



# VI Simpósio Nacional de *Olivicultura*

Mirandela 2012

*Editores:*

Albino Bento  
José Alberto Pereira



## **FICHA TÉCNICA**

**Título:** VI Simpósio Nacional de Olivicultura

**Coleção:** Actas Portuguesas de Horticultura, n.º 21

**Propriedade e edição:** Associação Portuguesa de Horticultura (APH)

Rua da Junqueira, n.º 299, 1300-338 Lisboa

Tel. 213623094

<http://www.aphorticultura.pt/>

**Autores:** vários

**Editores:** Albino Bento e José Alberto Pereira

**Revisão editorial:** Maria Elvira Ferreira

**Grafismo da capa:** Francisco Barreto

**Tiragem:** 200 exemplares

**ISBN:** 978-972-8936-12-9

## Atividade enzimática de leveduras isoladas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes

F. Nogueira, P. Mendes, J.A. Pereira & E.L. Pereira

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança. epereira@ipb.pt

### Resumo

As leveduras estão activamente envolvidas no processo de fermentação da azeitona produzindo compostos com atributos organolépticos importantes e que são fundamentais na qualidade e sabor do produto final. A título de exemplo refere-se a associação de algumas espécies à hidrólise da oleuropeína catalisada pela enzima  $\beta$ -glucosidase. A dominância de leveduras na fase final de fermentação de azeitonas de mesa pode ser explicada pela sua tolerância aos compostos fenólicos e às concentrações de NaCl usadas no processamento de azeitona.

O presente trabalho pretendeu avaliar a atividade enzimática de diferentes isolados de leveduras obtidas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa, da região de Trás-os-Montes. As amostras obtidas de três produtores artesanais foram subdivididas em duas subamostras (salmoura e azeitonas) e os isolados foram identificadas por sequenciação da região D1-D2 do gene 26S rDNA. Posteriormente foi efetuado o *screening* dos isolados de leveduras através de métodos qualitativos para a presença das enzimas catalase,  $\beta$ -glucosidase, protease, amilase e lípases.

No seu conjunto foram identificadas sete espécies de leveduras, nomeadamente *Candida ishiwadae*, *C. boidinii*, *Pichia membranifaciens*, *P. manshurica*, *Saccharomyces paradoxus*, *Sporobolomyces roseus* e *Wickerhamomyces anomalus*. As espécies *C. ishiwadae*, *W. anomalus* e *P. manshurica*, estiveram presentes nos dois substractos, *S. paradoxus* apenas foi observada na polpa, enquanto as restantes ocorreram na salmoura.

A atividade da catalase foi observada em todas as espécies isoladas. *Candida ishiwadae* e *W. anomalus* apresentaram capacidade de produzir  $\beta$ -glucosidase e proteases, tendo sido também detetada a produção de amilases por *W. anomalus*. Das espécies avaliadas, *S. roseus* foi aquela que apresentou maior potencial biotecnológico, visto produzir todas as enzimas testadas. Porém, para uma melhor caracterização destes isolados serão ainda necessários testes adicionais que possibilitarão avaliar inequivocamente as propriedades tecnológicas destas leveduras.

**Palavras-chave:** azeitonas de mesa, salmoura, leveduras, enzimas.

### Abstract

**Enzymatic activity of yeasts isolated in the final stages of natural fermentation of table olives in the region of Trás-os-Montes.**

Yeasts are actively involved in the olive fermentation process producing compounds with important organoleptic attributes which are fundamental to the quality and taste of the final product. For example some species are associated with the hydrolysis of oleuropein catalyzed by the enzyme  $\beta$ -glucosidase. The dominance of

yeast in the final stage of fermentation of table olives can be explained by their tolerance of phenolic compounds and concentrations of NaCl used in the olives processing.

The objective of this work was evaluated the enzymatic activity of different isolated yeasts obtained in the final stage of natural fermentation of table olives in the region of Trás-os-Montes. Samples from three artisan producers were subdivided into two sub-samples (brine and olives) and the isolated were identified by sequencing the D1-D2 region of 26S rDNA gene. Subsequent screening was done for isolated yeasts through qualitative methods for the presence of catalase,  $\beta$ -glucosidase, protease, amylase and lipase.

In total we identified seven species of yeasts, such *Candida ishiwadae*, *C. boidinii*, *Pichia membranifaciens*, *P. manshurica*, *Saccharomyces paradoxus*, *Sporobolomyces roseus* e *Wickerhamomyces anomalus*. The species *C. ishiwadae*, *W. anomalus* and *P. manshurica* were present in both substrates, *S. paradoxus* was observed only in the pulp, while the remaining yeasts occurred in the brine.

The activity of catalase was observed in all isolated species. *Candida ishiwadae* and *W. anomalus* showed ability to produce  $\beta$ -glucosidase and proteases, and was also detected the production of amylases by *W. anomalus*. Of species assessed, *S. roseus* was the one that showed the greatest potential biotechnological because produced all the enzymes tested. However, for a better characterization of these yeasts additional testing is still needed that will enable evaluate clearly the technological properties of these yeasts.

**Keywords:** table olives, brine, yeasts, enzymes.

## Introdução

As azeitonas de mesa são um alimento muito ingerido e apreciado nos países da bacia do Mediterrâneo, onde se concentra a maioria da sua produção. Antes de se tornarem edíveis, as azeitonas não processadas, sofrem um conjunto de alterações que têm sobretudo a função de remover ou reduzir o amargor, característico de frutos não processados. De entre os métodos mais usuais de preparação de azeitonas de mesa, destaca-se a fermentação natural, onde os microrganismos desempenham um papel importante.

As leveduras estão envolvidas no processo de fermentação de azeitonas de mesa produzindo compostos voláteis e metabolitos com atributos organolépticos importantes que determinam a qualidade e o sabor do produto final (Hernández et al., 2007; Arroyo-López et al., 2008; Tofalo et al. 2012). Algumas espécies estão associadas à hidrólise de oleuropeína, catalisada pela enzima  $\beta$ -glucosidase, contribuindo para a remoção do amargor natural presente nas azeitonas. Contudo, algumas estirpes podem causar efeitos negativos como formação de gases, amolecimento da polpa, turvação da salmoura, abaulamento das embalagens ou produção de odores e sabores indesejáveis (Arroyo-López et al., 2008).

Uma vez que Trás-os-Montes é uma das regiões do país onde a produção de azeitona de mesa por fermentação natural maior relevância tem, pretendeu-se com o presente trabalho por um lado identificar leveduras existentes na microflora natural na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região e por outro proceder

à avaliação da sua atividade enzimática, como primeiro passo para uma possível utilização em trabalhos futuros.

### Material e Métodos

As amostras de azeitonas de mesa, cv. Cobrançosa, foram recolhidas na fase final de fermentação natural diretamente de três produtores artesanais da região de Mirandela e de Valpaços. As amostras, num total de 8, foram recolhidas diretamente dos recipientes de fermentação dos proprietários para frascos esterilizados e transportadas para o laboratório sob refrigeração, num curto espaço de tempo. Em laboratório, procedeu-se à separação de subamostras das duas componentes recolhidas, isto é a água de salmoura e o fruto (azeitona de mesa), através da medição de 25 ml da solução de salmoura e da pesagem de frutos suficientes para a obtenção de 25 g de polpa de azeitona. O isolamento das leveduras foi efetuado em meio *Potato Dextrose agar* (PDA) com adição de 100 mg/L de cloranfenicol (Oxoid, Cambridge, UK), seguida de incubação durante 3 a 5 dias a temperatura de 25°C. Posteriormente selecionaram-se de forma aleatória algumas colónias isoladas tendo-se repicado para placas com meio PDA, para obtenção de culturas puras. Os isolados foram posteriormente identificadas por sequenciação da região D1-D2 do gene 26S rDNA num laboratório externo.

Para a avaliação da atividade enzimática das leveduras identificadas foi efetuado um *screening*, através de métodos qualitativos, para a presença das enzimas catalase, protease,  $\beta$ -glucosidase, amilase, esterase e lípase. A atividade da catalase foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Whittenbuty (1964), através da adição direta de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) nas colónias de leveduras. A produção de proteases extracelulares através do espalhamento do inoculo em placas com meio PDA com 20 g/L de caseína, seguido de um período de incubação de 5 dias a 30°C (Strauss et al., 2001), considerando-se resultado positivo a presença de uma zona clara em torno da colónia. A atividade  $\beta$ -glucosidase de acordo com o método descrito por Bautista-Gallego et al. (2011) usando 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco) suplementado com 5g/L de arbutina e 20 g/L de agar ajustado para pH 5,0 com 0,1 N de HCl. Após autoclavar o meio de cultura adicionou-se 2 ml de solução de citrato férrico amoniacal (1%), por 100 mL de meio fundido. Após inoculação das leveduras e incubação a 25°C durante 8 dias, considerou-se resultado positivo a presença de cor castanha escura à volta das colónias. A pesquisa de amilase foi efetuada recorrendo a um meio de cultura com amido (2 g/L). No final do período de incubação, 5 dias a 37°C, adicionou-se solução de lugol a cada placa, considerando-se reação enzimática positiva a formação de um halo de cor castanha em torno das colónias. As atividades da esterase e lípase foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Gupta et al. (2003), usando o meio agar base tributirina e o agar base tributirina adicionado de 1mL/100mL de azeite, respetivamente. O aparecimento de um halo translúcido, após o período de incubação, foi considerado resultado positivo.

Todos os testes foram realizados em triplicado, para cada uma das amostras avaliadas e os resultados expressos de forma qualitativa como “-” (nenhuma atividade), “+” (fraca atividade), “++” (moderada atividade) e “+++” forte atividade. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em termos de presença (p) ou ausência (0).



## Resultados e Discussão

Durante a realização do presente trabalho, no conjunto da salmoura e polpa de azeitona, foi identificada a presença de sete espécies de leveduras, nomeadamente: *Candida ishiwadae*, *C. boidinii*, *Pichia membranifaciens*, *P. manshurica*, *Saccharomyces paradoxus*, *Sporobolomyces roseus* e *Wickerhamomyces anomalus* (quadro 1). O maior número de espécies ocorreu na salmoura. Nesta solução, as leveduras identificadas foram *C. ishiwadae*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* (também designada por *Pichia galeiformis*), *S. paradoxus*, *S. roseus* e *W. anomalus* (anteriormente designada *Pichia anomala*).

Nas amostras analisadas, *P. manshurica* e *W. anomalus* foram as leveduras mais frequentes quer na polpa de azeitona quer na salmoura (quadro 1). Estas duas espécies foram também das mais abundantes no trabalho efetuado por Bautista-Gallego et al. (2011) em fermentações industriais de azeitonas verdes estilo sevilhano, Cv. Gordal e Manzanilha, na região da Andaluzia (Espanha).

*P. membranifaciens*, que foi isolada exclusivamente na salmoura, tem sido frequentemente detetada em diversas preparações de azeitonas verdes e pretas (Coton et al., 2006; Rodríguez-Gómez et al., 2010), bem como a *W. anomalus* (Hernández et al., 2007). Estas duas espécies foram descritas por Hernández et al. (2007) como sendo as predominantes na salmoura de azeitonas naturais de diferentes regiões de Portugal.

*C. boidinii* é uma das espécies mais referenciada pela literatura, pela sua abundante presença nas azeitonas de mesa de fermentação natural (Coton et al., 2006; Arroyo-López et al., 2008; Hurtado et al., 2008; Rodríguez-Gómez et al., 2010) e também na polpa de azeitonas mistas de fermentação natural, provenientes do mercado tradicional (Pereira et al., 2008). Contudo, no presente trabalho, esta espécie foi apenas isolada na salmoura.

*C. ishiwadae*, que esteve presente quer na polpa quer na salmoura das amostras avaliadas, foi apenas indicada por Coton et al. (2006) na salmoura de amostras de azeitonas pretas ao natural, considerada por estes autores como uma nova espécie presente em azeitonas.

*S. roseus*, levedura com coloração alaranjada/salmão devido à presença de um pigmento carotenoide e isolada apenas na salmoura da amostra 1, foi também observada por Kotzekidou (1997) em azeitonas pretas de estilo grego.

Do género *Saccharomyces* a mais comum é a *S. cerevisiae* referenciada por Alves et al. (2012), como sendo das espécies mais isoladas na salmoura de azeitonas verdes quebradas, e por Rodríguez-Gómez et al. (2010), como sendo uma levedura associada à fermentação das azeitonas. Tendo em conta que as amostras analisadas se encontravam na fase final de fermentação, esta levedura não foi detetada. Deste género apenas foi isolada a *S. paradoxus*, cuja presença em azeitonas de mesa não é referenciada na bibliografia.

No quadro 2 apresentam-se os resultados respeitantes à avaliação da atividade enzimática das leveduras identificadas, através de testes qualitativos.

A atividade da  $\beta$ -glucosidase é evidenciada pela maioria das estirpes identificadas, com exceção da *P. manshurica* isolada na polpa e salmoura e *C. boidinii* isolada na salmoura (quadro 2). Bautista-Gallego et al. (2011) referem também considerável produção de  $\beta$ -glucosidase em *W. anomalus* isolada de azeitonas preparadas pelo estilo grego e sevilhano. A presença de microrganismos com

atividade  $\beta$ -glucosidase é conveniente no processo de fermentação de azeitonas, uma vez que podem hidrolisar a oleuropeína, removendo assim a amargura natural presente nas azeitonas de mesa (Arroyo-López et al., 2008).

Das leveduras identificadas no presente trabalho (quadro 2), apenas *S. roseus* apresentou atividade lipolítica e esterásica. No que respeita a estas enzimas, Bautista-Gallego et al. (2011) detetaram a sua atividade em *W. anomalus* isolada da cv. Gordal. Contudo, estes autores verificaram que a mesma espécie quando isolada da cv. Manzanilha não apresentava qualquer atividade. No mesmo trabalho, e à semelhança do observado por Rodríguez-Gómez et al. (2010), foi detetada atividade lipolítica em *C. boidinii* obtida da cv. Manzanilha.

A presença de leveduras com atividade esterásica e lipolítica são desejáveis durante a fermentação, uma vez que podem melhorar o sabor das azeitonas de mesa, através da formação de compostos voláteis produzidos pelo catabolismo dos ácidos gordos livres (Hernández et al., 2007; Rodríguez-Gómez et al., 2010).

Em relação à atividade da enzima catalase, todos os isolados de leveduras testados exibiram essa atividade (quadro 2). Também Hernández et al. (2007) e Bautista-Gallego et al. (2011) detetaram atividade desta enzima para a maioria dos isolados testados. Segundo Hernández et al. (2007), estirpes catalase positivas são desejáveis durante a fermentação porque podem contribuir para a preservação de azeitonas, reduzindo a oxidação de ácidos gordos insaturados e pela formação de peróxido de hidrogénio.

A atividade da amilase foi apenas evidenciada pelas leveduras *W. anomalus* e *S. roseus* (quadro 2). Os microrganismos com a capacidade de produzir amilases podem ser utilizados para diversos fins biotecnológicos, sendo o exemplo da indústria alimentar, onde estes podem eliminar a turvação produzida pelos amidos em diversos produtos.

Convém realçar que *S. roseus*, pouco frequente em azeitonas de mesa, foi a que apresentou uma maior atividade enzimática, pois produziu todas as enzimas testadas.

### Conclusões

No presente trabalho, *P. manshurica*, *W. anomalus* seguida de *C. ishiwadae* foram as leveduras predominantes na fase final de fermentação na polpa de azeitona e salmoura. Todas as leveduras testadas apresentaram atividade da enzima catalase. A atividade da  $\beta$ -glucosidase é evidenciada pela maioria das estirpes identificadas, com a exceção da *P. manshurica* e *C. boidinii*. Das leveduras isoladas e testadas apenas *S. roseus* apresentou atividade lipolítica e esterásica. Porém, para uma melhor caracterização destes isolados serão ainda necessários testes adicionais que possibilitarão avaliar inequivocamente as propriedades tecnológicas destas leveduras.

### Agradecimentos

Trabalho financiado no âmbito do Projeto SUB-IOC-TEC 11/12 "Table olives from the northeast of Portugal: Contribution for their characterization and promotion"

### Referências

Alves, M., Gonçalves, T. & Quintas, C. 2012. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives fermentations. Food Control, 23:363-368.

- 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*, 128:189-196.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A. & Arroyo-López, F.N. 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 89-96.
- 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.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupa, N. & Bradoo, S. 2003. Review - Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37:63-71.
- 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*, 24:346-351.
- 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*, 27:604-612.
- Strauss, M.C.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. & Reuburg, V.P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91:182-190.
- Whittenbury, R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*, 35: 13-26.

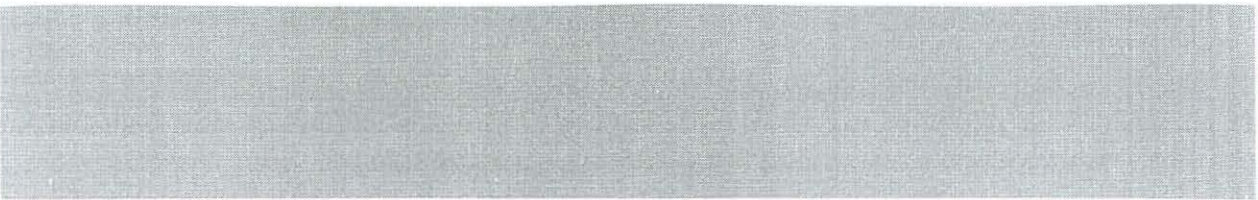


Quadro 1 - Espécies de leveduras identificadas na polpa de azeitona e na salmoura das amostras analisadas.

Espécies	Número da amostra	Polpa	Salmoura
<i>Candida boidinii</i>	7	-	+
<i>Candida ishiwadae</i>	1, 5	+	+
<i>Pichia manshurica</i>	4, 5, 8	+	+
<i>Pichia membranifaciens</i>	1	-	+
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	6	+	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4, 5, 8	+	+

Quadro 2 - Atividade enzimática das leveduras identificadas na polpa de azeitona e na salmoura.

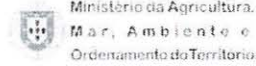
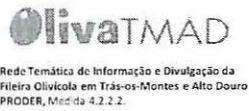
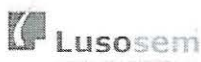
Espécies	Substrato	Protease	$\beta$ -Glucosidase	Amilase	Esterase	Lipase	Catalase
<i>C. boidinii</i>	Salmoura	-	-	-	-	-	P
<i>C. ishiwadae</i>	Azeitona	+++	+++	-	-	-	P
<i>C. ishiwadae</i>	Salmoura	+++	+++	-	-	-	P
<i>P. manshurica</i>	Azeitona	-	-	-	-	-	P
<i>P. manshurica</i>	Salmoura	-	-	-	-	-	P
<i>P. membranifaciens</i>	Salmoura	-	+	-	-	-	P
<i>S. paradoxus</i>	Azeitona	-	++	-	-	-	P
<i>S. roseus</i>	Salmoura	+++	+++	++	++	++	P
<i>W. anomalus</i>	Salmoura	+++	+++	++	-	-	P



Apoios



Patrocinadores



Media Partner

