solo (Inácio *et al.*, 2005). *R. mucilaginosa* foi identificada na primeira fase das fermentações em estudo, tendo as espécies do mesmo género sido isoladas em azeitona de mesa verdes da cultivar Aloreña (Arroyo-Lopez *et al.*, 2006) e Maçanilha (Alves *et al.*, 2012) e em azeitonas pretas da cultivar Conservolea (Nisiotou *et al.*, 2010). A presença deste género pode, estar relacionada com o amolecimento das azeitonas (Hernández *et al.*, 2008). A espécie A.

pullulans também foi identificada nesta fase da fermentação. É uma levedura ubíqua, não fermentativa, que se encontra no solo, na água e na filosfera. Esta espécie produz variadas enzimas como lipases, proteases, esterases e hemicelulases (Zalar *et al.*, 2008). Este grupo de microrganismos, também foi detetado em diferentes produções de azeitona de mesa na Eslovénia (Valencic *et al.*, 2010), Grécia (Nisiotou *et al.*, 2010) e Portugal (Alves *et al.*, 2012). *C. oleophila* também foi encontrada em fermentações de azeitonas na Eslovénia (Valencic *et al.*, 2010). Outra espécie identificada foi *D. hansenii*, tendo sido já relatada durante a fermentação de azeitona de mesa verde da cultivar Maçanilha em Portugal (Hernández *et al.*, 2007) e em azeitonas pretas da cultivar Conservolea (Nisiotou *et al.*, 2010). Tem sido caracterizada como uma levedura com uma elevada atividade "Killer" e tem sido associada à produção de enzimas que danificam a parede celular das azeitonas (Hernández *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008).

No presente trabalho, a espécie *C. boidinii* apenas foi isolada nas fermentações de azeitona madura com uma frequência de 1 a 4 %, embora tenha sido detetada em elevadas percentagens em azeitonas pretas das variedades Hojiblanca e Conservolea por Arroyo-Lopez *et al.* (2006) e Nisiotou *et al.* (2010), bem como em azeitonas verdes das cultivares Maçanilha (Alves *et al.*, 2012) e Arbequina (Hurtado *et al.*, 2008). De acordo com Rodriguez-Gómez *et al.* (2010) esta espécie mostrou atividade lipolítica, contribuindo para melhorar o sabor de azeitonas através da formação de ácidos gordos livres no fruto. *P. membranifaciens* é uma levedura comum em diferentes fermentações (Arroyo López *et al.*, 2006; Arroyo López *et al.*, 2008; Cotton *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008; Nisioutou *et al.*, 2010; Rodriguez-Gómez *et al.*, 2010) podendo interferir com a capacidade de outras estirpes crescerem na sua proximidade, pois tem a capacidade "Killer" (Marquina *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2011).

A presença de *C. diddensiae* também foi referida por diversos autores na fermentação de azeitona de mesa (Arroyo López *et al.*, 2006; Nisioutou *et al.*, 2010; Hurtado *et al.*, 2008) e, nas fermentações em estudo, pois foi isolada numa frequência de 15 a 21 %, dependendo da fermentação. *C. molendinolei* foi identificada com grande abundância (19-20 %) em todas as fermentações, sendo capaz de assimilar DL-lactato e crescer na presença de concentrações elevadas de NaCl. De acordo com Čadež *et al.* (2012) a espécie *C. adriatica* possui atividade lipolítica. Estas leveduras foram recentemente identificadas como espécies novas isoladas a partir do azeite e dos seus produtos (Čadež *et al.*, 2012). A espécie *Cit. matritensis*, foi isolada numa frequência de

8 a 13 % e é uma levedura que cresce na presença de elevadas concentrações de NaCl. Esta foi descrita em azeitonas francesas (Coton *et al.*, 2006) e portuguesas na cultivar Maçanilha (Alves *et al.*, 2012).

Por último, a levedura dominante ao longo das fermentações (26 a 32 % dos isolados totais em cada fermentação) foi *Z. mrakii* que é uma levedura fermentativa (Kurtzman, 2003) que foi descrita em azeitonas de mesa da cultivar Maçanilha (Alves *et al.*, 2012) e na cultivar Aloreña (Bautista-Gallego *et al.*, 2011a).

3.2. Azeitona Maçanilha Algarvia

3.2.1. Variação da população microbiana nas diferentes fermentações

Foram realizadas cinco fermentações independentes, Fermentação 1: 8 % NaCl, Fermentação 2: 4 % NaCl + 4% KCl, Fermentação 3: 4 % NaCl + 4 % CaCl₂, Fermentação 4: 4 % KCl + 4 % CaCl₂, e Fermentação 5: 2,7 % NaCl + 2,7 % KCl + 2,7 % CaCl₂, respetivamente F1, F2, F3, F4 e F5. Cada fermentação foi realizada em duplicado. As dinâmicas das populações de leveduras e enterobactérias durante a fermentação de azeitona de mesa da cultivar Maçanilha Algarvia em diferentes salmouras, estão representadas nas Figura 3.2.1.

No primeiro dia, quando todas as fermentações foram preparadas, as enterobactérias e leveduras apresentaram contagens de 3,18 Log UFC/g e 3,81 Log UFC/g, respetivamente.

Para cada uma das cinco fermentações, foram estimados alguns parâmetros cinéticos (Tabela 3.2.1), através do ajuste dos resultados obtidos ao modelo de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1994): o período inicial durante o qual não foi detetada qualquer redução/aumento significativo no número de bactérias ("shoulder") (dia); a taxa específica de morte das enterobactérias (dia⁻¹); e o tempo a partir do qual não foram detetadas colónias viáveis de enterobactérias (tmax) (dia). As contagens das leveduras foram realizadas quando esta população já estava na fase estacionária e, por conseguinte, os resultados não puderam ser tratados utilizando o modelo de Baranyi.

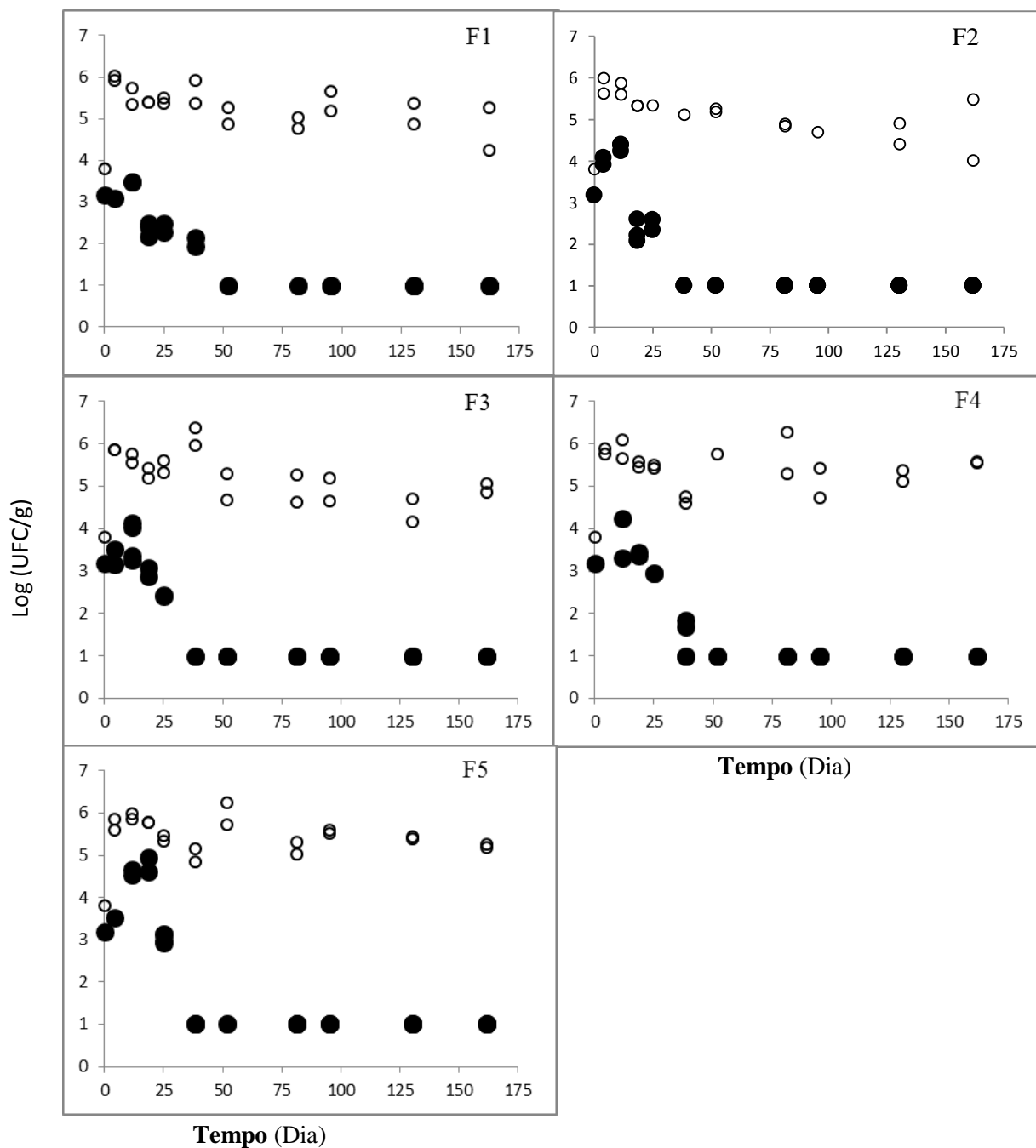


Figura 3.2.1. Crescimento das populações de leveduras (○) e enterobactérias (●) ao longo da fermentação das azeitona verde Maçanilha Algarvia nas cinco salmouras com diferentes combinações de cloretos (F1: 8 % NaCl, F2: 4 % NaCl + 4% KCl, F3: 4 % NaCl + 4 % CaCl₂, F4: 4 % KCl + 4 % CaCl₂, F5: 2,7 % NaCl + 2,7 % KCl + 2,7 % CaCl₂).

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) foram iguais ou superiores a 0,93 e o erro padrão do ajuste do modelo (se) variou de 0,18 a 0,34. O período em que não foi detetada nenhuma redução significativa nas contagens de enterobactérias ("shoulder") variou entre 10,5 a 18,5 dias. Este período foi menor nas salmouras F1 e F2, atingindo o seu valor máximo na F5. Após este período, observou-se uma diminuição da população

de enterobactérias, caracterizada por taxas específicas de morte de $-0,049 \pm 0,005$, $-0,119 \pm 0,047$, $-0,100 \pm 0,009$, $-0,104 \pm 0,0083$ e $-0,154 \pm 0,015 \text{ dia}^{-1}$ nas fermentações 1, 2, 3, 4 e 5, respetivamente. Após $53,8 \pm 2,95$ (F1), $35,2 \pm 5,75$ (F2), $38,7 \pm 1,30$ (F3), $42,4 \pm 1,26$ (F4) e $38,9 \pm 1,05$ (F5) dias de fermentação, não foram detetadas enterobactérias viáveis ($< 1 \text{ Log UFC/g}$) até ao final dos processos, em todos os fermentadores. A presença de cloretos de potássio e de cálcio nas salmouras, causou um aumento na taxa de morte da população de enterobactérias, tendo sido mais elevada nas azeitonas fermentadas na salmoura da fermentação 5. Além disso, o tempo a partir do qual não foram detetadas colónias viáveis de enterobactérias (t_{max}), foi consideravelmente maior na salmoura da 1, seguida de todas as outras salmouras. Panagou *et al.* (2011) também observaram uma redução na sobrevivência dessas bactérias Gram-negativas na salmoura contendo as diferentes misturas de cloretos, em comparação com o controlo (8 % de NaCl). Bautista-Gallego *et al.* (2010 e 2011b) relataram que, em azeitonas de mesa Manzanilla-Aloreña e Gordal, respetivamente, o crescimento global de enterobactérias diminuiu na presença de CaCl_2 e aumentou com concentrações de NaCl e KCl. Não foram detetadas colónias de *E. coli* ao longo do estudo em qualquer das fermentações. Na verdade, a persistência de enterobactérias no processo de fermentação deve ser o mais curto possível, uma vez que estes microrganismos podem desenvolver problemas de deterioração nas azeitonas de mesa. Para além disso, a presença de *E. coli* é indicador de higiene deficiente.

Tabela 3.2.1. Parâmetros cinéticos (\pm desvio padrão) obtidos pelo ajuste dos dados de sobrevivência de enterobactérias ao modelo Baranyi (R^2 - coeficiente de determinação, se -erro padrão do ajuste do modelo, taxa específica de morte/declínio dos microrganismos (dia^{-1}), t_{max} -tempo a partir do qual não foram detetadas colónias viáveis de enterobactérias).

	F1	F 2	F 3	F 4	F 5
Parâmetros	8 % NaCl	4 % NaCl 4 % KCl	4 % NaCl 4 % CaCl_2	4 % KCl 4 % CaCl_2	2,7% NaCl 2,7 % KCl 2,7 % CaCl_2
R^2	0,94	0,93	0,97	0,95	0,95
se (fit)	0,21	0,34	0,18	0,20	0,29
"Shoulder" (dia)	$10,5 \pm 3,71$	$11,5 \pm 4,24$	$13,5 \pm 1,59$	$17,8 \pm 1,65$	$18,5 \pm 1,74$
Taxa específica de morte (dia^{-1})	$-0,049 \pm 0,005$	$-0,119 \pm 0,047$	$-0,1 \pm 0,009$	$-0,104 \pm 0,0083$	$-0,154 \pm 0,015$
t_{max} (dia)	$53,8 \pm 2,95$	$35,2 \pm 5,75$	$38,7 \pm 1,30$	$42,4 \pm 1,26$	$38,9 \pm 1,05$

No caso das leveduras, o seu crescimento não foi afetado pelas diferentes condições de fermentação, uma vez que apresentam um padrão de crescimento semelhante nas 5 fermentações. A população de leveduras, no quarto dia de fermentação,

aumentou para os níveis máximos de $5,97 \pm 0,10$ (F1), $5,81 \pm 0,25$ (F2), $5,87 \pm 0,07$ (F3), $5,83 \pm 0,15$ (F4) e $5,72 \pm 0,16$ (F5) Log UFC/g, tendo-se seguido uma fase estacionária e uma ligeira diminuição da população até ao final dos processos quando se obtiveram os números de $4,75 \pm 0,78$, $4,75 \pm 1,04$, $4,96 \pm 0,14$, $5,57 \pm 0,02$ e $5,22 \pm 0,06$ Log UFC/g, F1 a F5, respetivamente. Nas fermentações estudadas, a presença de cálcio não favoreceu o crescimento de leveduras como relatado por Bautista-Gallego *et al.* (2010 e 2011b) em azeitonas de mesa Manzanilha-Aloreña e Gordal, respetivamente.

As leveduras parecem ser as principais responsáveis pelas fermentações naturais de azeitonas de mesa verdes, como referido por Alves *et al.* (2012), sendo que as BAL não foram detetadas durante os processos de produção. A ausência destes microrganismos em azeitona de mesa já foi explicada anteriormente.

3.2.2. Qualidade e segurança microbiológica

A redução do sal ou a sua substituição por outros sais, podem ter graves implicações na segurança alimentar e deterioração dos alimentos, dependendo da constituição do produto alimentar e do seu processamento. Assim, qualquer modificação que consista na substituição total ou parcial de NaCl com outros cloretos, deve ser complementada por um estudo das características microbiológicas do produto final. Neste contexto, no final da fermentação, as azeitonas produzidas foram caracterizadas em relação aos parâmetros de segurança microbiológica, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. Além disso, a presença de *Pseudomonas* sp., enterobactérias, *E. coli*, BAL, leveduras e *S. aureus* foram também enumerados no produto final (Tabela 3.2.1). A microbiota predominante foram as leveduras, não tendo sido encontradas BAL, enterobactérias, *Pseudomonas*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* nas azeitonas de mesa produzidas em salmouras com diferentes misturas de sais de cloreto. De acordo com o regulamento da Comissão Europeia (EC, 2005; EC, 2007), as azeitonas de mesa produzidas cumpriram os critérios microbiológicos de segurança alimentar.

Tabela 3.2.2. Resultados dos parâmetros de higiene e segurança microbiológica (Log UFC/g) nas azeitona da cultivar Maçanilha (ND- Não detetado).

	F1	F2	F3	F4	F5
Microrganismos	8 % NaCl	4 % NaCl 4 % KCl	4 % NaCl 4 % CaCl ₂	4 % KCl 4 % CaCl ₂	2,7% NaCl 2,7 % KCl 2,7 % CaCl ₂
Leveduras	4,75 ± 0,78	4,75 ± 1,04	4,96 ± 0,14	5,57 ± 0,02	5,22 ± 0,06
Bolores	<1	<1	<1	<1	<1
Enterobactérias	<1	<1	<1	<1	<1
BAL	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Pseudomonas</i> sp.	<1	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	<1	<1	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i>	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Salmonella</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	ND

3.2.3. Identificação de leveduras

Os diferentes isolados de leveduras recolhidos no final das fermentações, foram inicialmente agrupados em 11 perfis de RFLP da região ITS-5,8S rDNA (Tabela 3.2.3). Em seguida, identificou-se um número representativo de leveduras em cada grupo de RFLP, recorrendo à análise das sequências de DNA dos domínios D1/D2 do gene do rRNA 26S (Tabela 3.2.2).

O Grupo I de RFLP, formado por 32 isolados, foi identificado como *C. boidinii* pois as sequências de DNA da região D1/D2 obtidas apresentaram uma homologia de 100 % com a estirpe tipo dessa espécie NRRL Y-2332 (número de acesso: JQ689009.1). O Grupo II apresentou apenas um isolado pertencente à espécie *C. diddensiae*, enquanto o Grupo III incluiu dois isolados identificados como *C. molendinolei*, devido às semelhanças elevadas (99 %) das suas sequências com as estirpes tipo correspondentes. As sequências do Grupo IV apresentaram 99 % de homologia com a espécie *Galactomyces geotrichum* (*Geotrichum candidum*).

Tabela 3.2.3. Grupos/perfis de RFLP obtidos a partir da restrição da região ITS-5,8S rDNA de 100 isolados de leveduras e identificação correspondente após comparação das sequências de DNA dos isolados com as presentes no GenBank (NCBI) (As estirpes utilizadas nas comparações são estirpes tipo, com exceção do JN974268.1 e U45743.1; ATCC - "American Type Culture Collection", EUA; CBS - "Centraalbureau voor Schimmelcultures", Holanda; DBVPG - "Industrial Yeast Collection", Perugia, Itália; NRRL - "Agricultural Research Culture Collection", EUA).

GRUPOS DE LEVEDURAS ISOLADAS					IDENTIFICAÇÃO		
Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição da região ITS- 5,8S rDNA					Sequenciação do domínio D1/D2 do gene 26S rRNA		
Nº Grupo RFLP	Produto PCR (bp)	Fragmentos de Restrição (bp)			Número de isolados	Isolamento (%)	Espécies / Estirpe tipo / GenBank Número de acesso
		<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I			
I	750	350+310+90	700	390+190+160	32	32	<i>Candida boidinii</i> / Strain NRRL Y-2332/ JQ689009.1
II	630	290+170+130	420+130+90	310+310	1	1	<i>Candida diddensiae</i> / Strain NRRL Y-7589 / U45750
III	650	600	580	325+325	2	2	<i>Candida molendinolei</i> / Strain DBVPG 5508/ JN688665
IV	380	370	360	100+120+160	24	24	<i>Galactomyces geotrichum</i> / Strain CBS 607.85/ JN974268.1
V	620	300+280+50	120+400+90	300+320	1	1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> / Strain NRRL Y-2075/ JQ689047.1
VI	500	175+110+90+75	330+90+50	275+200	24	24	<i>Pichia membranifaciens</i> / Strain NRRL Y-2026/ EU057561
VII	650	300+300	420+150+90	325+325	3	3	<i>Priceomyces carsonii</i> / Strain NRRL YB-4275/ U45743.1
VIII	850	380+320+150	330+230+170+120	380+360+110	4	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / Strain NRRL Y-12632/ JQ689017.1
IX	650	290+280+80	390+115+80	300+190+130	1	1	<i>Zygoascus hellenicus</i> / Strain NRRL Y-7136/ JQ689060.1
X	660	300+300	400+100+80	320+190+120	6	4	<i>Zygorulasporea mrakii</i> / Strain NRRL Y-12654/ JQ689015.1
XI	650	600	580	325+325	2	2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> / Strain NRRL Y-366/ EF550341.1

O Grupo V incluiu apenas um isolado identificado como *Meyerozyma guilliermondii*, devido à sua homologia de 99 % com a estirpe tipo NRRL Y-2075 (número de acesso JQ689047.1) da mesma espécie e as sequências dos isolados do Grupo VI mostraram uma similaridade de 100 % com a estirpe tipo NRRL Y-2026 de *P. membranifaciens* (número de acesso: EU057561). As sequências D1/D2 obtidas a partir dos isolados pertencentes aos Grupos VII e VIII, apresentaram 99 % de similaridade com a estirpe NRRL YB-4275 de *Priceomyces carsonii* (número de acesso U45743.1) e com *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe NRRL Y-12632, JQ689017. 1), respetivamente. As sequências isoladas do Grupo X apresentaram uma similaridade de 98 % com a estirpe tipo NRRL Y-12654 de *Z. mrakii* (número de acesso JQ689015.1). Os Grupos IX e XI incluíram isolados cujas sequências dos domínios D1/D2 apresentaram 99 % de homologia com as estirpes tipo de *Zygoascus hellenicus* (NRRL Y-7136/JQ689060.1) e de *Wickerhamomyces anomalus* (NRRL Y-366/EF550341.1), respetivamente.

A população de leveduras isoladas nas cinco fermentações e a frequência de isolamento cada espécie em cada salmoura encontram-se resumidos na tabela 3.2.4.

Tabela 3.2.4. Espécies de leveduras identificadas nas azeitonas de mesa de cultivar Maçanilha e

Espécies	F1		F2		F3		F4		F5		Total (%)	
	8 % NaCl		4 % NaCl	4 % KCl	4 % NaCl	4 % CaCl ₂	4 % KCl	4 % CaCl ₂	2,7 % NaCl	2,7 % KCl		2,7 % CaCl ₂
	Número de isolados (NI) e frequência de isolamento (%)											
	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%		
<i>Pichia membranifaciens</i>	5	25,0	5	26,3	3	14,3	4	21,1	7	33,3	24	
<i>Candida boidinii</i>	4	20,0	7	36,8	7	33,3	8	42,1	6	28,6	32	
<i>Galactomyces geotrichum</i>	4	20,0	1	5,3	5	23,8	6	31,6	8	38,1	24	
<i>Zygorhizula mrakii</i>	3	15,0	2	10,5	1	4,8					6	
<i>Priceomyces carsonii</i>	2	10,0	1	5,3							3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	5,0	1	5,3	2	9,5					4	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	5,0									1	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			2	10,5							2	
<i>Zygoascus hellenicus</i>					1	4,8					1	
<i>Candida molendinolei</i>					2	9,5					2	
<i>Candida diddensiae</i>							1	5,3			1	
Total	20	100,0	19	100,0	21	100,0	19	100,0	21	100,0	100	

Nas azeitonas de mesa produzidas na salmoura de 8 % de NaCl, foram isoladas sete espécies diferentes de leveduras (frequência de isolamento mostra-se entre parêntesis): *P. membranifaciens* (25 %), *C. boidinii* (20 %), *G. geotrichum* (20 %), *Z. mrakii* (15 %), *P. carsonii* (10 %), *S. cerevisiae* (5 %) e *M. guilliermondii* (5 %). Na

fermentação com 4 % de NaCl e 4% de KCl, foi identificado o mesmo número de espécies com exceção de *M. guilliermondii*. Nesta fermentação, foram encontrados dois isolados de *W. anomalus*.

As leveduras *Zy. hellenicus* e *C. molendinolei* foram identificadas em baixas frequências (4,8 e 9,5 %, respetivamente), nas azeitonas produzidas na salmoura F3, para além das espécies *P. membranifaciens*, *C. boidinii*, *G. geotrichum*, *Z. mrakii* e *S. cerevisiae*.

P. membranifaciens, *C. boidinii* e *G. geotrichum* foram as espécies predominantes em azeitonas produzidas na F4 (4 % de KCl; 4 % de CaCl₂) e na F5 (2,7 % de NaCl; 2,7 % de KCl; 2,7 % de CaCl₂). A espécie *G. geotrichum* foi encontrada na salmoura contendo os três sais tendo atingido a sua maior frequência nesta fermentação (38,1 %). Não foram detetadas outras leveduras exceto um isolado de *C. diddensiae*, que também foi identificado na F4. Os resultados apresentados mostram que a utilização de diferentes misturas de sais nas salmouras afetou a população final de leveduras das azeitonas, ao contrário dos resultados de Bautista-Gallego *et al.* (2011c). Estes resultados foram obtidos em azeitonas de mesa tratadas (tipo Espanhol), enquanto os resultados apresentados no presente trabalho foram obtidos em azeitonas naturais da cultivar Maçanilha Algarvia. Trata-se de diferentes formas de processamento: as azeitonas tratadas (método Espanhol) incluem um tratamento com NaOH, enquanto as azeitonas naturais são imediatamente imersas nas salmouras sem quaisquer tratamentos.

As principais espécies identificadas no final das cinco fermentações, *P. membranifaciens* (24 %), *C. boidinii* (32 %) e *G. geotrichum* (24 %), fazem parte do grupo de leveduras descrito nas salmouras de azeitonas verdes estudadas por Arroyo Lopez *et al.* (2008). As espécies seguintes mais representativas foram *Z. mrakii* (6 %), que foi identificada no trabalho de Alves *et al.* (2012) e *S. cerevisiae* (4 %), que também é uma espécie comum em azeitonas de mesa espanholas (Arroyo-López *et al.*, 2006), gregas (Nisioutou *et al.*, 2010), italianas (Tofalo *et al.*, 2013) e nas cultivares portuguesas (Alves *et al.*, 2012, Pereira *et al.*, 2015). *G. geotrichum* é um fungo geralmente isolado do solo, ar, água, leite, forragem, tecidos vegetais e queijo. Esta espécie foi identificada em fermentações de azeitonas de mesa mas também é muito utilizada na maturação do queijo. Até agora, não foram descritos quaisquer problemas de segurança associados à sua utilização como "starter" no queijo (Pottier *et al.*, 2008).

Outras espécies de leveduras foram detetadas em percentagens menores: *P. carsonii*, *M. guilliermondii*, *W. anomalus*, *Zy. hellenicus*, *C. molendinolei* e *C. diddensiae*. Enquanto *M. guilliermondii*, *W. anomalus*, e *C. diddensiae* têm sido associados à fermentação de azeitona por diversos autores (Arroyo López *et al.*, 2006; Nisioutou *et al.*, 2010). *C. molendinolei* foi recentemente identificada como uma nova espécie isolada a partir do azeite e dos seus produtos, sendo capaz de assimilar DL-lactato e crescer na presença de concentrações elevadas de NaCl (Čadež *et al.*, 2012). Por outro lado, *Zy. hellenicus* foi encontrada em azeitonas pretas (Coton *et al.*, 2006) e *P. carsonii* foi descrita na fermentação das uvas (Francesca *et al.*, 2014). As espécies do género *Zygoascus* foram recentemente descritas em azeitonas de mesa gregas (Grounta *et al.*, 2015).

As espécies identificadas possuem, certamente, importantes atividades tecnológicas, que podem interferir no processo de fermentação e nas características dos produtos finais. Por exemplo, *P. membranifaciens* tem capacidade "killer", ou seja, interfere com a capacidade de outras estirpes crescerem na sua proximidade (Marquina *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2011). De acordo Bautista-Gallego *et al.* (2011a) e Hernández *et al.* (2007) os isolados de *C. boidinii* parecem possuir atividades lipolítica e esterásica, enquanto as leveduras *W. anomalus* e *C. diddensiae* possuem atividades β -glicosidásica e esterásica que têm sido relacionados com a melhoria das características organoléticas de azeitonas de mesa. As leveduras *W. anomalus* e *Pichia guilliermondii*, foram consideradas interessantes para serem incluídas como "starters" na indústria de azeitona de mesa grega, devido às suas características fisiológicas (Bonatsou *et al.*, 2015). Outro aspeto importante é a ação antioxidante de leveduras que apresentam atividade catalásica, tais como *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens* e *W. anomalus*, que também é considerada benéfica na produção de azeitona de mesa (Arroyo-Lopez *et al.*, 2012).

A presença de CaCl₂ e KCl nas salmouras teve um forte efeito na redução da diversidade de espécies de leveduras isoladas a partir das azeitonas (para além da redução causada na população enterobactérias), o que pode ter um impacto sobre as características organoléticas das azeitonas de mesa. As várias populações de leveduras que ocorreram nas cinco fermentações, resultaram das condições desenvolvidas no decorrer dos processos e das diferentes sucessões microbianas que ocorreram em cada processo. Estas diferenças podem afetar as características organoléticas das azeitonas de mesa assim como interferir na sua qualidade final. No entanto, seria necessário um estudo mais detalhado

que incluísse a análise sensorial das azeitonas de mesa produzidas, para completar e melhorar este trabalho.

Os resultados obtidos no presente subcapítulo (3.2) foram publicados no artigo (Anexo I): Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., Quintas, C. (2016). The effect of reduction in the microbiological quality of craked green table olives of the maçanilha algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 57-65. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.008).

Conclusão



4. Conclusão

As azeitonas das cultivares Cobrançosa e Maçanilha Algarvia estão incluídas na categoria de “azeitonas naturais” as quais dependem de uma fermentação natural levada a cabo pela microbiota presente no fruto, no sal, no equipamento e no ambiente. O grupo das leveduras apresentou-se como o grupo dominante neste tipo de fermentações.

O estudo dos processos fermentativos naturais de azeitonas verdes e mistas da cultivar Cobrançosa e a substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio e/ou cloreto de cálcio nas salmouras das fermentações de azeitona verde da cultivar Maçanilha Algarvia e de cloreto de sódio por cloreto de potássio na fermentação de azeitona mista da cultivar Cobrançosa, resultaram em processos fermentativos naturais bem-sucedidos e em produtos finais com excelente qualidade microbiológica que preenchem os critérios microbiológicos de higiene e segurança alimentar. Não foram detetadas bactérias das espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* nem dos géneros *Pseudomonas* e *Salmonella* em nenhuma das azeitonas de mesa produzidas.

O estado de maturação das azeitonas da cultivar Cobrançosa influenciou a taxa específica de crescimento das leveduras e dos microrganismos mesófilos, a qual foi superior na fermentação de azeitonas mistas em comparação com a fermentação de azeitonas verdes.

O cloreto de potássio não afetou o crescimento das leveduras, apenas causou uma diminuição de diversidade de espécies de leveduras ao longo do processo fermentativo de azeitonas da cultivar Cobrançosa.

As espécies de leveduras dominantes ao longo de todas as fermentações de azeitona da cultivar Cobrançosa foram *Zygorhizula* *mrakii*, *Candida molendinolei*, *Candida diddensiae* e *Citeromyces matritensis*. A presença de leveduras associadas à produção vigorosa de gás no final dos processos fermentativos, tais como as referidas anteriormente, pode condicionar a embalagem e o tempo de vida útil do produto final.

Nas fermentações de azeitona da cultivar Maçanilha Algarvia, a presença de diferentes cloretos nas salmouras, aumentou a taxa de morte de enterobactérias. No entanto, não afetou de forma significativa o crescimento de leveduras. Embora a dinâmica

de crescimento da população de leveduras não tenha sido visivelmente alterada, em algumas salmouras causou uma diminuição na diversidade de espécies encontradas na fase final das fermentações. As azeitonas produzidas nas salmouras de 8 % de NaCl, 4 % de NaCl + 4 % de KCl, 4 % NaCl + 4 % de CaCl₂, apresentaram a maior diversidade de leveduras enquanto nas fermentações que ocorreram nas salmouras de 4 % de KCl + 4 % de CaCl₂, e 2,7 % de NaCl + 2,7 % KCl + 2,7 % de CaCl₂ as leveduras dominantes foram *Pichia membranifaciens*, *Candida boidinii*, *Galactomyces geotrichum*. As características da população de leveduras apresentadas podem ter consequências na qualidade organolética do produto final.

4.1. Perspetivas futuras

A azeitona de mesa é um produto natural, incluído no padrão alimentar da Dieta Mediterrânica. O efeito da substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio no processo de produção de azeitona de mesa das cultivares Cobrançosa e Maçanilha Algarvia, pode contribuir para melhorar a imagem da azeitona de mesa, pois contribui para baixar a quantidade de sódio no produto final. Contudo, são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento sobre este produto e viabilizar a sua comercialização, tais como:

- Realizar um “scale up” da fermentação de azeitona da cultivar Cobrançosa, a nível industrial, com vista à produção de azeitona de mesa com baixo teor de sal, utilizando salmouras constituídas por NaCl e KCl.
- Realizar um “scale up” da fermentação de azeitona da cultivar Maçanilha Algarvia, a nível industrial, com vista à produção de azeitona de mesa com baixo teor de sal, utilizando salmouras constituídas por NaCl, KCl e CaCl₂.
- Estudar o efeito da presença de outros sais na salmoura de fermentação e de armazenamento (cloreto de magnésio e cloreto de zinco) nas cultivares Cobrançosa e Maçanilha Algarvia.
- Estudar o efeito das fermentações em salmouras com diferentes concentrações de sais nos perfis organoléticos e na textura da azeitona de mesa produzida.
- Estudar as propriedades tecnológicas e probióticas dos principais grupos de leveduras isoladas das diferentes fermentações.

Referências Bibliográficas



5. Referências Bibliográficas

- Alves, M., C. (2010). Produção industrial de azeitona verde no Algarve: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos. *Dissertação de Mestrado*. Universidade do Algarve. Faro.
- Alves, M., Gonçalves, T. & Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives fermentations. *Food Control*, 23 (2), 363–368.
- Alves, M., Esteves, E. & Quintas, C. (2015). Effect of preservatives and acidifying agents on the shelf life of packed cracked green table olives from Maçanilha cultivar. *Food Packaging and Shelf Life*, 5, 32–40.
- 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.
- Andrikopoulos, N. & Boskou G. (2010). In vivo and in vitro antioxidant and antitumoral activity of table olives. *III Congreso Internacional de la Aceituna de mesa*. Fundación para el Fomento y Promoción de la Aceituna de Mesa. Sanlúcar la Mayor.
- Aponte, M., Venterino, V.; Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C.M. & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, 27, 162 - 170.
- Argyri, A. a, Lyra, E., Panagou, E. Z. & Tassou, C. C. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiology*, 36 (1), 1–6.
- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A. & Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23 (8), 791–6.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J. & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (2), 189–96.
- Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A. & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160, 42-49.
- Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S. & Serra-Majem, L. (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, 14 (12A), 2274–84.

- Baranyi, J. & Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C. & Garrido-Fernández, A. (2010). Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. *Food Microbiology*, 27 (3), 403–12.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., López-López, A. & Garrido-Fernández, A. (2011b). Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (1), 120–129.
- Bautista Gallego, J., Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Rodríguez Gómez, F., García García, P. & Garrido Fernández, A. (2011c). Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 28 (7), 1316–1325.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A. & Arroyo-López, F. N. (2011a). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (2), 89–96.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R. & Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers Microbiology*, 3:194.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105 (5), 229–242.
- Bonatsou, S., Benitez, A., Rodriguez-Gómez, F., Panagou, E.Z. & Arroyo-López, F.N., (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.
- Borges, A., M., R. (2013). Evolução da população microbiana ao longo do processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.
- Botta, C. & Cocolin, L. (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and independent approaches. *Frontiers Microbiology*, 3, 1–10.
- Brenes, M. (2010). Sustancias con propiedades biológicas en 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.
- Cabezas, J. M. E. (n.d.). La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. *Fundación para el Fomento y Promoción de la Aceituna de Mesa*.

- Čadež, N., Raspor, P., Turchetti, B., Cardinali, G., Ciafardini, G., Veneziani, G. & Peter, G. (2012). *Candida adriatica* sp nov. and *Candida molendinolei* sp nov., two yeast species isolated from olive oil and its by-products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2296-2302.
- Cardoso, S. M., Mafra, I., Reis, A., Nunes, C., Saraiva, J. a., & Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (1), 153–160.
- Charoenprasert, S. & Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (29), 7081–95.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Botta, C., Gorra, R., De Filippis, F., Ercolini D. & Rantsiou, K. (2013). NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLoS ONE*, 8 (7), e69074.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2004). Trade Standard Applying to Table Olives. International Olive Oil Council. COI/OT/NC n° 1, Dezembro de 2004.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S. & Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135.
- Dabbou, S., Issaoui, M., Brahmi, F., Nakbi, A., Chehab, H., Mechri, B. & Hammami, M. (2012). Changes in Volatile Compounds During Processing of Tunisian-Style Table Olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 347–354.
- Esposito, K., Maiorino, M. I., Ceriello, A. & Giugliano, D. (2010). Prevention and control of type 2 diabetes by Mediterranean diet: a systematic review. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 89 (2), 97–102.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & 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.
- European Commission (EC), (2005). Regulation 2073/2005. *EU Official Journal*, 15/11/2005, L.338, p.1-26.
- European Commission (EC), (2007). Regulation 1441/2007. *EU Official Journal*, 5/12/2007, L.322, p.1-12.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1351–1371.
- Fernández, A. G., Díez, M. J. F. & Adams, M. R. (1997). Table olives. Production and processing. *Chapman & Hall*. London, UK.

- Francesca, N., Romano, R., Sannino, C., Le Grottaglie, L., Settanni, L. & Moschetti, G., (2014). Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 84-93.
- Frutos, R. L., M. Fernández-Espinar, T. & Querol, A. (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, 175 – 185.
- Galanakis, C. M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (4), 175–184.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H. & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)- A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291–3340.
- Graça, P. (2013). Relatório. Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal. *Direção Geral de Saúde*. Ministério de Saúde, 1-27.
- Grounta, A., Nychas, G.-J. E. & Panagou, E. Z. (2013). Survival of food-borne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 161 (3), 197–202.
- Grounta, A., Doulgeraki, A. I. & Panagou, E. Z. (2015). Quantification and characterization of microbial biofilm community attached on the surface of fermentation vessels used in green table olive processing. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 41-48.
- Hammami, S. B. M., Manrique, T. & Rapoport, H. F. (2011). Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae*, 130 (2), 445–451.
- He, F. J. & MacGregor, G. A. (2009). A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programs. *Journal of Human Hypertension*, 23, 363-384.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F. & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24 (4), 346–351.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E. & Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178-88.
- Huang, C. L. & Sumpio, B. E. (2008). Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, 207 (3), 407–16.

- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A. & Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*. 41 (7), 738–744.
- Hutkins, R. W. (2006). Microbiology and TechnoLOGY of Fermented Foods. *Blackwell Publishing*.
- Inácio, J., Portugal, L., Spencer-Martins, I. & Fonseca, Á. (2005). Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Research*, 5, 1167–1183.
- INE- Instituto Nacional de Estatística (2014). Estatísticas Agrícolas 2013. Acedido em: www.ine.pt.
- Kanavouras, B. A., Gazouli, M., Leonidas, L. T. & Petrakis, C. (2005). Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, 56, 106–115.
- Kurtzman, C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research*, 4 (3), 233-245.
- Kurtzman, C. P. & 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 (4), 331-371.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. & Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8 (6), 939-954.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (2013). Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research*, 13 (1), 23-33.
- Leitão, F., Potes, M. F., Calado, M. L. & Almeida, F.J. (1986). Descrição de 22 variedades de Oliveira cultivadas em Portugal. Resopal, *Direcção-Geral de Planeamento e Agricultura*, Lisboa.
- López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E., De Caterina R., Badimón L., Covas M.I., Escrich E., Ordovás J.M., Soriguer F., Abiá R., De la Lastra C.A., Battino M., Corella D., Chamorro-Quirós J., Delgado-Lista J., Giugliano D., Esposito K., Estruch R., Fernandez-Real J.M., Gaforio J.J., La Vecchia C., Lairon D., López-Segura F., Mata P., Menéndez J.A., Muriana F.J., Osada J., Panagiotakos D.B., Paniagua J.A., Pérez-Martínez P., Perona J., Peinado M.A., Pineda-Priego M., Poulsen H.E., Quiles J.L., Ramírez-Tortosa M.C., Ruano J., Serra-Majem L., Solá R., Solanas M., Solfrizzi V., De la Torre-Fornell R., Trichopoulou A., Uceda M., Villalba-Montoro J.M., Villar-Ortiz J.R., Visioli F. & Yiannakouris N. (2010). Olive oil and health: summary of the II international conference on olive

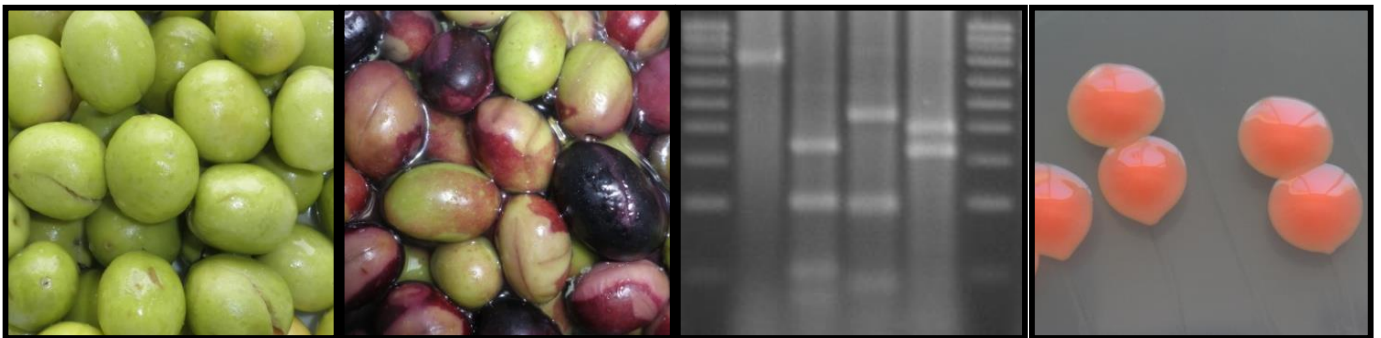
- oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 20 (4), 284–94.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. & Spencer Martins, I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14, 279-283.
- Marsilio, V., Campestre, C., & Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74(1), 55–60.
- Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., Quintas, C. (2016). The effect of reduction in the microbiological quality of craked green table olives of the maçanilha algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 57-65.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., Ramírez, E. & de Castro, A. (2013). Survival of foodborne pathogenic bacteria in table olive brines. *Food Control*, 34 (2), 719–724.
- Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M. & García, A. (2008). Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*, 110, 932-937.
- Montaño, A., Sánchez, A. H., Casado, F. J., de Castro, A. & Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82 (2), 297–302.
- Moreno-Baquero, J. M., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A. & López-López, A. (2013). Mineral and sensory profile of seasoned cracked olives packed in diverse salt mixtures. *Food Chemistry*, 138 (1), 1–8.
- Muccilli, S., Caggia, C., Randazzo, C. L. & Restuccia, C. (2011). Yeast dynamics during the fermentation of brined green olives treated in the field with kaolin and Bordeaux mixture to control the olive fruit fly. *International Journal of Food Microbiology*, 148 (1), 15–22.
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E. & Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 396-405.
- Nogueira, F., A., M. (2012) Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos. *Dissertação de mestrado*. Instituto Politécnico de Bragança.
- Norma BS ISO 15214:1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C.
- Norma ISO 11290-1:1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 1. Detection method.

- Norma Portuguesa (NP) 3034. (2012). Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Norma UNE-EN ISO 6579:2002 – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection of *Salmonella* spp.
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W. & 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 (3), 173–177.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S. & Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of "Galega" Portuguese variety. *Grasas Y Aceites*, 55 (3), 219–226.
- Othman, N.B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chetoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662–669.
- Panagiotakos, D. B., Miliatis, G. a, Pitsavos, C. & Stefanadis, C. (2006). MedDietScore: a computer program that evaluates the adherence to the Mediterranean dietary pattern and its relation to cardiovascular disease risk. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 83 (1), 73–7.
- Panagou, E. Z. & 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 (2), 199–204.
- Panagou, E. Z., Hondrodimitou, O., Mallouchos, A. & Nychas, G.-J. E. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, 28 (7), 1301–7.
- Panagou, E. Z., Nychas, G. E. & Sofos, J. N. (2013). Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control*, 29 (1), 32–41.
- Parinos, C. S., Stalikas, C. D., Giannopoulos, T. S. & Pilidis, G. a. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, 145 (1-2), 339–43.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. & Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (22), 8425–31.
- Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A. & Estevinho, M. L. (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (8), 2895–902.

- Pereira, E.L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J.A. & Baptista, P. (2015). YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiology*, 46, 582-586.
- Piga, A., Del Caro, A., Pinna, I. & Agabbio, M. (2005). Anthocyanin and colour evolution in naturally black table olives during anaerobic processing. *LWT - Food Science and Technology*, 38 (4), 425-429.
- Pinheiro, P. B. M. & Esteves da Silva, J. C. G. (2005). Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L. *Analytica Chimica Acta*, 544 (1-2), 229-235.
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.P. & Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 327-332.
- Rodrigues, N., M., S., F. (2011). Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve. *Dissertação de Mestrado*. Universidade do Algarve. Faro.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J. & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27 (5), 604-12.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A. & García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, 46 (1), 56-63.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A. & Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (3), 479-84.
- Saúde, C., E., V., C. (2010). Azeitona de mesa natural da cultivar Maçanilha com baixo teor de cloreto de sódio. *Dissertação de Mestrado*. Universidade do Algarve. Faro.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C. & Malcata, F.X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1349-1354.
- Tassou, C. C., Panagou, E. Z. & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19 (6), 605-615.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G. & Corsetti, A. (2012). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102 (1), 121-31.

- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G. & Corsetti, A. (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161 (3), 203–8.
- Tuck, K. L. & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (11), 636–644.
- Valenčič, V., Mavsar, D. B., Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čadež, N., Golob, T., Raspor, P. & Možina, S. S. (2010). The Impact of Production Technology on the Growth of Indigenous Microflora and Quality of Table Olives from Slovenian Istria. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 404-410.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *PCR protocols. A guide to methods and applications*, 315–322.
- Zalar, P., Gostincar, C., de Hoog, G.S., Ursic, V., Sudhadham, M. & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38.

Anexos



Anexos

Anexo I - The effect of reduction in the microbiological quality of craked green table olives of the maçanilha algarvia cultivar

International Journal of Food Microbiology 218 (2016) 57–65



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar



Tânia Mateus, David Santo, Cíntia Saúde, Paula Pires-Cabral, Célia Quintas *

^a Universidade do Algarve, Instituto Superior de Engenharia, Campus da Penha, 8005-139, Faro, Portugal

^b Universidade do Algarve, Centre for Mediterranean Bioresources and Food (MediBio) Campus de Gambelas, 8005-139, Faro, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2015

Received in revised form 23 October 2015

Accepted 14 November 2015

Available online 17 November 2015

Keywords:

Maçanilha Algarvia table olives

NaCl

KCl

CaCl₂

Safety parameters

Yeasts

ABSTRACT

The present work aimed at studying the effect of the partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ of the fermenting brines on the microbiological quality of natural cracked green Maçanilha Algarvia table olives. Olives were fermented in different salt combinations (Brine 1—8% NaCl, Brine 2—4% NaCl 4% KCl, Brine 3—4% NaCl 4% CaCl₂, Brine 4—4% KCl 4% CaCl₂, and Brine 5—2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl₂) and the abundance of yeasts and enterobacteria was determined. At the end of fermentation, the main microbial safety parameters were evaluated. Samples were analyzed according to standard methodologies and using Chromocult Agar (coliforms and *Escherichia coli*). The yeasts collected were grouped by restriction analysis of the ITS-5.8S rRNA gene and identified by partial sequencing of the 26S rRNA. Throughout the study, a decrease of the enterobacteria population was observed in all the fermentations, which was greater and faster in brines containing potassium and calcium. The main yeasts identified were *Pichia membranaefaciens*, *Candida boidinii*, *Zygosaccharomyces mrakii*, *Priceomyces carsonii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* and the yeast-like fungus *Galactomyces geotrichum*. The highest yeast diversity was found in olives produced in Brines 1, 2 and 3 and the lowest in Brines 4 and 5, where only the species *P. membranaefaciens*, *C. boidinii* and *G. geotrichum* were identified. No *Pseudomonas*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were found in the table olives produced.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Mediterranean diet pyramid recommends the consumption of table olives on a daily basis due to nutritional benefits associated with this fruit (Bach-Faig et al., 2011). These benefits lie in the composition of vitamins, minerals, monounsaturated fatty acids, phenolic compounds and triterpenes. Since the observation of microorganisms forming biofilms over the fruit's epidermis, table olives may also be used to carry beneficial microorganisms and classified as a probiotic food (Arroyo-López et al., 2012a; De Bellis et al., 2010; Lavermicocca et al., 2005). All the elaboration processes of table olives involving fermentation include a step of immersion in a saline solution where fermentation takes place and at the end the olives are considered a salty food product by numerous consumers aware of the health problems associated with salt. The final product will be ingested by consumers without any prior treatment, as table olives are "ready to eat food" and any alteration during the processing may result in high risk of spoilage or safety problems. The main reason for adding salt to food is for preservation, as salt causes a reduction of water activity. In addition, it is also added to food to improve taste and textures. In fermented food, salt (namely NaCl) plays an important role as it increases the diffusion of different

compounds out of cells which enhance the rate of the fermentation process, inhibits the growth of undesirable bacteria and fungi present in the fresh food, and favors the growth of fermentative microorganisms. In the fermentations' microbial dynamic successions, a great diversity of LAB and/or yeast species is generally observed at the beginning of fermentations. As the processes progress, some species disappear followed by the development of others and each phase is associated with different species (Alves et al., 2012; Bleve et al., 2014; Hurtado et al., 2008; Nisiotou et al., 2010; Pereira et al., 2015). The initial proportion of some microorganisms and microbial successions may determine the frequency of others conditioning the final product characteristics (Jemec and Raspor, 2005). Moreover, the microorganisms are associated in complex matrices forming biofilms on the epidermis of the olives, which could help microorganisms obtain nutrients, survive for long time periods and resist the fermentation conditions (rising amounts of acids, alcohols, high salt and phenolic compound levels) (Arroyo-López et al., 2012a; Nychas et al., 2002).

The World Health Organization (WHO) recommends a population salt intake less than 5 g/day/person. However, worldwide the salt consumption exceeds the recommendation and in Portugal goes above 10 g/day/person (Graça, 2013). Food reformulations consisting of reductions of salt require detailed studies before their implementation at the industrial scale. In these circumstances, changes in processing and in handling may be required to ensure that the foods have adequate safety

* Corresponding author.

E-mail address: cquintas@ualg.pt (C. Quintas).

characteristics and the expected shelf life. For example, reductions in sodium chloride might be responsible for an increased production of botulin by *Clostridium botulinum* (Simpson et al., 1995).

Table olives and other fermented or acidified vegetable foods, such as pickles or sauerkraut are perceived as safe food. However, the presence of pathogenic bacteria in brines and olives has been reported: *Listeria monocytogenes* (Caggia et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (Pereira et al., 2008; Romeo et al., 2012), coliforms (Franzetti et al., 2011; Pereira et al., 2008; Romeo et al., 2012) and *Clostridium perfringens* (Romeo et al., 2012), are some examples. Recent studies showed that populations of pathogenic bacteria presented rapid declines in natural Conservolea black olives (Grounta et al., 2013), green Halkidiki table olives (Argyri et al., 2013), and different types of Spanish olives (Medina et al., 2013), although death rates were variable depending on the composition of the brines in phenolic compounds, temperature and oxygen availability. However, some pathogenic strains were able to survive for long periods of time in stressful conditions.

One approach to reduce NaCl in foods may be the utilization of salt substitutes (other chlorides) alone or combined (Bautista-Gallego et al., 2013). Combinations of sodium, potassium, calcium and magnesium salts have been used to perform olive fermentation in the presence of reduced levels of sodium chloride during the fermentation and in the final product. Bautista-Gallego et al. (2010) and Bautista-Gallego et al. (2011b) studied the effect of different chloride salts on the fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña and Gordal cultivars, concluding that NaCl may be substituted for in diverse proportions with KCl and CaCl₂ without disturbing the usual fermentation profiles. Panagou et al. (2011) studied the implications of NaCl reduction in the fermentation of natural black olives of the Conservolea cultivar and all the mixtures led to very active lactic acid fermentation with one of the combinations tested (4% NaCl 4% KCl) producing olives with lower sodium content and good organoleptic characteristics.

Portugal is the fourth European producer of table olives following Spain, Greece and Italy (IOC, 2004) possessing cultivars such as Carrasqueira, Cobrançosa, Cordovil de Castelo Branco, Cordovil de Serpa, Galega Vulgar, Maçanilha Algarvia and Redondal (IOC, sd, Lopes et al., 2004). The objective of the present work was to study the effect of partial replacement of sodium chloride with potassium and calcium chlorides of the fermenting brines on the microbiological quality of cracked green Maçanilha Algarvia olives produced by natural fermentation. At the end of the fermentations, food hygiene and safety parameters were determined and the population of yeasts was identified. The results obtained could be used to produce traditional cracked green table olives with lower sodium content improving the image of this fermented food.

2. Materials and methods

2.1. Fermentation conditions

Cracked green table olive of the Portuguese cultivar Maçanilha Algarvia is a speciality produced in Portugal characterized by a green color, a singular aroma and a bitter flavor due to the slow de-bittering that occurs during natural fermentation in brines (directly brined olives). Table olives (Maçanilha Algarvia) were obtained from a local industry (Hélder Madeira – Indústria e Comércio de Azeitonas, Unipessoal Lda Tavira, Portugal). After cracking and washing olives were placed in plastic containers with a capacity for 8.0 kg of olives and 7.4 L of brine. Five brines were prepared with selected concentrations of sodium chloride, potassium chloride and calcium chloride (Table 1). The experimental design consisted of 5 treatments. The total initial concentrations of the salts was constrained to % NaCl + % KCl + % CaCl₂ = 8%. The percentage of salt (8%) was selected as it is the percentage used normally in the industry that supplied the olives. As this study was intended to be implemented in the mentioned

Table 1

Different salt concentrations in the brines used to produce green Maçanilha Algarvia cultivar table olives.

Brines	[NaCl] (%)	[KCl] (%)	[CaCl ₂] (%)	[Total] (%)	<i>a_w</i>
1	8	0	0	8	0.955 ± 0.001
2	4	4	0	8	0.956 ± 0.001
3	4	0	4	8	0.958 ± 0.000
4	0	4	4	8	0.969 ± 0.000
5	2.7	2.7	2.7	8	0.965 ± 0.000

industry, the same concentration of salt (8%) was used in order to fulfill the industrial requirement.

The experimental design included a central point corresponding to a brine with equal concentrations (2.67%) of the 3 salt chlorides (NaCl, KCl, CaCl₂), three extreme points of only one salt (8%) and three other points where brines were made only with two salts of equal concentration (4%). In a preliminary study carried out by our research group, it was found that brines with only CaCl₂ (8%) or KCl (8%) yielded final products that were not acceptable by sensorial evaluation. Then, it was decided not to include these brines in the experimental design. The water activity (*a_w*) of the brines was measured at 25 °C using a lithium chloride humidity sensor Rotronic DT Hygroskop (DMS-100H).

All treatments were performed in duplicate. Fermentations were left to progress naturally, depending on autochthonous microbiota, at room temperature, between October and April, in the pilot plant (Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve) in order to simulate the industrial processes. The fermentations occurred during 162 days.

The progression of the fermentations was studied through the pH and titratable acidity in the brine, which are the parameters used in the industry to evaluate the development of fermentations. Furthermore, the changes in microbial populations were followed during the course of the fermentations.

2.2. pH and titratable acidity

The pH changes in the brines were measured using a pH meter (Crison instrument, GLP 21 pH meter) and titratable acidity, expressed as grams of lactic acid per 100 mL of brine, were determined following AOAC's methods (2005) (AOAC, 942.15). The physico-chemical analyses were carried out in three replicates.

2.3. Microbial dynamics during the fermentation

Samples of olives were regularly collected in order to study the growth of the microbial populations throughout the fermentation processes. Twenty-five grams of each sample was diluted in 225 mL of Ringer solution and homogenized in a stomacher (Seward, Stomacher 400 Circulator) for 3 min. After the homogenization, decimal solutions were plated using the appropriate media. Lactic acid bacteria (LAB) were enumerated by cultivation on MRS agar medium (Merck, Darmstadt, Germany) containing sorbic acid, incubated for 3–5 days at 30 °C (BS ISO 15214, 1998). Total coliform and *Escherichia coli* were cultivated in Chromocult Agar, (Merck, Darmstadt, Germany) and grown for 24 h at 37 °C (González et al., 2003) and yeasts and molds were counted on Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Scharlau, Barcelona, Spain) after an incubation of 5–7 days at 25 °C. Malt Extract Agar (MEA, Scharlau, Spain) (pH 5) incubated at 25 °C for 5 days was used to collect yeasts for further identification. The microbiological analyses were made in duplicate.

The fit of the Baranyi model (Baranyi and Roberts, 1994) to experimental data of microbial plate counts vs time was carried out using the DMFIT (Institute of Food Research, Norwich U.K.) with the trilinear model option for enterobacteria. The two-term Gompertz model (Bello and Sánchez Fuertes, 1995) was also fitted to the data for enterobacteria, using "Solver" add-in from Excel for Windows, version 8.0 SR2, by minimizing the residual sum-of-squares between the experimental data

points and those estimated by the respective model (SQ). The parameters of the model were obtained by this non-linear regression analysis for the two-term Gompertz model.

2.4. Statistical analyses

The experimental values were expressed as the means of four determinations and the standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) was carried out and the average values (pH, titratable acidity and yeast population) were compared with a Scheffe's multiple-range test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS statistical software version 22.0 (IBM SPSS Statistics 22.0).

2.5. Microbial characteristics of table olives produced

At the end of the fermentation the olives were analyzed for LAB, total coliform and *E. coli*, yeasts and molds, staphylococci according to ISO 6888-1:1999 (Amd 1:2003), and the safety microbial parameters *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* according to the ISO 6579:2002 and ISO 11290 1:1996 FDAM1:2004, respectively. *Pseudomonas* were also investigated using *Pseudomonas* agar base with CFC Supplement (Scharlau, Spain), incubated at 30 °C for 48 h.

2.6. Yeast isolation and identification

In order to study the yeast species diversity at the end of the fermentation, 100 yeast colonies (about 20 from each fermentation brine) were randomly selected from MEA plates according to their macro morphology. Isolates were purified by successive inoculation on YEPD (yeast extract, peptone, dextrose, agar) (Scharlau, Spain) and preserved at –80 °C with glycerol (20% v/v). Yeast isolates were grouped using restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 5.8 ITS rRNA region and identified by the sequence analysis of the region D1/D2 of the 26S rRNA gene.

2.6.1. Total DNA extraction

Genomic DNA from yeast grown during 18 h at 28 °C in liquid YEPD was extracted according to Querol et al. (1992) with minor modification. Cultures were transferred to 2 mL tubes and collected by centrifugation at 5000 rpm in a centrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5415R, France), for 5 min. Then, the cells were washed with distilled water, spun down in the centrifuge and resuspended in 500 µL of solution I (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA pH 7.5), containing 15 µL of 2.5 mg/mL Lyticase (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and incubated at 37 °C for 1 h. After centrifugation for 5 min at 12,000 rpm in the microfuge, spheroplasts were resuspended in 500 µL of solution II (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 7.4), of which 13 µL of 10% w/v SDS (pH 7.2) was added. The mixture was incubated at 65 °C for 10 min, and after the incubation 200 µL of 5 M potassium acetate (pH 4.8) was added and the mixture placed on ice for 5 min. Then, the tubes were centrifuged at maximum speed at 4 °C for 15 min. Supernatants were transferred to clean 1.5 mL microfuge tubes, and the DNA was precipitated by the addition of the same volume of cold isopropanol. The samples were left at room temperature for 10 min, and centrifuged at 12,000 rpm for 15 min. The DNA pellet was washed twice with 70% v/v ethanol, dried and dissolved in 30 µL of sterilized Milli-Q water.

2.6.2. PCR reactions

PCR reactions were performed to amplify the ITS-5.8S rRNA and the D1/D2 26S rRNA regions according to the methods of Esteve-Zarzoso et al. (1999) and Kurtzman and Robnett (1998), respectively. PCR reaction mixtures (50 µL) containing 0.5 µM primers, 10 µM deoxynucleotides (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 1 unit DNA polymerase (Promega) and 10 ng of template DNA, were prepared. The amplifications were achieved in a thermocycler (Thermo Electron, USA) programmed as follows: 95 °C for

5 min; 30 cycles 94 °C for 1 min; 55.5 °C for 2 min; 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min. For the amplification of the ITS-5.8S region, the primers set used were ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCCGCITATTGATATGC-3') (White et al., 1990) and for the amplification of 26S rRNA region the primer pair used were NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman and Robnett, 1998).

2.6.3. RFLP of the rDNA 5.8-ITS region

PCR products of the ITS-5.8S region were digested without purification following the method of Esteve-Zarzoso et al. (1999). The yeast isolates were grouped according to the RFLP patterns obtained (Arroyo-López et al., 2006; Esteve-Zarzoso et al., 1999; de Llanos Frutos et al., 2004).

2.6.4. Sequencing and sequence comparison

The amplified PCR D1/D2 26S rDNA products to further sequence were purified using the PCR purification kit (Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions and sequenced at DNA Sequencing Service – CCMAR Technology Core Facilities (Universidade do Algarve). The sequence analysis of the domain D1/D2 was achieved in 50% of the yeast isolates belonging to each RFLP group. Blast searches of sequences were performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and sequences were compared to with those of type strains.

3. Results and discussion

3.1. Progression of the fermentation

Fermentation brines were monitored by titratable acidity and pH which are the two parameters commonly employed by the industry (Fig. 1).

The progress of the brines' pH during the fermentations showed the same behavior in all cases, presenting a rapid decrease within the first four days from initial values of 6.24–6.53 to 4.06–4.54 (Fig. 1). Thereafter, regardless of the brines, a plateau was reached with results significantly different ($p < 0.05$) at the end of the fermentation of 4.01 ± 0.01 , 4.09 ± 0.00 , 4.12 ± 0.01 , 4.17 ± 0.00 and 4.21 ± 0.01 , for Brines 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. The pH drop observed resulted from changes that occurred in the fermenting brines. Regarding titratable acidity, an increase was observed during the first 50 days of fermentation and then slightly fluctuated until the end in all the processes, reaching values significantly different ($p < 0.05$) of 0.59 ± 0.01 , 0.57 ± 0.00 , 0.36 ± 0.01 , 0.41 ± 0.00 and 0.32 ± 0.01 g lactic acid/100 mL in Brines 1, 2, 3, 4 and 5 respectively (Fig. 1). The fermentation of cracked green table olives of Maçanilha Algarvia is a directly brined fermentation and in these cases, yeasts become the dominant microbial group. In fact, according to Aponte et al. (2010); Garrido-Fernández et al. (1997); Nychas et al. (2002) and Tassou et al. (2002), when yeasts become the dominant microbial group, the olives produced have higher pH values and lower acidity and the final product has a milder taste. The increase of titratable acidity observed during the fermentative process may be explained by the effect of different factors: a) The progressive diffusion and solubilization of compounds like organic acids (citric acid and malic acid) from the olive tissues which causes an increase in acidity; b) The production of diverse compounds including organic acids such as acetic acid, succinic acid and, in some cases lactic acid in addition to ethanol and aldehydes resulting from the yeast activity; and c) The increase of free fatty acids (oleic acid, among others) resulting from, for example, the activity of enzymes (esterases and lipases) present in olive tissues or produced by microorganisms contribute to the increase of acidity. The levels obtained for pH and acidity were in accordance with the limits of the Trade Standard Applying to Table Olives (2004) ($pH \leq 4.3$ and titratable acidity ≥ 0.3 g lactic acid/100 mL), for natural table olives, indicating

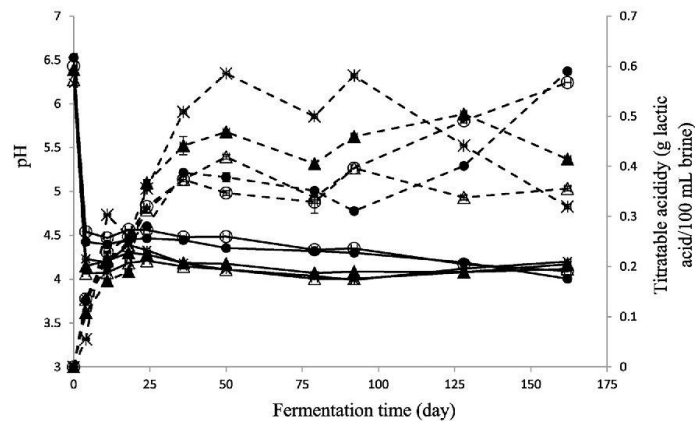


Fig. 1. Changes in pH and titratable acidity throughout the fermentation of cracked green Maçanilha Algarvia olives occurring in different chloride combination brines [(solid lines—pH; dashed lines—acidity) (Brine 1 (●); Brine 2 (○); Brine 3 (△); Brine 4 (▲); Brine 5 (x))].

that all chloride mixtures resulted in successful natural fermentative processes. The development of acidity and the decreasing of the pH are decisive factors for the success of fermentation as they interfere in the development of spoilage and ensure the safety of the final product.

The dynamics of yeasts and enterobacteria populations during the fermentation of table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar in the different brine conditions is presented in Fig. 2. On the first day, when all the fermentations were prepared, the enterobacteria and yeasts were counted in the olives in numbers of 3.18 Log CFU/g and 3.81 Log CFU/g, respectively. The Baranyi model (Baranyi and Roberts, 1994) and two-term Gompertz equation were fitted to the experimental data collected, in the case of enterobacteria, after conversion to Log colony forming units per gram. The yeast experimental data were collected when this population was already in the stationary phase and hence the results could not be modeled by the Baranyi growth model and two-term Gompertz equation. For each of the five fermentations, corresponding to the five different brines, the shoulder period corresponding to the initial period of fermentation where no significant decrease/increase in bacterial counts was detected (day), the maximum death rate of enterobacteria (day^{-1}) and t_{max} , the time from which no viable colonies of enterobacteria were detected (day), were estimated according to Baranyi model and the kinetic parameters are presented in Table 2.

The determination coefficient values (R^2) were equal or superior to 0.93 and the standard error of the fittings (se) ranged from 0.18 to 0.34. During, approximately, the first two weeks a shoulder period that varied from 10.5–18.5 days was observed. This initial period was smaller in Brines 1 and 2. However, the observation of the experimental data regarding the enterobacteria dynamics seems to show that a growth of this population had occurred during the first days (Fig. 2). Concerning the fit of the two-term Gompertz equation to the data of enterobacteria counts versus time, the low or negative values of the determination coefficient (R^2) of 0.0732, -0.00187 and -6.131 for Brines 1, 2 and 4 respectively, showed the lack of fit of this model in these cases. Regarding Brines 3 and 5, the determination coefficients were 0.914 and 0.999, respectively, confirming the goodness of fit of the two-term Gompertz model to the experimental data. The application of this model allows estimating a growth phase of enterobacteria in Brines 3 and 5 as suggested in the experimental data, although not estimated by the Baranyi model. The specific growth rate of enterobacteria at the beginning of fermentations 3 and 5 were 0.174 and 0.136 day^{-1} , respectively. After this period, a decrease of the enterobacteria population was observed characterized by maximum death rates of -0.049 ± 0.005 , -0.119 ± 0.047 , -0.100 ± 0.009 , -0.104 ± 0.0083 , and $-0.154 \pm$

0.015 day^{-1} in Brines 1, 2, 3, 4 and 5 respectively. After 53.8 ± 2.95 (Brine 1), 35.2 ± 5.75 (Brine 2), 38.7 ± 1.30 (Brine 3), 42.4 ± 1.26 (Brine 4) and 38.9 ± 1.05 (Brine 5) days of fermentation, no viable enterobacteria ($<1 \text{ Log CFU/g}$) were detected until the end of the processes in all the vessels. The presence of potassium and calcium chlorides in the brines caused an increase in the death rate of the enterobacteria population which was higher in the olives fermented in Brine 5. Additionally, the time from which no viable colonies of enterobacteria were detected (t_{max}) was considerably higher in Brine 1 than in all the other brines. Panagou et al. (2011) also observed a survival reduction of those Gram-negative bacteria in the brines containing different mixtures of chlorides when compared to the control (8% NaCl). Bautista-Gallego et al. (2010) and (2011b) reported that in Manzanilla-Aloreña and Gordal table olives, respectively, the overall growth of enterobacteria decreased in the presence of CaCl_2 and increased with concentrations of NaCl and KCl. Moreover, *E. coli* colonies were not detected during the study in any of the fermentations. In fact, the persistence of enterobacteria in a fermentation process should be as short as possible as these microorganisms may develop spoilage problems in the table olives.

In the case of yeasts, their growth was almost not affected by the different brining conditions as they present almost the same pattern in all the treatments. The yeast population increased to maximum levels of 5.97 (Brine 1—8% NaCl), 5.82 (Brine 2—4% KCl 4% NaCl), 5.87 (Brine 3—4% NaCl 4% CaCl_2), 5.84 (Brine 4—4% KCl 4% CaCl_2) and 5.72 (Brine 5—2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl_2) Log CFU/g on the fourth day of fermentation and then, a stationary phase occurred following a slight decrease until the end of the processes with the numbers 4.75 ± 0.78 , 4.75 ± 1.04 , 4.96 ± 0.14 , 5.57 ± 0.02 and 5.22 ± 0.06 Log CFU/g, obtained for Brines 1 to 5, respectively. The final yeast populations obtained in the different brines were not significantly different ($p < 0.05$). The presence of calcium did not favor the growth of yeasts as reported by Bautista-Gallego et al. (2010) and Bautista-Gallego et al. (2011b) in Manzanilla-Aloreña and Gordal table olives, respectively.

As observed by Alves et al. (2012), yeasts seem to be mainly responsible for the fermentation of natural green table olives and LAB were not detected throughout the production processes. The absence of LAB has been described in different table olive productions in Sicily (Aponte et al., 2010) and Slovenia (Valenčič et al., 2010). The main factors that explain the absence of LAB in cracked green table olives may be the initial high NaCl concentration, the fermentation temperature, the nutrient availability, the richness of the drupes in natural inhibitor compounds, such as phenolic compounds and the presence of inhibitors produced by other microorganisms. Tassou et al. (2002) found that high concentrations of NaCl in fermentations occurring at temperatures

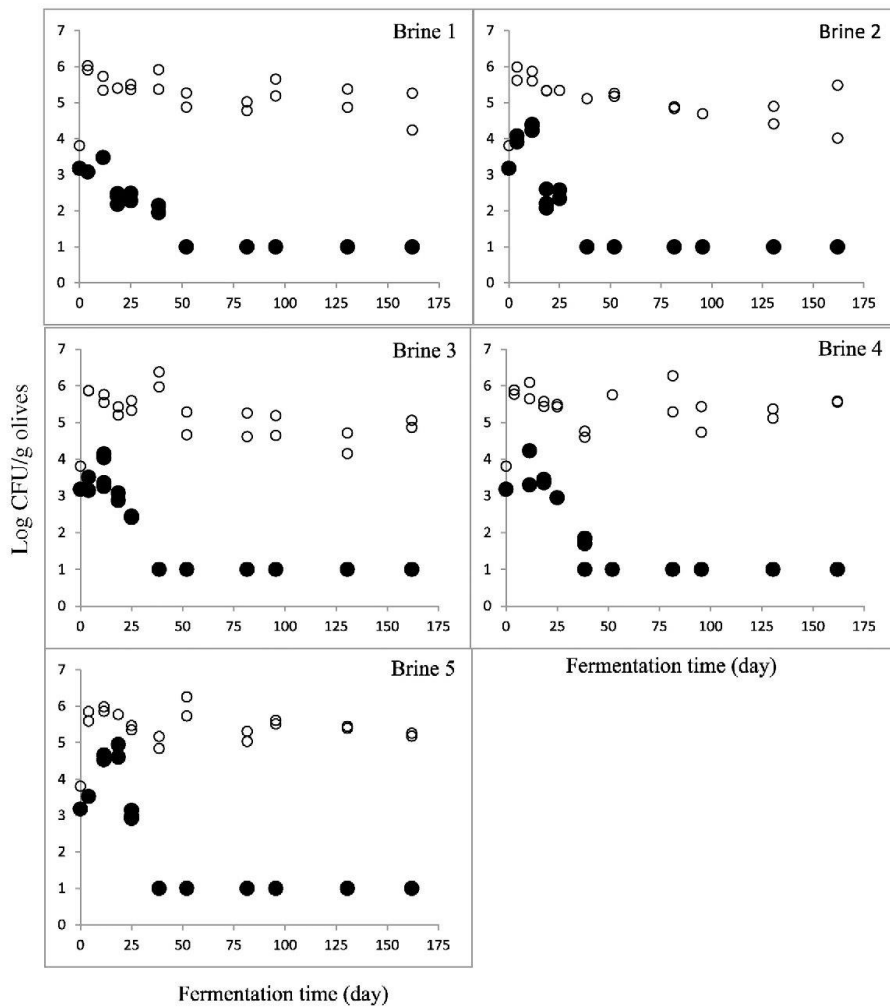


Fig. 2. Changes in yeast (open symbols) and enterobacteria (closed symbols) populations throughout the fermentation of cracked green Maçanilha Algarvia olives in the 5 different chloride combination brines. Symbols (open and closed) represent the experimental data.

higher than 18 °C hinder the growth of LAB and improved the activity of yeasts producing final products with lower free acidity and higher pH values. Regarding the phenolics, Medina et al. (2008) identified the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid free (EDA) or linked to hydroxytyrosol (HyEDA) as the main LAB inhibitors. The presence of such inhibitory compounds at temperatures higher than 18 °C (Tassou

et al., 2002), as what occurred in this study’s fermentations (18.9 °C), may enhance the inhibitory activity of NaCl and vice-versa. In the conditions of salt concentration and temperature of the fermentation of directly brined olives studied in the present work, it is not a surprise that LAB growth may have been overcome by more tolerant microorganisms such as yeasts.

Table 2

Parameter estimates (± standard deviation) obtained by fitting survival data of enterobacteria with Baranyi model. (R²—coefficient of determination, se (fit)—standard error of fit of the model, Maximum death rate (day⁻¹)—maximum rate of death/decline of the microorganisms, tmax—time from which no viable colonies of enterobacteria were detected.

	Brine 1	Brine 2	Brine 3	Brine 4	Brine 5
	8% NaCl	4% NaCl 4% KCl	4% NaCl 4% CaCl ₂	4% KCl 4% CaCl ₂	2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl ₂
R ²	0.94	0.93	0.97	0.95	0.95
se (fit)	0.21	0.34	0.18	0.20	0.29
Shoulder (day)	10.5 ± 3.71	11.5 ± 4.24	13.5 ± 1.59	17.8 ± 1.65	18.5 ± 1.74
Maximum death rate (day ⁻¹)	-0.049 ± 0.005	-0.119 ± 0.047	-0.1 ± 0.009	-0.104 ± 0.0083	-0.154 ± 0.015
tmax (day)	53.8 ± 2.95	35.2 ± 5.75	38.7 ± 1.30	42.4 ± 1.26	38.9 ± 1.05

3.2. Microbial characteristics of table olives produced

The reduction of salt or its substitution with other salts may have severe implications in the risk of safety and/or spoilage, depending on the food product constitution and on the processing. Therefore, any modification consisting of total or partial replacement of NaCl with other chlorides must be complemented by a study of the microbial characteristics of the final product. In this context, at the end of the fermentation processes the olives produced were characterized in relation to the safety microbial parameters, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*. Additionally, the presence of *Pseudomonas* sp., enterobacteria, *Escherichia coli*, LAB, yeasts, *Staphylococcus aureus* were also enumerated in the final product (Table 3). Yeasts were predominant and no LAB, enterobacteria, *pseudomonas*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* were found in the table olives produced in the different mixtures of chloride salts. According to the regulation of the European Commission ((EC), 2005, (EC), 2007), the table olives produced fulfilled the microbiological criteria of food safety.

Yeast identification.

The yeasts are a group of microorganisms commonly found during table olive processing and may contribute to improve the fermentations and the final products but could also be responsible for over fermentations and spoilage, during the fermentation and the shelf life of packed products causing severe economic losses (Alves et al., 2015; Arroyo-López et al., 2012b).

The different isolates collected at the end of the fermentations were initially grouped in 11 RFLP profiles of the ITS-5.8 rRNA gene (Table 4). Then, sequence analysis of the domains D1/D2 of the 26S rRNA gene was used to identify a representative number of yeasts in each group (Table 4).

The first RFLP group, formed by 32 isolates was identified as *C. boidinii* as the D1/D2 sequences obtained presented a 100 % homology with the type strain NRRL Y-2332 (accession number: JQ689009.1). Group II presented only one isolate pertaining to the species *C. diddensiae* while the third group included two isolates identified as *C. molendinolei*, due to the high similarities (99%) of their sequences with the correspondent type strains. Group IV sequences had 99% homology with strains belonging to the arthroconidial teleomorph species *Galactomyces geotrichum* (anamorph *Geotrichum candidum*). Group V included only one isolate identified as *Meyerozyma guilliermondii* due to 99% homology with a type strain of the same species (NRRL Y-2075 accession number JQ689047.1) and the sequences of the isolates of Group VI showed a similarity of 100% to the type strain of *Pichia membranaefaciens* (Strain NRRL Y-2026 accession number: EU057561). The D1/D2 sequences obtained from the isolates pertaining to the Groups VII and VIII presented 99% similarity with *Priceomyces carsonii* (Strain NRRL YB-4275, accession number U45743.1) and with *Saccharomyces cerevisiae* (Type strain NRRL Y-12632, JQ689017.1), respectively. The sequences of Group X isolates displayed a similarity of 98% to type strain of *Zygorhizula mrakii* (Strain NRRL Y-12654, accession number JQ689015.1). The Groups IX and XI include isolates

whose D1/D2 sequences presented 99% homology with the type strain of *Zygoascus hellenicus* (NRRL Y-7136/JQ689060.1) and *Wickerhamomyces anomalus* (Type Strain NRRL Y-366, accession number EF550341.1), respectively.

The structure of the yeast population in the five brines and frequencies of isolation of each species in each brine are summarized in Table 5.

The yeast community of the table olives produced in brine of 8% NaCl was constituted by 7 different species isolated in decreasing frequencies of isolation, *P. membranaefaciens* (25%), *C. boidinii* (20%), *G. geotrichum* (20%), *Z. mrakii* (15%), *P. carsonii* (10%), *S. cerevisiae* (5%), and *M. guilliermondii* (5%). In the fermentative process conducted with 4% NaCl 4% KCl, the same number of species was identified with the exception of *M. guilliermondii*. Instead of this yeast, two isolates of *W. anomalus* were found.

The yeasts *Z. hellenicus* and *C. molendinolei* were identified in low frequencies (4.8 and 9.5%, respectively) in olives produced in brine 3 in addition to *P. membranaefaciens*, *C. boidinii*, *G. geotrichum*, *Z. mrakii* and *S. cerevisiae*.

P. membranaefaciens, *C. boidinii* and *G. geotrichum* were the prevalent species in olives produced through fermentation in Brines 4 (4% KCl 4% CaCl₂) and 5 (2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl₂). The species *G. geotrichum* was found in the brine containing the 3 salts and reached its highest frequency (38.1%). Other yeasts were not detected except one isolate of *C. diddensiae* that was also identified in Brine 4. The results presented show that the utilization of different salt mixtures in the brines affected the structure of the final yeast population of olives, which is contrary to the results of Bautista-Gallego et al. (2011b). These results were obtained in Spanish type table olives, whereas the results presented in this document were obtained in natural olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. Both types of olives go through two different types of processing, the Spanish type includes a treatment with NaOH while the natural olives are immediately immersed in the brines without any prior treatments.

The major species identified at the end of the five fermentations, *P. membranaefaciens* (24%), *C. boidinii* (32%) and *G. geotrichum* (24%), are part of the group most commonly reported for directly brined green olives as reviewed by Arroyo-López et al. (2008). The next species more representative were *Z. mrakii* (6%) that have been identified in the work of Alves et al. (2012) and *S. cerevisiae* (4%), which is also a common species in table olives as reported for Spanish (Bautista-Gallego et al., 2011a; Arroyo-López et al., 2006), Greek (Nisiotou et al., 2010), Italian (Tofalo et al., 2013) and Portuguese cultivars (Alves et al., 2015; Pereira et al., 2015). *G. geotrichum* is a ubiquitous filamentous yeast-like fungus commonly isolated from soil, air, water, milk, silage, plant tissues and cheese. This species has been identified in table olive fermentations and is widely used as adjunct culture in the maturation of cheese. Until now, there has not been any safety problems reported that could be associated with its utilization as a starter in cheese (Pottier et al., 2008).

Other yeast species were detected in minor quantities: *P. carsonii*, *M. guilliermondii*, *W. anomalus*, *Z. hellenicus*, *C. molendinolei* and *C. diddensiae*, which were found in one to three isolates in the different

Table 3
Microbial characteristics and safety parameters of table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar produced in different chloride combination brines.

	Brine 1	Brine 2	Brine 3	Brine 4	Brine 5
Microorganisms (CFU/g olives)	8% NaCl	4% NaCl 4% KCl	4% NaCl 4% CaCl ₂	4% KCl 4% CaCl ₂	2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl ₂
Yeasts	1.1 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵	9.5 × 10 ⁴	3.8 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵
Enterobacteria (coliforms)	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
Lactic acid bacteria	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
<i>Pseudomonas</i> sp.	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
<i>Escherichia coli</i>	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
<i>Salmonella</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	ND

Table 4

RFLP groups/profiles obtained from the restriction of the amplified 5.8S-ITS region of the 100 yeast isolates and corresponding identification after comparison of the isolates of DNA sequences with those present in GenBank from NCBI database (Note: The strains used in the comparisons are type strains with the exception of JN974268.1 and U45743.1. ATCC—American Type Culture Collection, USA; CBS—Centraalbureau voor Schimmekultures, Nederland; DBVPG—Industrial Yeast Collection, Perugia, Italy; NRRL—Agricultural Research Culture Collection, USA).

Grouping the yeast isolates						Identification and sequencing of D1/D2 region of the 26S rDNA region
Restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS 5.8S rDNA region						
RFLP Group no.	PCR Product (bp)	Restriction fragments (bp)			Isolation (%)	Species/Strain/GenBank accession number
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinII</i>		
I	750	350 + 310 + 90	700	390 + 190 + 160	32	<i>Candida boidinii</i> /Strain NRRL Y-2332/JQ689009.1
II	630	290 + 170 + 130	420 + 130 + 90	310 + 310	1	<i>Candida diddensiae</i> /Strain NRRL Y-7589/U45750
III	650	600	580	325 + 325	2	<i>Candida molendinolei</i> /Strain DBVPG 5508/JN688665
IV	380	370	360	100 + 120 + 160	24	<i>Galactomyces geotrichum</i> /Strain CBS 607.85/JN974268.1
V	620	300 + 280 + 50	120 + 400 + 90	300 + 320	1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> /Strain NRRL Y-2075/JQ689047.1
VI	500	175 + 110 + 90 + 75	330 + 90 + 50	275 + 200	24	<i>Pichia membranaefaciens</i> /Strain NRRL Y-2026/EU057561
VII	650	300 + 300	420 + 150 + 90	325 + 325	3	<i>Priceomyces carsonii</i> /Strain NRRL YB-4275/U45743.1
VIII	850	380 + 320 + 150	330 + 230 + 170 + 120	380 + 360 + 110	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /Strain NRRL Y-12632/JQ689017.1
IX	650	290 + 280 + 80	390 + 115 + 80	300 + 190 + 130	1	<i>Zygoascus hellenicus</i> /Strain NRRL Y-7136/JQ689060.1
X	660	300 + 300	400 + 100 + 80	320 + 190 + 120	4	<i>Zygorulaspota mrakii</i> /Strain NRRL Y-12654 JQ689015.1
XI	650	600	580	325 + 325	2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> /Strain NRRL Y-366/EF550341.1

brines studied. While *M. guilliermondii*, *W. anomalus*, and *C. diddensiae* have been associated with olive fermentation by diverse authors (Arroyo-López et al., 2006; Bautista-Gallego et al., 2011a; Nisiotou et al., 2010), *C. molendinolei* was recently identified as a novel species isolated from the olive oil environment, being able to assimilate D,L-lactate and grow in the presence of high NaCl concentrations (Čadež et al., 2012). On the other hand, *Z. hellenicus* was found in black olives (Coton et al., 2006) and *P. carsonii* (Francesca et al., 2014) was described in fermenting grapes. Species of the genus *Zygoascus* were recently reported in Greek table olives (Grounta et al., 2015).

The species identified certainly have important technological activities that may interfere in the process of fermentation and in the characteristics of the final products. For instance, *P. membranaefaciens*, which has a killer capacity, interferes in the strains able to grow in their proximity (Marquina et al., 1992; Silva et al., 2011). Isolates of *C. boidinii*

have lipase and esterase activities while the yeasts *W. anomalus* and *C. diddensiae* possess β -glucosidase and esterase activities, which have been related to an improvement of organoleptic characteristics of table olives (Bautista-Gallego et al., 2011a; Hernández et al., 2007). The esterase and lipolytic activities present in some yeasts (*C. diddensiae*, *P. membranaefaciens*, *C. boidinii*, *W. anomalus*) produce free fatty acids which can improve the sensorial properties of olives (Bautista-Gallego et al., 2011a; Hernández et al., 2007). Isolates of *W. anomalus* and *P. guilliermondii* were considered interesting to be included as starters in the Greek table olive industry due to their physiological characteristics (Bonatsou et al., 2015). Another important aspect is the antioxidant action of yeasts presenting catalase activity such as *S. cerevisiae*, *W. anomalus* and *P. membranaefaciens*, which is also considered beneficial in table olive production (Arroyo-López et al., 2012b; Bautista-Gallego et al., 2011a). The technological characteristics of the yeast isolates obtained in this work will be determined in further studies.

Table 5

Yeasts species identified in the table olives of Maçanilha Algarvia cultivar produced in different chloride combination brines (NI—number of isolates).

Yeast species	Brine 1		Brine 2		Brine 3		Brine 4		Brine 5		Total (%)
	8% NaCl		4% NaCl 4% KCl		4% NaCl 4% CaCl ₂		4% KCl 4% CaCl ₂		2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl ₂		
	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	NI	%	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	5	25.0	5	26.3	3	14.3	4	21.1	7	33.3	24
<i>Candida boidinii</i>	4	20.0	7	36.8	7	33.3	8	42.1	6	28.6	32
<i>Galactomyces geotrichum</i>	4	20.0	1	5.3	5	23.8	6	31.6	8	38.1	24
<i>Zygorulaspota mrakii</i>	3	15.0	2	10.5	1	4.8					6
<i>Priceomyces carsonii</i>	2	10.0	1	5.3							3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	5.0	1	5.3	2	9.5					4
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	5.0									1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			2	10.5							2
<i>Zygoascus hellenicus</i>					1	4.8					1
<i>Candida molendinolei</i>					2	9.5					2
<i>Candida diddensiae</i>							1	5.3			1
Total	20	100.0	19	100.0	21	100.0	19	100.0	21	100.0	100.0

The presence of both CaCl₂ and KCl in the brines has a strong effect in reducing the diversity of yeast species recovered from the olives (apart from the reduction they caused in the enterobacteria population), which may have an impact on the organoleptic characteristics of table olives. The various yeast populations occurring in the five fermentations resulted from the conditions developed during the course of the processes and from different successions occurring in each process. These differences may affect the organoleptic characteristics of the table olives, thus undoubtedly interfering in the final quality of the olives. In fact, preliminary studies suggest that Brines 1 and 2 resulted in the best final products. However, more detailed studies related to sensorial analysis are needed to complete this study.

4. Conclusion

The partial replacement of sodium with potassium and/or calcium chloride in the fermentation brines of Maçanilha Algarvia olives resulted in successful natural fermentative processes and in final products with excellent microbiological quality that fulfilled the microbiological criteria of food hygiene and safety. The presence of different chlorides in the brines allowed for the development of the expected acidity and pH levels and increased the rate of disappearance of Gram negative enterobacteria. However, it did not significantly affect the growth of yeasts. Although the growth dynamics of the yeast population was not noticeably altered, some of the brines caused a decrease in the diversity of species found in the final stage of the fermentations. Olives produced in the brines of 8% NaCl, 4% NaCl 4% KCl and 4% NaCl 4% CaCl₂ presented the highest diversity of yeasts whereas in the fermentations occurring in the brines of 4% KCl 4% CaCl₂ and 2.7% NaCl 2.7% KCl 2.7% CaCl₂ the dominant yeasts were *P. membranaefaciens*, *C. boidinii*, and *G. geotrichum*, while other yeasts were not detected. The characteristics of the yeast population presented may have consequences in the final product's organoleptic quality.

The NaCl substitution affected the structure of the yeast population. Further studies on the effect of these changes on the organoleptic and textural profiles have to be performed before applying any changes in the brine composition at an industrial scale.

Acknowledgments

The authors thank local table olives' industry for supplying the olives and Alexandra Pereira for revising the manuscript.

References

- Alves, M., Esteves, E., Quintas, C., 2015. Effect of preservatives and acidifying agents on the shelf life of packed cracked green table olives from Maçanilha cultivar. *Food Packag. Shelf Life* 5, 32–40.
- Alves, M., Gonçalves, T., Quintas, C., 2012. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control* 23, 363–368.
- AOAC, 2005. In: Hortwitz, W. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence, Gaithersburg, Maryland.
- Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C.M., Moschetti, G., 2010. Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol.* 27, 162–170.
- Argyri, A.A., Lyra, E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2013. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiol.* 36, 1–6.
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., 2012a. Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiol.* 32, 295–301.
- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiol.* 23, 791–796.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 189–196.
- Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2012b. Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *Int. J. Food Microbiol.* 160, 42–49.
- Bach-Faig, A., Berry, E.M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulos, A., Dernini, S., Xavier Medina, F., Batúno, M., Belahsen, R., Miranda, G., Serra-Majem, L., Mediterranean Diet Fdn Expert, G., 2011. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* 14, 2274–2284.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277–294.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Romero Gil, V., Rodríguez Gómez, F., García García, P., Garrido Fernández, A., 2011b. Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiol.* 28, 1316–1325.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2010. Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. *Food Microbiol.* 27, 403–412.
- Bautista-Gallego, J., Rantsiou, K., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., Arroyo-López, F.N., 2013. Salt reduction in vegetable fermentation: reality or desire? *J. Food Sci.* 78, R1095–R1100.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2011a. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 89–96.
- Bello, J., Sánchez Fuertes, M.A., 1995. Application of a mathematical model to describe the behaviour of the *Lactobacillus* spp. during the ripening of a Spanish sausage (chorizo). *Int. J. Food Microbiol.* 27, 215–227.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F.A., Grieco, F., Cappello, M.S., De Domenico, S., Mita, G., Tasioula-Margari, M., Logrieco, A.F., 2014. Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardo and Leccino table olives. *Front. Microbiol.* 5, 570.
- Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E.Z., Arroyo-López, F.N., 2015. Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiol.* 46, 66–73.
- Čadež, N., Raspor, P., Turchetti, B., Cardinali, G., Ciardini, G., Veneziani, C., Peter, G., 2012. *Candida adriatica* sp nov and *Candida molendinolei* sp nov, two yeast species isolated from olive oil and its by-products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2296–2302.
- Caggia, C., Randazzo, C.L., Di Salvo, M., Romeo, F., Giudici, P., 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in green table olives. *J. Food Prot.* 67, 2189–2194.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohler, D., 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130–135.
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L., Lavermicocca, P., 2010. Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 6–13.
- de Llanos Frutos, R., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A., 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.
- Esteve-Zaroso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337.
- European Commission (EC), 2005. Regulation 2073/2005. *EU Off. J.* 1–26 (15/11/2005, L338).
- European Commission (EC), 2007. Regulation 1441/2007. *EU Off. J.* 1–12 (5/12/2007, L322).
- Francesca, N., Romano, R., Sannino, C., Le Grottaglie, L., Settanni, L., Moschetti, G., 2014. Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *Int. J. Food Microbiol.* 171, 84–93.
- Franzetti, L., Scarpellini, M., Vecchio, A., Planeta, D., 2011. Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Ann. Microbiol.* 61, 843–851.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M., 1997. *Table Olives: Production and Processing*. Chapman & Hall, London.
- González, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D., Sousa, G.B., 2003. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiol.* 20, 601–604.
- Graça, P., 2013. Estratégias Para a Redução do Consumo de Sal na Alimentação em Portugal. *Direção Geral de Saúde* (in Portuguese).
- Grounta, A., Doulgeraki, A.J., Panagou, E.Z., 2015. Quantification and characterization of microbial biofilm community attached on the surface of fermentation vessels used in green table olive processing. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 41–48.
- Grounta, A., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., 2013. Survival of food-borne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 197–202.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Córdoba, M.G., 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol.* 24, 346–351.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zaroso, B., Bordons, A., Rózes, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Res. Int.* 41, 738–744.
- IOC, 2004. Trade Standard Applying to Table Olives. International Olive Council, Madrid (International Olive Oil Council (sd) World Catalogue of Olive Varieties).
- ISO 15214 (British Standard), 1998. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Mesophilic Lactic Acid Bacteria – Colony Count Technique at 30 °C (London).
- Jemec, K.P., Raspor, P., 2005. Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiol.* 22, 293–300.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 331–371.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizzello, C.G., Visconti, A., 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4233–4240.
- Lopes, M.S., Mendonça, D., Sefc, K.M., Gil, F.S., Machado, A.C., 2004. Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *Hortscience* 39, 1562–1565.

- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M., Spencer Martins, I., 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 279–283.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., Ramírez, E., de Castro, A., 2013. Survival of foodborne pathogenic bacteria in table olive brines. *Food Control* 34, 719–724.
- Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M., García, A., 2008. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chem.* 110, 932–937.
- Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., 2010. Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 396–405.
- Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 173–177.
- Panagou, E.Z., Hondrodinou, O., Mallouchos, A., Nychas, G.J.E., 2011. A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of *Conservolea* natural black olives. *Food Microbiol.* 28, 1301–1307.
- Pereira, A.P., Pereira, J.A., Bento, A., Estevinho, M.L., 2008. Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2895–2902.
- Pereira, E.L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J.A., Baptista, P., 2015. Yeast dynamics during the natural fermentation process of table olives (*Negrinha de Freixo* cv.). *Food Microbiol.* 46, 582–586.
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.P., Gueguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 327–332.
- Querol, A., Barrio, E., Ramon, D., 1992. A comparative study of different methods of yeast strains characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 (439), 446.
- Romeo, F.V., Piscopo, A., Mincione, A., Poiana, M., 2012. Quality evaluation of different typical table olive preparations (cv *Nocellara del Belice*). *Grasas Y Aceites* 63, 19–25.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Malcata, F.X., 2011. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT Food Sci. Technol.* 44, 1349–1354.
- Simpson, M.V., Smith, J.P., Dodds, K., Ramaswamy, H.S., Blanchfield, B., Simpson, B.K., 1995. Challenge studies with *Clostridium botulinum* in a sous-vide spaghetti and meat sauce product. *J. Food Prot.* 58, 229–234.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsaboukakis, K.Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiol.* 19, 605–615.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., Corsetti, A., 2013. Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 203–208.
- Valenčič, V., Mavsar, D.B., Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čadež, N., Golob, T., Raspor, P., Možina, S.S., 2010. The impact of production technology on the growth of indigenous microflora and quality of table olives from Slovenian Istria. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 404–410.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.