

Perfis microbiológico e químico da fermentação de azeitona tipo verde estilo sevilhano da cultivar 'Azeitona' ou 'Azeitoneira' em duas datas de colheita

Microbiological and chemical profiles of Spanish-style green olives fermenting process of the Portuguese cultivar 'Azeitona' or 'Azeitoneira', at two harvesting timings

Cristina J. M. Pintado¹, Fátima Peres², Cidália Peres^{1,3}

¹ENMP, Departamento de Olivicultura, Apart. 6, 7350-951 Elvas, cristinapintado@mail.pt

²Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Apart. 119, 6001-909 Castelo Branco,

³INIAP/EAN, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

RESUMO

Os perfis microbiológico e químico da fermentação de azeitona da cultivar 'Azeitona' ou 'Azeitoneira' tipo verde estilo sevilhano, preparada com frutos em dois estados de maturação distintos, demonstraram a aptidão desta cultivar para o referido processamento, potenciando a diversificação e valorização dos produtos do olival. Observaram-se uma maior e mais rápida acidificação da salmoura no processo de fermentação dos frutos colhidos no estado de maturação mais tardio e a conseqüente redução do período de sobrevivência das bactérias Gram-negativas, minimizando o risco de deterioração do produto na fase inicial do processo.

Palavras-chave: *Olea europaea*; azeitona de mesa; fermentação; maturação; flora microbiana; parâmetros químicos

ABSTRACT

The microbiological and chemical profiles of Spanish-style green olives fermenting process from the Portuguese cultivar 'Azeitona' ou 'Azeitoneira', with fruits at two different harvesting dates, showed that this cultivar could be processed in such way, promoting olive products diversification. Spontaneous fermentation pattern of later harvesting date revealed quicker and higher brine acidification and a Gram negative survival period reduction, which could contribute to minimize the risk of spoilage during the first days of fermentation.

Key-words: *Olea europaea*; table olives; fermentation; ripening; microflora; chemical parameters

1 – INTRODUÇÃO

A elevada aptidão da cultivar portuguesa 'Azeitona' para preparação de azeitona de mesa, reconhecida pela sua inclusão entre as cultivares para preparação de "Azeitonas de

Conserva de Elvas e Campo Maior” (EEC, 2005) e o seu relativamente baixo rendimento em matéria gorda poderão justificar que esta cultivar também seja designada por ‘Azeitoneira’, como refere Leitão *et al.* (1986). A preparação desta azeitona tipo verde estilo sevilhano enquadra-se numa estratégia de diversificação dos produtos do olival.

O processamento de azeitona estilo sevilhano inclui as operações de tratamento alcalino, de lavagem, de fermentação e de conservação. O tratamento alcalino, que consiste na imersão dos frutos numa solução de hidróxido de sódio, promove a hidrólise da oleuropeína e a maior permeabilização dos tecidos, propiciando a disponibilização de nutrientes para o posterior desenvolvimento da fermentação. Geralmente, este tratamento é interrompido quando a solução alcalina atinge 2/3 da distância entre a epiderme e o endocarpo (Kopsidas, 1991; Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Chammem *et al.*, 2005). O período de contacto da solução com os frutos depende especialmente da concentração da solução de hidróxido de sódio, da temperatura ambiente, da cultivar e do tamanho e estado de maturação dos frutos (Kopsidas, 1991); Consequentemente, a homogeneidade do produto final está estreitamente relacionada com a homogeneidade da matéria-prima.

A etapa seguinte é a de lavagem que poderá incluir um ou dois períodos de imersão dos frutos em água, totalizando 12 a 18 horas (Sánchez *et al.*, 2000, 2001; de Castro *et al.*, 2002; Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Chammem *et al.*, 2005). Lavagens pouco intensas proporcionam frutos com maior intensidade de amargor, com hidróxido de sódio residual e elevado pH, o que potencia a ocorrência de alterações. Por outro lado, lavagens intensas podem conduzir à lixiviação excessiva de substratos fermentescíveis (Borbolla y Alcalá & Rejano, 1978). Posteriormente, os frutos são colocados em salmoura onde decorrerá a fermentação. Chammem *et al.* (2005) concluiu que, para a cultivar tunisina ‘Meski’, o tratamento alcalino com uma solução de 2% de NaOH e salmoura de 9% permitiram o melhor desenvolvimento da fermentação.

Na qualidade dos produtos de origem vegetal, a data de colheita assume uma importância fulcral. A colheita de azeitona para preparação tipo verde estilo sevilhano deverá ser iniciada quando o endocarpo estiver totalmente desenvolvido e o fruto atingir o tamanho máximo e coloração verde-amarelada. Estas características estão intimamente relacionadas com diversos factores em que se destacam as características intrínsecas da cultivar e as condições edafo-climáticas.

Em azeitona de mesa, o estudo da evolução da fermentação inclui a análise integrada da dinâmica da microflora característica, bactérias Gram-negativas e lácticas e leveduras, e de parâmetros físico-químicos da salmoura, nomeadamente, o pH, a acidez livre, a acidez volátil e a concentração de cloreto de sódio (Borbolla y Alcalá & Rejano, 1978, 1981; Sánchez *et al.*, 2000, 2001; de Castro *et al.*, 2002; Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Montañó *et al.*, 2003; Chammem *et al.*, 2005).

Neste trabalho traçaram-se os perfis microbiológico e físico-químico das salmouras de fermentação da cultivar ‘Azeitoneira’ tipo verde estilo sevilhano, preparadas com frutos em dois estados de maturação distintos, de forma a concluir sobre a aptidão da cultivar para este tipo de processamento e o efeito do estado de maturação no processo da fermentação.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de azeitona tipo verde estilo sevilhano

Na campanha de 2005, foi colhida azeitona verde da cultivar 'Azeitoneira' a 29 de Setembro e a 17 de Outubro, num olival em Protecção Integrada situado em Campo Maior (Norte Alentejo). Os frutos foram limpos e classificados numa unidade industrial da região, utilizando azeitonas de primeira classe para os ensaios (NP-3034, 1987).

Os frutos foram colocados numa solução de 1,5% (m/v) de hidróxido de sódio até que o NaOH penetrou, aproximadamente, 2/3 da espessura da polpa das azeitonas. A penetração de NaOH no fruto foi confirmada pela coloração rosa dos tecidos da polpa, após adição de algumas gotas de fenolftaleína. Realizou-se uma primeira lavagem com água em jacto durante 15-20 minutos, seguida de 4 horas de permanência em água e finalmente uma lavagem de 12 horas. Posteriormente, os frutos foram colocados em recipientes de plástico com 30L de capacidade e cobertos com salmoura a 8,0% (m/v) de NaCl. A temperatura da sala de fermentação durante o ensaio foi de 25-30 °C.

Ao longo da fermentação foram recolhidas amostras de salmoura da zona central de cada fermentador. Os resultados utilizados para traçar os perfis microbiológico e físico-químico de cada data de colheita correspondem ao valor médio de dois fermentadores.

Análises microbiológicas das salmouras

Foram inoculadas em meio selectivo alíquotas ou diluições sucessivas de salmoura e, após incubação, contaram-se as unidades de formação de colónias (UFC). A contagem de colónias de bactérias Gram-negativas foi feita após crescimento a 30°C durante 24 horas em VRBD (Merck). As colónias de bactérias lácticas foram quantificadas em MRS (Oxoid) com azida de sódio (10 %, m/v) (Sigma-Aldrich) após incubação a 30°C durante 72 horas; a quantificação de colónias de leveduras e fungos realizou-se depois 72 horas de incubação a 28°C em DG18 (Oxoid) com cloranfenicol (Oxoid).

Análises físico-químicas das salmouras

Os parâmetros físico-químicos analisados na salmoura foram o pH; a acidez livre e a acidez volátil, expressas em percentagem de ácido láctico (m/v), e a concentração de cloreto de sódio apresentada em percentagem de NaCl (m/v).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas datas de colheita, os frutos apresentaram coloração verde-amarelada e tamanho característicos da cultivar. Apenas na data de colheita mais tardia se observou o fácil desprendimento da polpa do caroço quando, após corte transversal, se exerceu um movimento rotacional dos frutos colocados entre o indicador e o polegar, e a libertação de um "fluido leitoso" da polpa, após pressão sobre a mesma. Estes indicadores confirmaram estados de maturação distintos das matérias-primas colhidas no final de Setembro e em meados de Outubro.

Nos frutos colhidos em Outubro, a penetração de NaOH alcançou 2/3 da polpa após 6 horas de contacto com a solução, corroborando o procedimento utilizado para as cultivares

'Conservolea' com uma solução de 1,6% de NaOH (à temperatura de 25°C) (Kopsidas, 1991) e 'Manzanilla' com soluções de aproximadamente 2% de NaOH (Sánchez *et al.*, 2000, 2001; de Castro *et al.*, 2002; Leal- Sánchez *et al.*, 2003).

Nos frutos colhidos em Setembro, em estado de maturação menos avançado, a solução alcalina apenas tinha iniciado a penetração da polpa decorridas 13 horas de imersão. Perante a difícil progressão da solução de hidróxido de sódio nestes frutos, substituiu-se a solução alcalina por água onde as azeitonas permaneceram durante a noite (9 horas). No dia seguinte, os frutos foram submersos numa solução de hidróxido de sódio a 1,5% e, transcorridas 2 horas de imersão, o NaOH penetrou 2/3 da distância entre a epiderme e o endocarpo. Kopsidas (1991) refere a importância das propriedades de textura na progressão de NaOH nos frutos, salientando que em azeitonas com elevada dureza do epicarpo e do mesocarpo, características de estados de maturação menos avançados, será necessário um tratamento alcalino mais prolongado ou uma solução mais concentrada.

A fermentação dos frutos de ambas as datas de colheita poder-se-á descrever em três fases (Borbolla y Alcalá & Rejano, 1981). Na primeira fase, durante os primeiros 5 dias de fermentação, registou-se uma acidificação do meio até valores próximos de pH 6 (Fig. 3). Decorridos 5 dias, as salmouras dos frutos das duas datas de colheita apresentaram níveis populacionais similares de Gram-negativas (10^7 UFC.ml⁻¹), de bactérias lácticas (10^3 - 10^4 UFC.ml⁻¹) e de leveduras (10^2 - 10^3 UFC.ml⁻¹) (Fig. 1) (Sánchez *et al.*, 2000) e valores médios da acidez livre inferiores a 0,15% de ácido láctico (Fig. 2) (Sánchez *et al.*, 2001; de Castro *et al.* 2002; Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Chammem *et al.* 2005).

A segunda fase da fermentação caracterizou-se pelo aumento pronunciado das bactérias lácticas e das leveduras e o desaparecimento das bactérias Gram-negativas (<10 UFC.ml⁻¹) (Fig. 1). Entre os 5 e 12 dias de fermentação, observou-se a quase duplicação dos teores de acidez livre na salmoura das azeitonas da primeira data de colheita (de 0,06 para 0,14% de ácido láctico) e a quadruplicação deste parâmetro na salmoura correspondente à segunda data de colheita (de 0,09 para 0,33%) (Fig. 2). Este facto esteve associado ao maior crescimento da população de bactérias lácticas (Fig. 1), o que poderá estar relacionado com uma maior disponibilidade de substratos fermentescíveis, nesta fase inicial da fermentação, na salmoura dos frutos em estado de maturação mais avançada.

A Figura 1 mostra a evolução da população de bactérias lácticas com o tempo de fermentação, registando-se uma evolução linear entre os 12 e os 33 dias para os frutos da primeira data de colheita ($y= 0,29x + 0,004$; $R^2=0,967$) e entre 5 e 26 dias de fermentação para as azeitonas da segunda data de colheita ($y= 0,26x + 3,244$; $R^2=0,989$), o que revela taxas de crescimento semelhantes destes microorganismos nos referidos períodos. Paralelamente, entre os 12 e os 40 dias de fermentação, a taxa de acidificação das duas salmouras foi similar (0,017% de ácido láctico.dia⁻¹), atingindo 0,59 e 0,80% de ácido láctico após 40 dias de fermentação nas salmouras dos frutos da primeira e segunda datas de colheita, respectivamente (Fig. 2). Os resultados obtidos parecem indicar que nas salmouras dos frutos em estado de maturação menos avançado existe uma menor disponibilidade de nutrientes fermentescíveis no período inicial da segunda fase da fermentação, ou seja, de 5 a 12 dias. Posteriormente, evolui para um meio de nutritivo propício ao desenvolvimento da microflora láctica (Fig. 1), com a conseqüente acidificação (Fig. 1) e decréscimo de pH (Fig. 3).

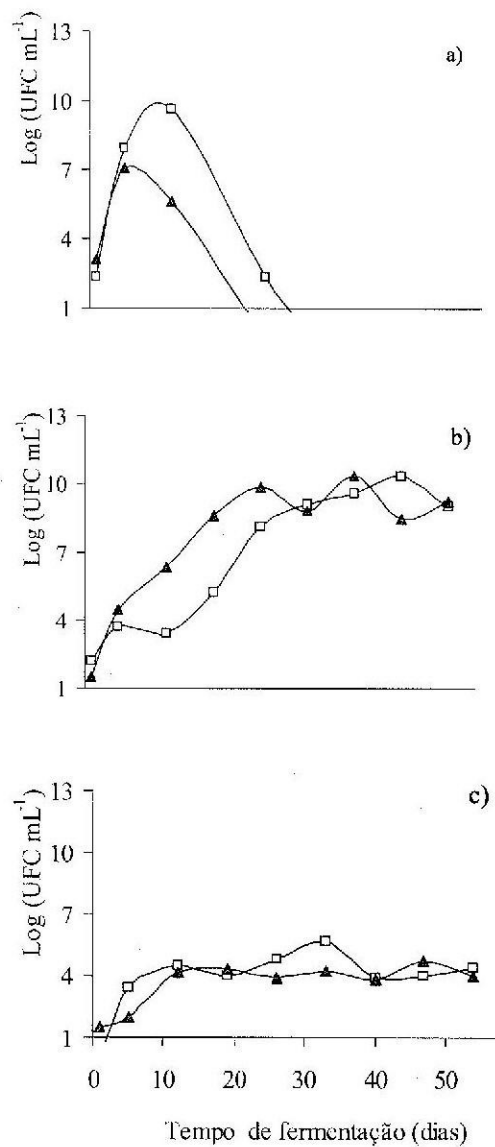


Figura 1 - Evolução da flora microbiana das salmouras durante a fermentação de frutos 'Azeitira' tipo verde e estilo sevillano colhidos em final de Setembro (□) e meados de Outubro (▲): a) Bactérias Gram-negativas; b) Bactérias lácticas; c) Leveduras e Fungos.

A acentuada acidificação do meio iniciada na primeira fase prolongou-se até que se registaram valores de aproximadamente pH 4,5, seguindo-se uma diminuição paulatina deste parâmetro até aos 54 dias de fermentação (Fig. 3). Após 12 dias, a salmoura dos frutos da primeira colheita apresentou características menos ácidas (pH=5,2) do que a salmoura

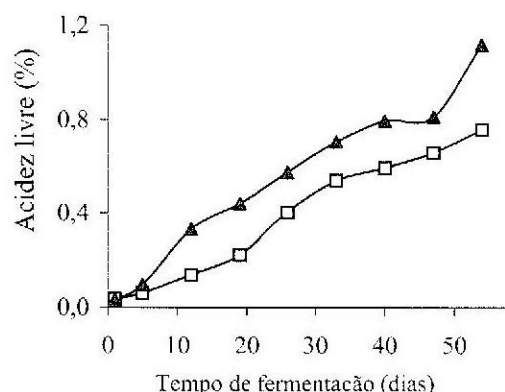


Figura 2 - Evolução da acidez livre das salmouras durante a fermentação de frutos 'Azeitira' tipo verde e estilo sevillano colhidos em final de Setembro (□) e meados de Outubro (▲).

dos frutos da colheita mais tardia com um pH 4,5 (Sánchez *et al.*, 2001; de Castro *et al.*, 2002), em que evolução da última foi similar à fermentação considerada mais eficiente por Chammem *et al.* (2005). Na salmoura dos frutos da primeira data de colheita, só após 26 dias de fermentação o pH alcançou valores próximos de 4,5. Os valores de pH menos ácidos na salmoura dos frutos da primeira colheita reflectem a evolução da acidez livre apresentada na Fig. 2, estreitamente relacionada com a evolução da população de bactérias lácticas (Fig. 1), como foi anteriormente referido, e poderão também estar associados ao tratamento alcalino mais prolongado a que estes frutos foram submetidos e à consequente perda de nutrientes por maior lixiviação.

Na segunda data de colheita, após 26 dias de fermentação verificou-se o desaparecimento das bactérias Gram-negativas, coincidindo com uma elevada população de bactérias lácticas (10^9 UFC.mL⁻¹) (Fig. 1) em que alguns géneros poderão ser produtores de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (Delgado *et al.*, 2005).

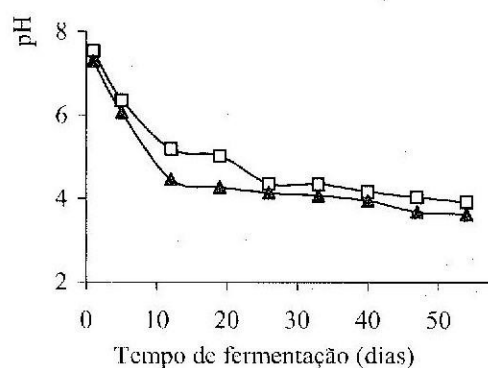


Figura 3 - Evolução do pH das salmouras durante a fermentação de frutos 'Azeitira' tipo verde e estilo sevillano colhidos em final de Setembro (□) e meados de Outubro (▲).

O desaparecimento deste grupo de microorganismos também coincide com valores médios de acidez livre superiores a 0,5% (Fig. 2) e de pH inferiores a 4,5 (Fig. 3) (Sánchez *et al.*, 2001; de Castro *et al.*, 2002; Chammem *et al.*, 2005). Nas salmouras dos frutos da primeira data de colheita, o desaparecimento das bactérias Gram-negativas ocorreu uma semana mais tarde, verificando-se as condições anteriormente referidas (Figs. 1, 2 e 3). A redução desta fase é muito importante na medida em que é nos primeiros dias de fermentação que poderão desencadear-se as alterações de origem microbiana (Sánchez *et al.*, 2000, 2001; de Castro *et al.*, 2002; Leal- Sánchez *et al.*, 2003).

Na terceira fase, segundo mês da fermentação, observou-se um predomínio das bactérias lácticas (10^9 UFC.ml⁻¹) relativamente às leveduras (10^4 UFC.ml⁻¹) (Fig. 1) e uma redução de 0,5 unidades de pH atingindo, aos 54 dias, valores médios de pH 3,9 e 3,6 nas salmouras dos frutos da primeira e da segunda datas de colheita, respectivamente (Fig. 3).

Relativamente ao cloreto de sódio nas salmouras, registou-se a estabilização da concentração em torno de 4%, após 12 dias de fermentação (Fig. 4).

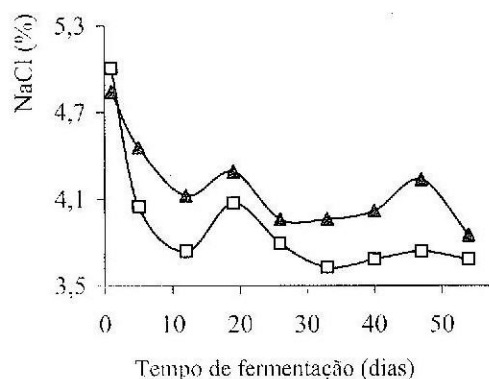


Figura 4 - Evolução da concentração de cloreto de sódio das salmouras durante a fermentação de frutos 'Azeitoneira' tipo verde e estilo sevillano colhidos em final de Setembro (□) e meados de Outubro (▲).

Nos dois meses de fermentação registaram-se valores de acidez volátil inferiores a 0,3% de ácido láctico (dados não apresentados), inferiores aos encontrados em amostras comerciais de diversas cultivares após 6-7 meses em salmoura (Montaño *et al.*, 2003).

De uma forma global, a evolução dos perfis microbiológico e químico das salmouras durante a fermentação demonstraram a aptidão da 'Azeitoneira' para preparação de azeitona de mesa tipo verde estilo sevillano. Registou-se uma maior e mais rápida acidificação da salmoura na fermentação dos frutos colhidos no estado de maturação mais tardio e, conseqüentemente, um menor período de sobrevivência das bactérias Gram-negativas, um dos principais agentes de alteração do produto na fase inicial do processo.

Trabalhos futuros sobre o efeito da data de colheita na fermentação de azeitona e, conseqüentemente, na qualidade do produto final, deverão incluir características

relacionadas com a composição do fruto, nomeadamente o conteúdo em glicídios e em compostos fenólicos, de forma a obter informação sobre os substratos biodisponíveis.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto Agro 463 - Acção 8.1, Medida 8 do Programa AGRO.

BIBLIOGRAFIA

- Borbolla y Alcalá, J.M.R. & Rejano, L., 1978. Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. El lavado de los frutos tratados con lejía. *Grasas y Aceites*, 29: 281-291.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R. & Rejano, L., 1981. Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. La fermentación II. *Grasas y Aceites*, 32: 103-113.
- Chammem, N.; Kachouri, M.; Mejri, M.; Peres, C.; Boudabous, A. & Hamdi, M., 2005. Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. *Bioresource Technology*, 96: 1311-1316.
- de Castro, A.; Montaña, A.; Casado, F.-J.; Sánchez, A.-H. & Rejano, L., 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19: 637-644.
- Delgado, A.; Brito, D.; Peres, C.; Noé-Arroyo, F. & Garrido-Fernández, A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22: 521-528.
- EEC, 2005. Publication of an application for registration pursuant to article 6(2) of Regulation (EEC) No 2081/92 on the protection of geographical indications and designations of origin. *Official Journal of the European Union*, C288/5-C288/8.
- Kopsidas, G. C., 1991. A regression analysis on the green olives debittering. *Grasas y Aceites*, 42: 401-403.
- Leal-Sánchez, M.V.; Ruiz-Barba, J.L.; Sánchez, A.H.; Rejano, L.; Jiménez-Díaz, R. & Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, 20: 421-430.
- Leitão, F.; Potes, F.; Calado, L. & Almeida, F.J., 1986. Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. MAPA/DGPA. Lisboa. 11pp.
- Montaña, 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: 297-302.
- NP-3034, 1987. Norma Portuguesa. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação. 17pp.

Melhoramento, 41: 252-260 (2006)

Sánchez, A.H.; de Castro, A.; Rejano, L. & Montaña, A., 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 5975-5980.

Sánchez, A.-H.; Rejano, L.; Montaña, A. & de Castro, A., 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **67**:115-122.