



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Fermentação de Azeitonas por Bactérias Lácticas com Potencial Probiótico

Marta Sofia Alves

Trabalho de Fim de Curso
Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

Trabalho Efectuado sob a orientação:
Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado
Doutora Cidália de Fátima Louro Morgado Peres
Dr. Cátia Maria Morgado Peres

Junho 2011

DECLARAÇÃO

Nome: Marta Sofia Alves

E-mail: martalves89@gmail.com

Telefone: 934180910

Bilhete de Identidade: 13468040

Título do trabalho: Fermentação de Azeitonas por Bactérias Lácticas com Potencial Probiótico

Orientador(es): Dr.^a Cristina Maria Baptista
Santos Pintado, Dr.^a Cidália Peres e Dr. Cátia
Peres

Ano de conclusão: 2011

Designação da Licenciatura: Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTE TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Instituto Politécnico de Castelo Branco, ___/04/2011

Assinatura:

Fermentação de Azeitonas por Bactérias Lácticas com Potencial Probiótico

Marta Sofia Alves

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de licenciado em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professor do Departamento da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Agradecimentos

Começo por agradecer à Doutora Cidália Peres, ter-me acolhido no seu laboratório, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, permitindo a realização deste estágio sob a sua orientação, tendo-se mostrado sempre disponível para ajudar, quer através do seu conhecimento quer a nível pessoal.

À Dr. Cátia Peres, co-orientadora, uma amiga incansável, por ter-me acompanhado desde o início no meu trabalho, transmitindo a maior parte dos conhecimentos que adquiri ao longo deste tempo.

À Doutora Cristina Pintado, docente da Escola Superior Agrária, agradeço a oportunidade de estágio e a sua dedicação no decorrer do trabalho.

Ao Doutor. Adrián Hernández, Doutor. Mohammad Tariq, Dr. Cláudia Neves, Dr. Joana Cruz e Dr. Laura Carvajal, agradeço também os conhecimentos transmitidos, a amizade, disponibilidade de ajuda e todos os bons momentos que passei com eles.

Ao Eng^o Luís Catulo agradeço o carinho, boa disposição, amizade e apoio que me deu ao longo do tempo.

A todos aqueles que de certa forma me acompanharam ao longo do meu trabalho, do coração
Muito Obrigada!

Resumo

A cultivar Galega da espécie *Olea europaea* é a mais difundida em Portugal, principalmente nas áreas rurais, e os seus frutos são usados quer para a produção de azeite, quer para azeitona de mesa. O processo de fermentação da azeitona inclui várias fases e as alterações que ocorrem ao longo do processo são avaliadas através de estudos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais. A qualidade do produto final depende da composição do fruto, das tecnologias usadas na sua transformação e das condições ambientais que prevalecem ao longo do processo de fermentação.

Neste estudo foram aplicadas metodologias para avaliação da aptidão probiótica de estirpes de bactérias lácticas isoladas após fermentação de frutos da cultivar Galega. Foram seleccionadas três estirpes de espécies diferentes, previamente identificadas por biologia molecular, que serviram de inóculos aplicados em ensaios de fermentação controlada, à escala laboratorial.

Os resultados obtidos parecem indicar que as estirpes estudadas apresentam potenciais características probióticas e que poderão ser usadas na produção de azeitona probiótica.

Palavras-chave: azeitona de mesa, fermentação, bactérias lácticas, próbioticos.

Abstract

Olea europaea var. *Galega* is the most widespread in Portugal, particularly in rural areas and its fruits are used either for olive oil production or as olives table. The fermentation process of the olive includes several stages and the changes that occur during the process are evaluated by physico-chemical, microbiological and sensorial studies. Quality of the final product depends on the composition of the fruit, the technologies used in its processing and environmental conditions that prevail during the fermentation process.

In this study, we applied methodologies for evaluation of probiotic capacity of lactic acid bacteria strains, isolated from the fermentation process of cultivated *Galega* fruits. We selected three strains of different species, previously identified by molecular biology, which served as the *inoculum* applied in experiments of controlled fermentation at laboratory-scale.

The results seems to indicate that the strains have potential probiotic characteristics and they can be used in the production of probiotic olive.

Keywords: table olives, fermentation, lactic acid bacteria, probiotic

Índice Geral

I Introdução	1
II Revisão bibliográfica	2
1 A oliveira em Portugal e o património “ <i>Galega vulgar</i> ”	2
2 Azeitona de mesa	3
2.1 A composição do fruto e os benefícios para a saúde humana	3
2.2 Cultivares portuguesas para preparação de azeitona de mesa	4
2.3 Norma comercial aplicável à azeitona de Mesa (C.O.I., 2004) e Norma Portuguesa (NP-3034)	5
2.4 Fermentação de azeitonas pretas ao natural da cultivar Galega	6
3 O novo produto “Azeitona probiótica”. Critérios de selecção de estirpes de bactérias lácticas com potencial probiótico	10
III Material e métodos	12
1 Avaliação de propriedades probióticas e selecção de estirpes	12
1.1 Estirpes bacterianas e condições de cultura	12
1.2 Actividade hemolítica	13
1.3 Resistência ao processo de digestão simulada	13
1.4 Capacidade de auto-agregação	13
1.5 Capacidade de co-agregação	14
1.6 Hidrofobicidade	14
1.7 Antagonismos frente a bactérias enteropatogénicas	14
1.8 Resistência ao tratamento térmico	15
2 Ensaio de fermentação controlada	15
2.1 Microrganismos seleccionados	15
2.2 Meios de cultura e condições, reagentes e quantificação de microrganismos	15
2.3 Fruto, quantidade e periodicidade da amostra	16
2.4 Preparação dos frutos e salmoura	16
2.5 Desenho experimental	17
2.6 Preparação dos inóculos e inoculação	17
2.7 Condições de fermentação	18
2.8 Avaliação organoléptica	18
2.9 Confirmação das espécies usadas como inóculo por multiplex PCR	19
IV Resultados e discussão	20
1 Avaliação de propriedades probióticas e selecção de estirpes	20
1.1 Actividade hemolítica	20

1.2 Resistência ao processo de digestão simulada	20
1.3 Capacidade de auto-agregação	21
1.4 Capacidade de co-agregação	22
1.5 Hidrofobicidade	23
1.6 Antagonismos frente a bactérias enteropatogénicas	23
1.7 Resistência ao tratamento térmico	24
2 Ensaio de fermentação controlada	25
2.1 Perfil microbiano das fermentações	25
2.2 Evolução do pH e da acidez livre	26
2.3 Avaliação organoléptica	27
2.4 Confirmação das espécies usadas como inóculo por multiplex PCR	28
V Conclusão	30
VI Referências bibliográficas	31
Anexos	

Índice de figuras

Figura 1 Frutos da cultivar Galega usados nos ensaios	16
Figura 2 Enchimento dos frascos de fermentação com salmoura, com capacidade para 2L	17
Figura 3 Frascos de fermentação	17
Figura 4 Actividade hemolítica das estirpes <i>L. pentosus</i> B96, <i>L. paraplantarum</i> A1 e <i>L. plantarum</i> 33	20
Figura 5 Resultados da digestão simulada às três estirpes	21
Figura 6 Capacidade de auto-agregação das três estirpes	22
Figura 7 Capacidade de co-agregação das três estirpes	22
Figura 8 Percentagem de hidrofobicidade nas três estirpes	23
Figura 9 Resultados do stress provocado pelo tratamento térmico	24
Figura 10 Evolução do crescimento e do pH das bactérias lácticas, leveduras e bactérias Gram negativas ao longo da fermentação	25
Figura 11 Evolução do pH e da acidez livre ao longo da fermentação	26
Figura 12 Avaliação organoléptica: percentagem de preferência	27
Figura 13 Gel após electroforese dos produtos PCR	28

Índice de tabelas

Tabela 1 Resultados dos antagonismos frente a bactérias enteropatogénicas	24
Tabela 2 Identificação das três estirpes seleccionadas por multiplex PCR por correspondência aos fragmentos amplificados	29