

31 Actas Portuguesas de Horticultura



VIII

Simpósio Nacional de

OLIVICULTURA



2020



FICHA TÉCNICA

Título: VIII Simpósio Nacional de Olivicultura

Coleção: Actas Portuguesas de Horticultura, N.º 31

Propriedade e edição

Associação Portuguesa de Horticultura (APH)

Rua da Junqueira, 299, 1300-338 Lisboa

<http://www.aphorticultura.pt>

Editores

Nuno Rodrigues

Ana Cristina Ramos

José Alberto Pereira

Grafismo da capa:

Nuno Rodrigues

ISBN: 978-972-8936-38-9

Ano: 2020

Comissões

Comissão organizadora

Ana Cristina Ramos (INIAV; APH)
Cristina Sempiterno (INIAV)
Francisco Pavão (CAP)
José Alberto Pereira (CIMO/ESA-IPB; APH)
Margarida Oliveira (ESA-IPS)
Nuno Barba (ESA-IPS)
Nuno Rodrigues (CIMO/ESA-IPB; APH)
Pedro Jordão (INIAV), Presidente
Rocío Arias Calderón (INIAV; APH)

Comissão científica

Ana Paula Silva (CITAB/UTAD)
António Cordeiro (INIAV)
António Ramos (ESA/IPCB)
Augusto António Peixe (Univ. Évora)
Encarnação Marcelo (INIAV)
Fátima Peres (ESA-IPCB)
Isabel Ferreira (ISA-UL)
José Alberto Pereira (CIMO/ESA-IPB; APH), Presidente
José Peça (Univ. Évora)
Laura Torres (CITAB, UTAD)
Paula Baptista (CIMO/ESA-IPB)
Pedro Reis (INIAV)

Secretariado

Carlos Reis (ESA/IPB)
Marta Madureira (ESA/IPB)

Perfil enzimático de leveduras isoladas durante o processamento de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo

Tatiane Oliveira^{1,2}, Eliane Colla¹, P. Baptista², José A. Pereira² e Ermelinda L. Pereira²

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, 85884-000 Medianeira- Paraná, Brasil, taticgoliveira@outlook.com; ecolla@utfpr.edu.br;

² Centro de Investigação de Montanha (CIMO) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de St^a Apolónia, 5301-855 Bragança, Portugal.

Resumo

No presente trabalho, avaliou-se o perfil enzimático de leveduras isoladas durante o processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo, a mais importante da região do Nordeste de Portugal. Foram testados onze isolados de leveduras, pertencentes aos géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Galactomyces*, através de métodos qualitativos, para a produção de lipase, protease, amilase, xilanase, catalase e β -glucosidase.

A atividade da catalase foi observada em todas as espécies isoladas (*C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. norvegica*, *D. hansenii*, *R. graminis*, *C. boidinii*, *P. guilliermondii*, *R. glutinis*, *P. manshurica* e *G. reessii*). A atividade da amilase foi observada apenas em *G. reessii*. Todas as espécies testadas apresentaram reduzida ou nula atividade para as enzimas xilanase e protease. *R. graminis*, *R. glutinis* e *G. reessi* apresentaram elevada atividade da enzima β -glucosidase e *S. cerevisiae* e *P. manshurica* elevada atividade da enzima lipase. Os resultados obtidos demonstram o potencial de uso de algumas leveduras para fins biotecnológicos, designadamente como culturas *starters* durante o processamento de azeitona de mesa.

Palavras-chave: Lipase, protease, amilase, xilanase, catalase, β -glucosidase

Abstract

The aim of this study was evaluated the enzymatic profile of yeasts isolated during the natural fermentation process of table olives *Negrinha de Freixo* cultivar, the most important of the Northeast region of Portugal. Eleven isolated yeast strains belonging to the genus *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* and *Galactomyces* were tested through qualitative methods for the production of lipase, protease, amylase, xylanase, catalase and β -glucosidase.

The catalase activity was observed in all isolated strains (*C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. norvegica*, *D. hansenii*, *R. graminis*, *C. boidinii*, *P. guilliermondii*, *R. glutinis*, *P. manshurica* and *G. reessii*). Amylase activity was observed only in *G. reessii*. All species tested showed slight or none activity for xylanase and protease enzymes. *R. graminis*, *R. glutinis* and *G. Reessi* showed high activity of β -glucosidase and *S. cerevisiae* and *P. manshurica* showed high lipase activity. The results demonstrate the potential use of some yeast for biotechnological purposes, such as starter cultures for the table olive processing.

Keywords: lipase, protease, amylase, xylanase, catalase, β -glucosidase

Introdução

As leveduras são fungos unicelulares eucariontes amplamente utilizadas para fins biotecnológicos, designadamente na produção de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, enzimas industriais e outros produtos. Várias espécies estão envolvidas na fermentação espontânea de vários produtos alimentares fermentados (Moslehi-jenabian, Pedersen, & Jespersen, 2010). Por exemplo, no processamento da azeitona fermentada as leveduras estão associadas com a produção de uma ampla variedade de compostos que influenciam a textura e o desenvolvimento de aromas típicos das azeitonas de mesa (Arroyo et al. 2008).

Nos últimos anos diversos trabalhos têm enfatizado a importância de selecionar leveduras de produtos fermentados para serem usadas para fins biotecnológicos, designadamente como culturas *starter* ou probióticas em vários produtos alimentares (Gil-Rodríguez et al., 2015; Bonatsou et al., 2015; Syal e Vohra 2013; Bautista-Gallego et al., 2011; Sourabl et al. 2011; Silva et al. 2011). Assim, de forma a selecionar as leveduras com melhor desempenho, são realizados testes para avaliar a atividade enzimática, a atividade antimicrobiana, a produção de enzimas do complexo B, a tolerância aos sais e ao pH, entre outros ensaios.

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu avaliar a capacidade de produção de enzimas de interesse tecnológico por leveduras isoladas durante o processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. Esta azeitona é um produto da região de Trás-os-Montes com denominação de origem protegida (DOP).

Material e Métodos

Um total de 11 espécies de leveduras, previamente identificadas por Pereira et al. (2015), representativas da flora microbiana presente durante o processo de fermentação da azeitona de mesa da cv. Negrinha de Freixo foram testadas quanto à produção das enzimas lipase, protease, amilase, xilanase, catalase e β -glucosidase através de testes qualitativos.

As leveduras isoladas, na polpa da azeitona imediatamente antes do processo fermentativo, na polpa da azeitona em contacto com a salmoura e na salmoura pertencem aos géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Galactomyces*.

Para a pesquisa da enzima catalase utilizou-se o método descrito por Whittenbury (1964), utilizando-se o peróxido de hidrogénio 3% (v/v). A atividade da catalase foi observada através do aparecimento rápido de bolhas de gás. A atividade da protease foi determinada a partir do método descrito por Strauss et al. (2001), através do espalhamento do inoculo em placas com meio *Potato dextrose agar* (PDA) contendo 20 g/L de caseína. Após um período de incubação de 5 dias a 30° C considerou-se positivo a formação de uma zona clara em torno da colónia. Os ensaios para avaliar a atividade da enzima β -glucosidase foram realizados de acordo com o método descrito por Bautista-Gallego et al. (2011), usando arbutina como substrato. O meio basal consistia de 6,7 g/L *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco), suplementado com 5 g/L de arbutina e 20 g/L de agar, ajustado o meio para pH 5,0 com 0,1 N de HCl. Após esterilização do meio adicionou-se por 100 mL de meio 2 mL de solução de citrato férrico amoniacal a 1% (p/v). As leveduras foram inoculadas em estrias radiais e incubadas a 25°C durante 8 dias. As estirpes capazes de hidrolisar o substrato apresentaram uma cor castanho escura à volta das colónias. A atividade da lipase foi realizada a partir do método descrito por Samad et al. (1989), com poucas alterações. O meio *Yeast Extract Agar* (YEA), suplementado com tween 80 (1%) e vermelho de fenol (0,01%), foi ajustado para pH 7,3–7,4 utilizando 1N NaOH. As placas

foram inoculadas com as leveduras e incubadas a 37° C por 48 horas. O resultado foi observado a partir da mudança de cor do meio. A atividade da amilase foi realizada utilizando o meio agar de amido constituído por peptona (10 g/L), extracto de levedura (5 g/L), NaCl (5 g/L), amido (2 g/L) e agar (15 g/L). O pH deste meio foi ajustado para 6,8±0,2 com 0,1 N HCl. Após inoculação das leveduras as placas foram incubadas a 30° C durante 5 dias. Ao fim desse período, adicionou-se às culturas uma solução de lugol tendo-se considerado reação enzimática positiva a formação de um halo de cor castanha em torno das colónias. Para analisar a capacidade das leveduras produzirem a enzima xilanase, seguiu-se o método descrito por Hernández et al. (2007). Para o efeito, utilizou-se o meio YEA suplementado com xilano (5 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L) e NaCl (5 g/L). Após sementeira do meio as placas foram incubadas a 25° C durante 10 dias. A presença da enzima xilanase foi observada pelo aparecimento de um halo claro ao redor das colónias.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado para cada um dos isolados e os resultados expressos de forma qualitativa, onde “-“ atividade nula; “+” atividade fraca; “++” atividade moderada e “+++” atividade forte. Para a pesquisa da catalase os resultados foram expressos em termos de presença “P” ou ausência “0”.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da atividade enzimática apresentado por cada isolado testado.

Todas as estirpes avaliadas apresentaram atividade da enzima catalase. Resultados semelhantes também foram observados por Nogueira et al. (2012), Bautista-Gallego et al. (2011) e Hernández et al. (2007) na maioria das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona. Esta enzima tem a capacidade de reduzir a oxidação de ácidos gordos insaturados e a formação de peróxido de hidrogénio contribuindo para a preservação das azeitonas (Hernández et al., 2007).

Os resultados relacionados com a produção da enzima lipase mostraram que todos os isolados testados, à exceção da *G. reessii*, foram capazes de hidrolisar os triglicéridos presentes, podendo-se destacar com forte produção as estirpes *P. manshurica* e *S. cerevisiae*. Porém, Rodríguez-Gómez et al. (2010) não observaram nenhuma atividade desta enzima em *S. cerevisiae* isolada em azeitonas pretas. De acordo com estes autores, esta atividade é desejável em leveduras fermentativas porque pode melhorar o sabor da azeitona através da formação de compostos voláteis produzidos pelo catabolismo dos ácidos gordos livres.

A atividade da protease, detetada pela formação de um halo claro ao redor das colónias de leveduras, foi fraca em *C. tropicalis*, *C. norvegica*, *C. boidinii*, *S. cerevisiae*, *R. graminis*, *R. glutinis*, *P. membranifaciens* e *D. hansenii*, verificando-se nessas espécies um pequeno halo quase imperceptível. A ausência de halo foi observada em *P. manshurica*, *G. reessii* e *P. guilliermondii*. Atividade forte desta enzima foi mencionada por Bautista-Gallego et al. (2011) em *P. galeiformis* isolada de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas. Esta enzima tem várias aplicações em diferentes indústrias. Tem a capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas levando à formação de grupos amina (NH₂) e carboxila (COOH), originando polipeptídeos de menor peso molecular e/ou aminoácidos livres.

Os isolados que apresentaram atividade da enzima β-glucosidase foram identificados através do aparecimento de uma coloração castanha escura ao redor das colónias no meio de cultura com arbutina. *R. glutinis*, *R. graminis* e *G. reessii* apresentaram forte atividade desta enzima, enquanto que *C. norvegica* e *P. guilliermondii* apresentaram

moderada atividade. Atividade nula desta enzima foi observada em *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *C. boidinii* e *P. manshurica* (Tabela 1). Nogueira et al (2012) referem igualmente nula produção desta enzima para as leveduras *C. boidinii* e *P. manshurica* isoladas no final da fermentação da azeitona da cv. Cobrançosa. Esta enzima tem a capacidade de clivar as ligações β -glucosídicas em diversos substratos. No processo de fermentação da azeitona está envolvida na biodegradação dos polifenóis presentes no fruto da azeitona, causando a diminuição do teor de oleuropeína, composto que provoca o amargor do fruto, melhorando assim as características sensoriais no produto final (Arroyo-lópez et al., 2012).

Em relação à atividade da amilase, apenas a *G. reessii* mostrou fraca atividade e as restantes espécies apresentaram atividade nula. Esta enzima apresenta grande importância em biotecnologia com principal aplicação na indústria alimentícia (Spier et al., 2006).

Relativamente à xilanase, as estirpes *D. hansenii* e *P. manshurica* mostraram nula atividade enquanto que as restantes exibiram fraca atividade. Bautista-Gallego et al (2011) não observaram atividade desta enzima em leveduras isoladas de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas. Esta enzima tem sido associada ao amolecimento dos frutos da azeitona sendo este aspeto indesejável durante o processo de fermentação da azeitona (Hernández et al., 2007).

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram o potencial uso das espécies *R. graminis*, *R. glutinis* e *G. reessii* como produtoras da enzima β -glucosidase e das espécies *P. manshurica* e *S. cerevisiae* como produtoras da enzima lipase. Contudo, serão necessários testes adicionais para melhor caracterizar estes isolados, de forma a possibilitar o seu uso como culturas *starter* no processo de fermentação de azeitonas de mesa, a fim de promover um produto final com melhores características nutricionais e tecnológicas, bem como com maior tempo de vida útil.

Referências

- 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.
- 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.
- Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, 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.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1156–1162.
- 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.

- Moslehi-jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients*, 2, 449–473.
- Nogueira, F., Mendes, P., Pereira, J.A., & Pereira, E. L. (2012). Atividade enzimática de leveduras isoladas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes. In VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012, Atas Portuguesas de Horticultura, nº 21, 315-321.
- 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.
- 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.
- Samad, M. Y., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. M. Zin Wan, Ampon, K., & Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9(1), 51-56.
- 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.
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potencial of yeasts isolated from traditional indian fermented foods
- Spier, M. R., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2006). Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using Agro industrials Products. *International Journal of Food Engineering*, 2(3), Art 6.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Rensburg, P. Van. (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 Gen. Microbiology*, 35, 13–26.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 - Resultados médios da atividade enzimática das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona da cv. Negrinha de Freixo.

Espécie	Substrato	Catalase	Lipase	Protease	Amilase	β -Glucosidase	Xilanase
<i>C. tropicalis</i>	Polpa ¹	P	+	+	-	+	+
<i>P. membranifaciens</i>	Polpa ¹	P	+	+	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	Polpa ¹	P	+++	+	-	-	+
<i>C. norvegica</i>	Polpa ²	P	+	+	-	++	+
<i>D. hansenii</i>	Polpa ²	P	+	+	-	-	-
<i>R. graminis</i>	Polpa ²	P	+	+	-	+++	+
<i>C. boidinii</i>	Polpa ¹	P	+	+	-	-	+
<i>P. guilliermondii</i>	Polpa ²	P	+	-	-	++	+
<i>R. glutinis</i>	Polpa ²	P	+	+	-	+++	+
<i>P. manshurica</i>	Salmoura	P	+++	-	-	-	-
<i>G. reessii</i>	Slamoura	P	-	-	+	+++	+

Legenda: “P” presença; “-” nenhuma atividade; “+” fraca atividade; “++” moderada atividade, “+++” forte atividade; ¹ Polpa da azeitona em contato com a salmoura; ² Polpa da azeitona antes de ser imersa na salmoura.