

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DAS BARREIRAS NO
CRESCIMENTO DE *Monascus ruber* EM CONSERVAS DE AZEITONAS
E A DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE SEUS
ASCÓSPOROS**

LEANDRO PEREIRA CAPPATO

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DAS BARREIRAS NO
CRESCIMENTO DE *Monascus ruber* EM CONSERVAS DE AZEITONAS
E A DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE SEUS
ASCÓSPOROS**

LEANDRO PEREIRA CAPPATO

Sob a orientação da Professora

D.Sc. Amauri Rosenthal

e

Co-orientação do Professor

D.Sc. Elisa Helena da Rocha Ferreira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciências de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2015

664.80463

C247a

T

Cappato, Leandro Pereira, 1989-

Avaliação da tecnologia das barreiras no crescimento de *Monascus ruber* em conservas de azeitonas e a determinação da resistência térmica de seus ascósporos / Leandro Pereira Cappato. - 2015.

74 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Azeitona - Conservação - Teses. 2. Alimentos - Contaminação - Teses. 3. *Monascus* - Teses. 4. Tecnologia de alimentos - Teses I. Rosenthal, Amauri, 1960- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LEANDRO PEREIRA CAPPATO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2015

Amauri Rosenthal (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)

Lourdes Maria Pessoa Masson (D.Sc.) IFRRJ

Marcelo Elias Fraga (D.Sc.) UFRRJ

RESUMO

CAPPATO, Leandro Pereira. **Avaliação da tecnologia das barreiras no crescimento de *Monascus ruber* em conservas de azeitonas e a determinação da resistência térmica de seus ascósporos.** RJ, 2015. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

O Brasil apresenta grande importância frente ao mercado mundial de azeitonas, sendo o segundo maior importador e o nono maior consumidor de azeitonas de mesa do mundo. Apesar de possuir posição de destaque, pouco se conhece a respeito das características do fruto, assim como os métodos de elaboração e conservação de azeitonas de mesa em conservas. Em vista do crescente aumento nas importações dos frutos, o conhecimento a cerca da qualidade da matéria-prima e, principalmente, da microbiota contaminante é fundamental a fim de garantir a segurança e a qualidade das conservas de azeitonas de mesa elaboradas no país. Fungos filamentosos constituem como potenciais contaminantes do fruto, principalmente durante sua estocagem. O fungo, identificado como *Monascus ruber*, foi isolado durante a estocagem de azeitonas verdes do tipo Arauco importadas da Argentina em uma fábrica situada na cidade de Três Rios – RJ. Seu desenvolvimento acarreta em diversas deteriorações, como: amolecimento dos frutos, desenvolvimento micelial de pigmentação avermelhada na superfície da salmoura e aumento do pH das salmouras, causando perdas econômicas e redução da estabilidade microbiológica do produto. Pode permitir ainda, o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, como *Clostridium botulinum*, em virtude do aumento do pH. Baseado nos métodos de conservação de conservas de azeitonas, previstos na legislação (pasteurização ou adição de conservantes), o presente trabalho busca avaliar o efeito de cada fator e determinar os parâmetros de processo, visando estabelecer as condições mais eficientes no controle do crescimento e da deterioração causada pelo fungo. Primeiramente, foi realizado um estudo sobre o efeito da aplicação do conceito da tecnologia das barreiras sobre o crescimento do fungo após 10, 30 e 50 dias, investigado pelo auxílio do planejamento experimental (fatorial completo 2^4 e composto central face centrada), através do uso combinado de cloreto de sódio, sorbato de potássio, benzoato de sódio e temperatura em diferentes níveis. A partir dos resultados, observou-se que o fungo apresentou tolerância à concentração de 5,5% de cloreto de sódio, mostrando maior taxa de crescimento à concentração mínima testada (3,5 % de cloreto de sódio). O uso de conservantes mostrou ser eficaz no controle do fungo, sendo o sorbato de potássio o conservante mais eficaz apresentando ação fungicida em uma concentração mínima em torno de 0,03%. O uso combinado desses conservantes não apresentou efeito sinérgico, como esperado. A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pôde-se determinar a composição de salmoura na qual houve maior taxa de crescimento do fungo, sendo esta utilizada como meio de aquecimento para avaliar a resistência térmica do fungo. Os valores de D obtidos foram $D_{75\text{ }^{\circ}\text{C}} = 26,92$ min; $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}} = 5,72$ min; $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,57$ min e o valor de z foi de 8,1 °C. Os resultados mostraram que o binômio tempo x temperatura estabelecido pela legislação não é capaz de eliminar o fungo. Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa podem auxiliar a indústria a desenvolver processos mais eficientes para eliminação do *Monascus ruber* em conservas de azeitonas, a partir da pasteurização ou pela adição de conservantes.

Palavras-chave: Azeitonas de mesa, conservantes, pasteurização.

ABSTRACT

CAPPATO, Leandro Pereira. **Evaluation of hurdle technology in the growth of *Monascus ruber* in olives canned and the determination of the heat resistance of their ascospores.** RJ, 2015. 74p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Brazil has great importance in addressing the world market of olives, the second largest importer and the ninth largest consumer of the world's table olives. Despite having prominent position, little is known about the fruit characteristics, as well as the methods of preparation and conservation of olives but preserved. Filamentous fungi are as potential fruit of contaminants, especially during its storage. In view of the growing increase in imports of fruits, knowledge about the quality of the raw material and mainly of microbial contaminants, it is essential to ensure the safety and quality of preserved table olives produced in the country. The fungus, identified as *Monascus ruber*, was isolated during storage of green olives of Arauco cultivar imported from Argentina in a factory located in Three Rivers - RJ. Its development leads to various impairments, such as softening of fruits, reddish pigmentation of mycelium developing in the brine surface and increasing the pH of the brine, causing economic losses and reduced microbiological stability of the product and may allow development of pathogens such as *Clostridium botulinum*, due to the increase of pH. Based on olives preserved conservation methods provided for by law (pasteurization or chemical preservatives), this study aims to assess the effect of each factor and determine the process parameters to establish the most efficient conditions in growth control and caused deterioration by the fungus. First, a study was conducted on the effect of applying the concept of the technology barriers for the growth of fungus, investigated by the aid of the experimental design (full factorial 2^4 and face-centered central composite), through the combined use of sodium chloride, sorbate potassium, sodium benzoate and temperature at different levels. From the results, it was observed that the fungus was tolerant to the concentration of 5.5% salt, showing the highest growth rate at lowest concentration tested (3.5% salt). The use of preservatives has proved effective in controlling fungal, and potassium sorbate effective as a preservative fungicide action having a minimum concentration of about 0.03%. The combined use showed no synergistic effect, resulting in fungistatic against the fungus. From the results obtained in this study, it was possible to determine the composition of the brine in which there was a higher rate of growth of the fungus, which is used as a heating medium to evaluate the heat resistance of the fungus. The D values were $D_{75\text{ }^\circ\text{C}} = 26,92$; $D_{80\text{ }^\circ\text{C}} = 5,72$; $D_{90\text{ }^\circ\text{C}} = 1,57$ and the value of z was 8,1 °C. The result showed that the binomial time x temperature set by law is not able to kill the fungus. Therefore, the results obtained in both studies can help the industry to develop more efficient processes for disposal of *Monascus ruber* in olives preserved from the pasteurization or the addition of preservatives

Keys-word: Table olives, preservatives, pasteurization.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Perfil das importações brasileiras de azeitona de mesa, em relação à classificação da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM*), no período de 2001/2002 até 2011/2012. 10

Tabela 2: Principais fornecedores de azeitona de mesa para o Brasil no período de 2001/2002 até 2011/2012. 11

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Parâmetros de resistência térmica de fungos termorresistentes. 28 – 29

CAPÍTULO 3

Table 1: A full 24 factorial design with three central points. The codes, originals variables 41

Table 2 - The results ($\log_{10} N/N_0$) of the factors effects in fungal growth for 10, 30 and 50 days. Evaluated by full 24 factorial design with three central points. 44

Table3 - The results ($\log_{10} N/N_0$) of the factors effects in fungal growth for 10 days evaluated by FCCCD with three central points. 51

Table 4 - ANOVA results of the fungal growth ($\log_{10}N/No$) from the FCCCD designs with three central points for 10 days. 52

CAPÍTULO 4

Table 1: Kinetics parameters resulting from Baranyi's model for heat resistance of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3.5 and 3.5 %NaCl) at 70°, 75° and 80 °C. 67

Table 2: Comparison between the minimum thermal treatment required according to legislation at 70, 75 and 80 °C and the necessary treatment to inactivate 1 log cycle of *Monascus ruber*, 70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Importações brasileiras de azeitonas de mesa entre as safras de 2001/2002 até 2011/2012. 8

CAPÍTULO 3

- Figure 1:** The characteristic of *Monascus ruber* 43
- Figure 2:** The Pareto chart of absolute standartized values of fungal growth at 10 days (a); 30 days (b) and 50 days (c) resulting from the model obtained by a full 2^4 factorial design with three central points. 46
- Figure 3:** Plot with the mean values of the influence of factors significant interactions between preservatives in the growth of the *Monascus ruber* in table green olives of Arauco cultivar after 10 days (a); 30 days (b) and 50 days (c). 47
- Figure 4:** The development of mycelial mat on the brine surface of table green olives (Arauco cultivar) treated without preservatives 49
- Figure 5:** Histogram of residuals distribution overlaid on a normal distribution plot. The test of Shapiro–Wilk proved the normality of residuals distribution ($p = 0.93564$). 53
- Figure 6:** Response surface plot showing the effect of Potassium sorbate (X_2) and sodium benzoate (X_3) in the fungal growth ($\text{Log}_{10}(N/N_0)$) after 10 days. 54

CAPÍTULO 4

Figure 1: Survival curves of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3.5 and 3.5 % NaCl) at 70 °C (✱), 75 °C (◇) and 80 °C (□) 65

Figure 2: Thermal death time (TDT) curve of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3,5 and 3,5 % NaCl) 69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
-----------------	---

CAPÍTULO 1

AZEITONAS DE MESA NO BRASIL: MERCADO, TECNOLOGIA E ASPECTOS LEGAIS

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	DESENVOLVIMENTO	7
2.1	Mercado de azeitonas de mesa	7
2.2	Mercado brasileiro de azeitona de mesa	7
2.3	Azeitonas verdes tipo <i>Spanish style</i>	11
2.4	Azeitonas pretas oxidadas <i>Californian style</i>	16
2.5	Azeitonas com fermentação natural <i>Greek style</i>	18
3	CONCLUSÃO.....	21
4	REFERÊNCIAS.....	22

CAPÍTULO 2

1	REVISÃO DE LITERATURA	25
1.1	Gênero <i>Monascus</i>	25
1.1.1	Fontes de contaminação das espécies	25
1.2	Fungos Termorresistentes	25
1.3	Resistência térmica	26
1.4	Modelos preditivos primários que descrevem a inativação térmica de fungos termorresistentes	29
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	33

CAPÍTULO 3

INHIBITION OF *MONASCUS RUBER* GROWTH IN TABLE GREEN OLIVES OF ARAUCO CULTIVAR BY HURDLE TECHNOLOGY.

1	INTRODUCTION	39
2	MATERIAL AND METHODS	40
2.1	Fungal isolates and identification.....	40
2.2	Preparation of ascospore suspension.....	40
2.3	Experimental design	41
2.3.1	Full 2 ⁴ factorial design	41
2.3.2	Face-centered central composite design (FCCCD).....	42
2.4	Preparation of table olives samples	42
2.5	Microbiological analysis and pH measurements	42
3	RESULTS.....	43
3.1	Fungus identification	43
3.2	Effect of individual hurdles on microbial growth.....	44
3.2.1	Results of fungal growth at 10 days	48
3.2.2	Results of fungal growth at 30 days	49
3.2.3	Results of fungal growth at 50 days	50
3.3	Reponse surface methodology of FCCCD.....	50
4	DISCUSSION.....	54
5	CONCLUSIONS	56
6	REFERENCES	57

CAPÍTULO 4

HEAT RESISTANCE OF *MONASCUS RUBER* ASCOSPORES ISOLATED FROM STORAGE BRINE OF GREEN OLIVES OF ARAUCO CULTIVAR

1	INTRODUCTION	622
2	MATERIAL AND METHODS	63
2.1	Fungus and preparation of ascospore suspension	63
2.2	Determination of heat resistance of <i>Monascus ruber</i>	63
2.3	Modelling of Thermal Inactivation Kinetics of <i>M. ruber</i> in brine.....	64
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	64
3.1	Heat resistance of <i>Monascus ruber</i>	64
4	CONCLUSION	70
5	REFERENCES	71
	CONCLUSÃO FINAL.....	73

INTRODUÇÃO

Azeitona de mesa é um dos produtos vegetais fermentados de maior importância no mundo ocidental. Apesar de não possuir produção significativa, o Brasil apresenta grande importância frente ao mercado mundial, sendo o segundo maior importador de azeitonas no ano safra 2013/2014 e o nono maior consumidor do fruto (IOOC, 2012).

De acordo com as normas comerciais aplicadas para azeitona de mesa (COI, 2004), azeitona de mesa pode ser conservada mediante o processamento térmico (pasteurização ou esterilização) ou pelas características da própria salmoura, com ou sem adição de conservantes. O processo de pasteurização de azeitonas de mesa deve atingir, no mínimo, 15 minutos a temperatura de 62,4 °C ($F_{62,4^{\circ}\text{C}}=15$ min). Em relação à legislação, os conservantes permitidos são os ácidos benzóico e o sórbico, assim como seus respectivos sais de sódio ou de potássio, nas concentrações de 1000 e 500 ppm, respectivamente.

Fungos termorresistentes são os principais micro-organismos causadores de deterioração em produtos pasteurizados. Diversas espécies como *Byssochlamys fulva*, *B. Nivea*, *Talaromyces Flavus* e *Neosartorya fischeri*, são frequentemente relacionadas a diversas deteriorações em diferentes produtos pasteurizados, como sucos de frutas e conservas vegetais. A principal característica dos fungos termorresistentes, pertencente à Classe dos Ascomicetos, é a formação de ascósporos (esporos formados sexualmente no interior de estruturas chamadas ascos) que são muito resistentes ao calor, além dessa característica, podem ser resistentes a baixos pH e baixas concentrações de oxigênio, sendo o principal contaminante de conservas pasteurizadas de azeitonas, acarretando prejuízos econômicos e à saúde do consumidor (BRACKETT, 2001).

Monascus ruber é um importante fungo pertencente à Classe dos Ascomicetos. O solo corresponde à principal fonte de contaminação, sendo associada à contaminação de frutas no pós colheita {Guarro, 2012 #57}. Em azeitonas, a contaminação por este fungo é caracterizada pelo aumento do pH, amolecimento e crescimento micelial na superfície da salmoura, resultando em perdas econômicas e comprometendo a segurança microbiológica do produto (PANAGOUE *et al.*, 2002).

A tecnologia das barreiras é uma técnica muito utilizada na prevenção de deterioração relacionada à contaminação por fungos. O princípio desta tecnologia baseia-se no uso combinado de diferentes técnicas com o intuito de modificar as características intrínsecas e extrínsecas. Entre os principais métodos estão, adição de ácidos para modificação da acidez do alimento, técnicas para redução da atividade de água, como uso de cloreto de sódio (NaCl),

adição de conservantes (ácidos sórbico e benzóico), modificação da composição dos gases e temperatura. Em relação às técnicas utilizadas, a adição de conservantes constitui na técnica mais utilizada no controle da contaminação por fungos. Sendo o sorbato de potássio e o benzoato de sódio uns dos conservantes mais eficazes e utilizados em diversos alimentos ácidos.

Existem poucos estudos relacionando a qualidade das azeitonas importadas e consumidas no país. Com o crescente aumento nas importações e conseqüentemente, aumento do consumo do produto, tornam-se necessários estudos sobre os aspectos microbiológicos do fruto. O presente trabalho revisa e detalha as alternativas de processamento, mostrando a importância do Brasil frente ao mercado mundial de azeitonas. Além de determinar o melhor processo para prevenção e eliminação da deterioração causada pelo crescimento do *Monascus ruber* em azeitonas de mesa, através do uso da tecnologia das barreiras (NaCl, benzoato de sódio; sorbato de potássio e temperatura) e através da determinação dos parâmetros cinéticos (valor D e z) dos ascósporos do *Monascus ruber* em salmoura (3,5 % NaCl; pH=3,5). Assim, a determinação desses parâmetros poderá auxiliar a indústria de azeitonas de mesa a desenvolver processos de conservação mais eficientes, visando à eliminação do fungo em conservas de azeitonas de mesa.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

Artigo aceito para Revista Ciência Rural (B3)

Azeitonas de mesa no Brasil: Mercado, tecnologia e aspectos legais

Table olives in Brazil: Market, technology and legal aspects

Leandro Pereira Cappato Elisa Helena da Rocha Ferreira

Amauri Rosenthal

RESUMO

Azeitona de mesa é o produto vegetal fermentado de maior importância no mundo ocidental. Apesar de não possuir produção significativa, o Brasil está entre os dez maiores consumidores de azeitona de mesa do mundo. Para o ano safra 2013/2014 (período entre os dias 01 de outubro até 30 de setembro), estima-se que o país seja o segundo maior importador e o nono maior consumidor do fruto. No entanto, as características do fruto e os principais processos de elaboração de azeitonas de mesa são pouco conhecidos no Brasil. Dessa maneira, este trabalho objetiva realizar um levantamento do mercado, as principais tecnologias utilizadas e os aspectos legais associadas à produção de azeitona de mesa.

Palavras-chave: *Spanish style, Greek style, Californian style, Oleuropeína.*

ABSTRACT

Table olives is the greater importance fermented vegetable product in the western world. Despite not having significant production, Brazil is among the ten largest consumers of table olives in the world. For the crop year of 2013/2014 (period between 01 October to 30 September) it is estimated that the country becomes the second largest importer and the ninth-largest consumer of the fruit. However, knowledge about the fruit characteristics and the main processes of elaboration of table olives are scarce. Thus, this research aims to survey the market, main technologies and the associated legal aspects of the production of table olives

Key-words: *Spanish style, Greek style, Californian style, oleuropein.*

1 INTRODUÇÃO

As azeitonas, frutos da oliveira (*Olea europaea*) espécie pertencente à família das oleáceas, são considerados impróprios para consumo *in natura*, pois apresentam um componente responsável pelo seu sabor amargo, a oleuropeína, um glicosídeo presente naturalmente no fruto (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2010).

Segundo o CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI, 2004), azeitona de mesa é definida como o produto preparado a partir de frutos sadios da oliveira, submetido a tratamento para eliminação do amargor natural presente no fruto e conservado mediante fermentação natural ou tratamento térmico, com ou sem conservantes, envasado com ou sem líquido de cobertura. As azeitonas são classificadas quanto ao seu estado de maturação. Assim, há azeitona verde, de cor transitória e preta.

Em geral, apresentam, em média, baixos teores de açúcares (2,5-6,0%) e alto teor de ácidos graxos (9,0-30,0%), valores que variam de acordo com o tipo de azeitona, o grau de maturação, sazonalidade e variedade (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2010). O processamento do fruto tem como principal objetivo a eliminação da oleuropeína. Existem diversos tipos, sendo os de maior importância conhecidos como: *Californian style*, *Greek style* e *Spanish style*. O *Californian style* consiste no enegrecimento de azeitonas através da oxidação alcalina. No *Greek style*, as azeitonas são processadas mediante a fermentação natural dos frutos, enquanto no *Spanish style* as azeitonas verdes são submetidas a um tratamento através do uso de álcali (GARRIDO-FERNÁNDEZ *et al.*, 1997).

O mercado mundial de azeitona cresce a cada ano. Estima-se que na safra de 2013/2014 a produção do fruto alcance 2,5 milhões de toneladas, um aumento correspondente a 5,8% em relação à safra de 2011/2012. No mesmo período, o Brasil foi o segundo maior importador. A estimativa é que em 2013/2014 o país importe 109.000 toneladas do fruto, aproximadamente 4,4% de toda produção mundial estimada no período

(IOOC, 2013).

Em virtude da importância do Brasil no cenário mundial de azeitonas de mesa e do desconhecimento acerca do fruto, este trabalho tem como objetivo apresentar os principais processos de produção, os aspectos legais relacionados à elaboração de azeitonas de mesa e a importância desse produto no âmbito nacional.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Mercado de azeitonas de mesa

A produção mundial de azeitona de mesa entre os anos safra 1991/1992 até 2011/2012 aumentou cerca de 169%, chegando a atingir em 2011/2012 uma produção de 2.432.500 toneladas. Nesse período, a Espanha foi o maior produtor mundial do fruto (521.500t), seguido da Turquia (400.000t) e Egito (384.500t) (IOOC, 2013).

Assim como a produção, a demanda mundial de azeitona de mesa aumenta a cada ano. Para o ano safra de 2013/14, a previsão é que o consumo aumente cerca de 4,5%, comparado com o ano 2011/2012, chegando a atingir um total de 2.668.000t. Vale ressaltar que os três maiores produtores do fruto consistiram também nos três maiores consumidores na safra de 2011/2012. A Turquia apresentou-se como o maior consumidor (350.000t), seguido do Egito (300.000t) e da Espanha (217.900t) (IOOC, 2013).

2.2 Mercado brasileiro de azeitona de mesa

A produção de azeitonas no país ainda é pequena e voltada para o desenvolvimento de produtos, como o azeite de oliva. As principais plantações de azeitonas estão situadas na região do semiárido, no sul do país e em Minas Gerais (MESQUITA *et al.*, 2014).

Apesar de ser o segundo maior importador do fruto, o consumo per capita do país (0,5kg hab⁻¹) ainda é baixo, quando comparado a países europeus e do mediterrâneo, como Síria (6,3kg hab⁻¹), Espanha (4,7kg hab⁻¹) e Turquia (4,7kg hab⁻¹) (IOOC, 2013; UNSD, 2012). A figura 1 representa as importações brasileiras nos anos safra 2001/2002 a 2011/2012, de acordo com a IOOC (2013).

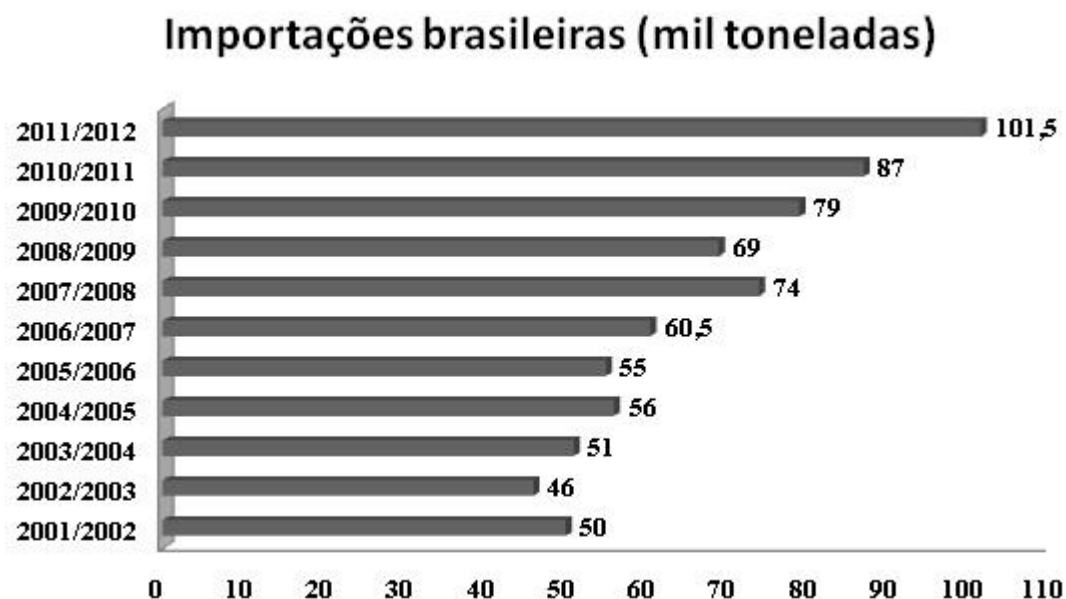


Figura 1 - Importações brasileiras de azeitonas de mesa entre as safras de 2001/2002 até 2011/2012. Fonte: Adaptado IOOC, 2013.

Segundo o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2014), dentro do período de 2001/2002 até 2011/2012, as importações brasileiras totalizaram US\$ 876.201.723,00. Baseado no Sistema Harmonizado, a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) é um método para classificação e codificação de mercadorias, visando a facilitar o desenvolvimento do comércio e aprimorar a coleta de dados em âmbito nacional (MDIC, 2014). Em relação à classificação e tipos dos frutos importados, cerca de 77% das aquisições referiram-se às azeitonas preparadas em conservas, prontas para o consumo (NCM 2005.70.00), enquanto os 23% restantes corresponderam aos frutos conservados

transitoriamente em barricas plásticas (150/180kg), impróprios para consumo nesse estado (NCM 0711.20). Deste restante, 22% dos frutos corresponderam às azeitonas conservadas em água salgada (NCM 0711.20.10) e 1% às azeitonas conservadas com outras substâncias destinadas a assegurar transitoriamente sua conservação (NCM 0711.20.90). As azeitonas comercializadas transitoriamente são lavadas, processadas industrialmente no Brasil e envasadas como um produto nacional. Vale ressaltar que todas as azeitonas importadas no país passaram por um tratamento prévio para eliminação da oleuropeína, tanto que, durante esse período, não houve importação de azeitonas frescas *in natura* (NCM 0709.92.00). A tabela 1 apresenta o perfil das importações brasileiras no período de 2001/2002 até 2011/2012.

Tabela 1: Perfil das importações brasileiras de azeitona de mesa, em relação à classificação da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM*), no período de 2001/2002 até 2011/2012.

Classificação NCM*	Quantidade (Toneladas)	Valor total US\$ FOB	Preço Médio (US\$/t)
NCM - 0709.92.00	0	0	0
Azeitonas frescas ou refrigeradas			
NCM - 0711.20.10			
Azeitonas conservadas com água salgada	160.481,517	133.025.607	829
NCM - 0711.20.20			
Azeitonas com água sulfurada ou adicionadas de outras substâncias	721,594	794.921	1.102
NCM - 0711.20.90			
Azeitonas conservadas com outras substâncias destinadas à assegurar transitoriamente sua conservação	4.523,629	4.345.951	961
NCM - 2005.70.00			
Azeitonas preparadas	563.849,405	738.035.244	1.309
Total	729.576,145	876.201.723	

*NCM – Nomenclatura Comum do Mercosul, baseado no Sistema Harmonizado (SH)

Fonte: Adaptado do MDIC (2014).

Em relação aos principais fornecedores, a tabela 2 mostra os 5 maiores fornecedores do fruto no período de 2001/2002 até 2011/2012, juntos representam quase 100% da importação nacional, sendo a Argentina o principal fornecedor, correspondendo a 79,5% das importações (MDIC, 2014). A proximidade dos países e os aspectos tarifários, principalmente com advento do MERCOSUL, contribuíram para o fato. O Peru segue em segundo lugar, aproximadamente 13%, sendo grande parte desse montante advinda de

azeitonas preparadas em conservas, prontas para o consumo (NCM 2005.70.00) (MDIC, 2014).

Tabela 2: Principais fornecedores de azeitona de mesa para o Brasil no período de 2001/2002 até 2011/2012.

Países	NCM* 0711.20.10 ¹	NCM* 0711.20.20 ²	NCM* 0711.20.90 ³	NCM* 2005.70.00 ⁴	Quantidade total (t)
Argentina	125.272.202	70.580	4.037.955	450.310.607	579.691
Espanha	7.222.532	607.600	247.372	24.878.852	32.956
Portugal	2.597.457	13.044	35.711	6.193.660	8.840
Peru	18.871.742	22.918	198.353	74.994.123	94.087
Chile	4.042.772	0	0	6.262.552	10.305
Total	158.006.705	714.142	4.519.391	562.639.794	725.880

*NCM – Nomenclatura Comum do Mercosul, baseado no Sistema Harmonizado (SH).

¹NCM 0711.20.10 - Azeitonas conservadas com água salgada.

²NCM 0711.20.20 - Azeitonas com água sulfurada ou adicionadas de outras substâncias.

³NCM 0711.20.90 - Azeitonas conservadas com outras substâncias destinadas a assegurar transitoriamente sua conservação.

⁴NCM 2005.70.00 - Azeitonas preparadas.

Fonte: Adaptado do MDIC (2014).

2.3 Azeitonas verdes tipo *Spanish style*

O processo de elaboração de azeitonas verdes, conhecido como *Spanish style*, se baseia no tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) para eliminação do amargor

natural, em que, após o processo de lavagem, os frutos são imersos em salmoura e sofrem fermentação total ou parcial, podendo ser pasteurizados ou não (GARRIDO-FERNÁNDEZ *et al.*, 1997).

Os frutos são colhidos quando atingem seu tamanho máximo de desenvolvimento, ainda com coloração verde a verde-palha (ROMERO *et al.*, 2004). A colheita pode ser realizada de duas maneiras: manualmente ou mecanicamente (SILES, 1999). Na colheita manual, as azeitonas são colhidas e dispostas cuidadosamente em cestas acolchoadas penduradas no pescoço, técnica conhecida como “Macaco”, evitando qualquer tipo de dano. O transporte é realizado em recipientes plásticos perfurados, permitindo a aeração dos frutos, minimizando danos decorrentes das ações enzimáticas (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Tendo em vista o elevado custo da colheita manual, a colheita mecanizada está cada vez mais sendo utilizada. Até os anos noventa, essa técnica não apresentava resultados satisfatórios, em decorrência do aumento de azeitonas danificadas durante o processo. Com o avanço da tecnologia, a mecanização da colheita permitiu a obtenção de produtos finais de qualidade ainda melhores do que aqueles colhidos manualmente (SILES, 1999).

Após a colheita e o transporte até a unidade processadora, as azeitonas são selecionadas quanto ao tamanho e grau de maturação, com objetivo de melhorar a homogeneidade do tratamento alcalino e facilitar a penetração do álcali nos frutos. Após a seleção, as azeitonas são submetidas ao tratamento alcalino, conhecido também como “cocido” ou “quemado”, etapa fundamental na elaboração de azeitonas verdes. Além de eliminar a oleuropeína, o processo permite aumentar a permeabilidade da parede celular dos frutos, facilitando o processo de fermentação (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2008). De acordo com SÁNCHEZ *et al.* (2006), o tempo do tratamento, temperatura utilizada e a concentração de hidróxido de sódio são fatores determinantes para o processo alcalino. Tais parâmetros variam para cada tipo de variedade do fruto e influenciarão na qualidade final das azeitonas.

Alguns cultivares, como a Manzanilla, necessitam de um tempo prévio de descanso de 24 a 48h antes do “cocido”, com objetivo de evitar o descascamento da pele do fruto durante o tratamento alcalino, dano conhecido como “despellejado” (REJANO *et al.*, 2008). Porém, esse tempo de espera pode resultar na diminuição da qualidade final do fruto, devido ao desenvolvimento de processos enzimáticos responsáveis pelo aparecimento de manchas superficiais, dano conhecido como “molestado” (CARMONA *et al.*, 2011).

O “despellejado” é evitado quando se utiliza uma pré-etapa antes do tratamento alcalino, conhecido como “pré cocido”, esta etapa consiste em manter os frutos imersos em hidróxido de sódio a 0,24% por aproximadamente 3 horas, podendo ser aplicado durante o transporte dos frutos, minimizando danos ocasionados no trajeto (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

EL-MAKHZANGY & ABDEL-RHMAN (1999) relataram que o tratamento alcalino realizado por um longo período a elevadas concentrações de hidróxido de sódio, proporciona o aumento da permeabilidade da parede do fruto, prejudicando a sua qualidade, principalmente devido à perda de nutrientes, como os açúcares fermentáveis e polifenóis, componentes essenciais para a fermentação. Segundo REJANO *et al.* (2008), o “cocido” realizado a 18 °C, além de facilitar a penetração, evita danos ao fruto.

O “cocido” é considerado finalizado quando a solução alcalina penetra cerca de 3/4 de distância da pele à polpa, verificado visualmente pela utilização de solução indicadora, como a fenoltaleína (MALDONADO *et al.*, 2003). Após o término, são realizados alguns ciclos de lavagens com água por períodos de tempo variáveis, com objetivo de remover o excesso de hidróxido de sódio presente (CARMONA *et al.*, 2011). O número de lavagens influenciará diretamente no processo de fermentação dos frutos, sendo que o excesso de lavagem ocasiona perdas de componentes solúveis, como os açúcares, enquanto que o número reduzido de lavagens leva a um elevado valor de pH do meio, dificultando o processo fermentativo (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

Ao final do ciclo de lavagens, as azeitonas são imersas em salmoura (9-12% sal), quando sofrem fermentação láctica (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2010). Em decorrência da etapa do “cocido”, o pH da salmoura no início do processo fermentativo apresenta-se bastante elevado, podendo atingir valores acima de 10 unidades (SÁNCHEZ *et al.*, 2006). A fermentação pode ser realizada de duas maneiras: pelo processo tradicional, através da fermentação espontânea, ou pela adição de cultura *starter* (PERES *et al.*, 2012).

Segundo RUIZ-BARBA & JIMÉNEZ-DÍAZ (2012), no processo espontâneo, é aconselhável a redução do pH a valores de 6-7 unidades através da adição de ácido ou pela injeção de CO₂, para evitar o desenvolvimento exagerado de *Enterobacteriaceae* e *Propionibacteriaceae*, responsáveis por deteriorações conhecidas como “olho de peixe” e “zapatera”, respectivamente.

O processo fermentativo espontâneo é bem complexo, podendo ser dividido em 4 etapas. Na primeira, ocorre o desenvolvimento de bactérias Gram negativas e cocos lácticos, ocasionando rápida queda no pH da salmoura. Na segunda etapa, acontece o aparecimento dos primeiros lactobacilos, quando a população cresce progressivamente à medida que o tempo passa (QUINTANA *et al.*, 1997). A terceira fase é definida pela predominância de lactobacilos, sendo as espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. mesenteroides* as mais encontradas (RUIZ-BARBA & JIMÉNEZ-DÍAZ, 2012) e o desenvolvimento de diversos gêneros de leveduras como: *Pichia*, *Candida* e *Debaryomyces* (MONTAÑO *et al.*, 2003).

Os lactobacilos consomem os açúcares e produzem ácido láctico, reduzindo o pH para valores inferiores a 4,0 unidades. Já as leveduras são responsáveis pelas transformações químicas e organolépticas relacionadas com a qualidade do produto final, como: produção de compostos aromáticos, ésteres e antioxidantes (carotenoides, glutatona, tocoferóis) (QUINTANA *et al.*, 2005). Porém, se a redução do pH não for eficaz, a população de leveduras pode atingir um número maior que 10⁷UFC ml⁻¹ e acarretar certas deteriorações,

como: formação de CO₂ e o amolecimento do fruto (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2008).

Na quarta etapa, estágio caracterizado pela conservação dos frutos em salmoura, as reações químicas relacionadas à redução do pH são finalizadas, devido ao consumo dos açúcares fermentáveis, ocorrendo aumento do pH e da acidez volátil (QUINTANA *et al.*, 1997). Se as modificações químicas são brandas, não promovem alterações da estabilidade biológica dos frutos, porém aumentos acima de 0,4 unidades no pH, podem permitir o desenvolvimento de alterações indesejáveis, como a “zapatera”, ocasionada por *Propionibacterium*. A adição de sal e a acidificação do meio são importantes formas de evitar problemas durante essa etapa (GARRIDO-FERNÁNDEZ *et al.*, 1997).

Portanto, a redução adequada do pH é o fator determinante para o sucesso da fermentação e a garantia de um produto seguro e de qualidade, evitando o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (SPYROPOULOU *et al.*, 2001).

Devido à complexidade e à dependência exclusiva da microbiota natural do fruto para redução adequada do pH, o processo fermentativo não espontâneo realizado através da inoculação de cultura *starter* é uma alternativa cada vez mais utilizada. Cepas de *L. plantarium* e *L. pentosus*, presentes naturalmente no fruto, impedem o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes através da inibição competitiva, permitindo um rápido decréscimo do pH, evitando qualquer tipo de deterioração microbiológica indesejável durante a fermentação (RUIZ-BARBA & JIMÉNEZ-DÍAZ, 2012).

Em geral, ao final da fermentação, os frutos são selecionados e calibrados em relação ao tamanho, utilizando equipamentos automatizados. Os frutos são imersos em salmouras contendo altas concentrações de sal (cerca de 10%) e baixo pH (pH<4,0), sendo estocados em barricas plásticas de aproximadamente 300kg, até à comercialização (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

2.4 Azeitonas pretas oxidadas *Californian style*

Os frutos usados para elaboração das azeitonas pretas oxidadas podem ser colhidos em diferentes estágios de maturação, apresentando desde a coloração esverdeada até enegrecida (ROMERO *et al.*, 2004). O processo de elaboração *Californian style* consiste em submeter os frutos a sucessivos tratamentos alcalinos, permitindo que, entre os intervalos de cada tratamento, ocorra a incorporação de oxigênio no meio, provocando a oxidação dos compostos fenólicos presentes no fruto e o seu enegrecimento. Após a oxidação, as azeitonas são envasadas, podendo ser conservadas mediante esterilização ou pasteurização. Para o processo de pasteurização, os frutos devem ser acidificados ($\text{pH} < 4,5$) (GARCÍA *et al.*, 1991).

Após a recepção dos frutos na unidade fabril, as azeitonas são lavadas e selecionadas de acordo com tamanho de cada fruto, através do uso de equipamentos automatizados (SILES, 1999). Antes de serem submetidas ao tratamento alcalino, as azeitonas podem ser estocadas e preservadas em salmoura ou em água acidificada, ambas em pH acidificado a 3,8-4,0 (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

O processo de preservação em água acidificada, comumente utilizada nos EUA e conhecido como preservação livre de sal, consiste em estocar os frutos em água acrescida de ácido (ácido láctico e/ou acético), sob condições anaeróbias (BRENES *et al.*, 1998). Esse processo foi desenvolvido visando à redução do uso de sal na elaboração de azeitonas. Contudo, em virtude da ausência de sal, torna-se necessário o uso de conservantes como o benzoato de sódio, geralmente empregado em concentrações acima de 0,2%, visando à inibição de micro-organismos deteriorantes, principalmente as leveduras. Além do benzoato de sódio, outro aditivo bastante utilizado é o cloreto de cálcio. Seu uso auxilia na prevenção do amolecimento na textura dos frutos preservados por longos períodos, sendo geralmente utilizadas concentrações entre 0,1% a 0,3% (p/v) (DE CASTRO *et al.*, 2007). A principal

desvantagem desse método é o número excessivo de lavagens realizadas para promover a lixiviação do benzoato de sódio presente nos frutos (BRENES *et al.*, 2004).

Na Espanha, a etapa de preservação dos frutos é realizada em salmoura sob condições aeróbias. Os frutos são estocados em recipientes de fermentação de fibra de vidro, imersos em salmoura a 4% a 6% (p/v). A solução salina é aerada através da passagem de ar por colunas inseridas no interior dos tanques (BRENES *et al.*, 1998). A preservação em sistemas aerados evita o aparecimento de rugas e formação de gás, ocasionado pelo crescimento microbiano e pelo próprio metabolismo respiratório do fruto (BRENES, 2004).

Após a estocagem e preservação, os frutos são submetidos a sucessivos tratamentos utilizando solução diluída de hidróxido de sódio. Apesar da possibilidade de realização do tratamento alcalino em uma única etapa, geralmente, utiliza-se de 2 a 5 tratamentos, em concentrações entre 1,0% a 4,0% (p/v) de hidróxido de sódio. No primeiro tratamento, ocorre a penetração da solução alcalina pela pele do fruto, enquanto que nos tratamentos subsequentes acontece a incorporação mais profunda de NaOH em direção à polpa do fruto, já no último tratamento, a penetração alcança o caroço das azeitonas (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Durante os intervalos entre cada tratamento alcalino, os frutos são imersos em água e expostos à presença de oxigênio através da passagem de ar por tubos inseridos no interior dos tanques. A incorporação de oxigênio promove a oxidação gradativa dos compostos fenólicos presentes no fruto, como os *o*-difenois, resultando no aparecimento da coloração enegrecida, característica dos frutos oxidados (MARSÍLIO *et al.*, 2001). O uso de gluconato e/ou lactato de manganês, além de acelerar o processo de oxidação, auxilia também na intensificação da coloração formada (ROMERO *et al.*, 2001).

Com o término do tratamento alcalino, as azeitonas são lavadas várias vezes com água para promover a remoção do excesso de hidróxido de sódio presente e reduzir o pH a

níveis inferiores a 8 unidades (MARSÍLIO *et al.*, 2001). Em virtude da instabilidade da coloração formada e sua perda durante a vida de prateleira do produto envasado, comumente utilizam-se sais de ferro, como o gluconato ferroso ou lactato ferroso, com o intuito de auxiliar na prevenção da descoloração (GARCÍA *et al.*, 2001). Segundo o COI, 2004, o limite máximo de uso desses estabilizantes é de 0,15g de Ferro total por kg do fruto, ou seja, 150 ppm.

2.5 Azeitonas com fermentação natural *Greek style*

No processo de elaboração de azeitonas fermentadas naturalmente, os frutos devem ser colhidos em seu estágio de maturação completo. Quando colhidos em estágios excessivos de maturação, os frutos perdem sua consistência, apresentando amolecimento (PANAGOU *et al.*, 2011). O transporte dos frutos até a fábrica deve ser feito no menor tempo possível, a fim de evitar deteriorações, como o aparecimento de manchas superficiais e seu amolecimento (NYCHAS *et al.*, 2002). Uma alternativa para evitar o amolecimento excessivo consiste em adicionar sais de cálcio a uma concentração de 0,1% a 0,3% (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Após a chegada à unidade fabril, os frutos são imersos diretamente em salmoura sem nenhum processo prévio para a remoção do amargor natural, onde sofrem fermentação natural e espontânea. A concentração de sal pode variar entre 8% a 10% (SÁNCHEZ *et al.*, 2006). O processo fermentativo é lento, devido ao longo período de difusão dos compostos solúveis e da lenta solubilização da própria oleuropeína na salmoura (HURTADO *et al.*, 2008). A hidrólise da oleuropeína é atribuída ao pH ácido e à atividade da β -Glucosidase produzida pelas leveduras, principal micro-organismo presente na fermentação (PSANI & KOTZEKIDOU, 2006). Quando todos os substratos fermentáveis, como os açúcares, se esgotam, o processo é finalizado com duração média de 8 a 12 meses (CARDOSO *et al.*,

2010).

A fermentação das azeitonas pode ser realizada sob condições anaeróbias ou aeróbias. Além da presença ou ausência de oxigênio, outros fatores influenciam no processo, como a concentração de substratos fermentáveis, pH, teor de sal e temperatura (SPYROPOULOU *et al.*, 2001). Segundo TASSOU *et al.* (2002), teores de sal e temperatura influenciam diretamente o crescimento microbiano durante a fermentação. Foi observado que o processo fermentativo realizado a 25 °C com 8% de sal promove a inibição do desenvolvimento de bactérias lácticas e Gram negativas, favorecendo o desenvolvimento das leveduras.

No processo fermentativo, sob ausência de oxigênio, ocorre à predominância de leveduras (SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Nos primeiros dias da fermentação anaeróbia, acontece o desenvolvimento das bactérias Gram negativas, como as *Enterobacteriaceae* (TASSOU *et al.*, 2002). Após esse período inicial, ocorre o desenvolvimento das leveduras, principalmente quando se utilizam elevadas concentrações de sal (8-10%). Segundo NISIOTOU *et al.* (2010), a espécie de levedura dominante do processo espontâneo é a *Metschnikowia pulcherrima*, seguida por *Debaryomyces hansenii* e *Aureobasidium pullulans*. Nos estudos sobre a microbiota presente, esses autores encontraram uma nova espécie, classificada como *Candida olivae*. Porém, outras espécies são reportadas em outras pesquisas, como *Pichia membranifaciens* e *Candida parapsilosis* (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

No processo fermentativo aeróbio, a incorporação de oxigênio tem como objetivo principal evitar o aparecimento de bolhas de gás, deterioração produzida pelo crescimento excessivo de bactérias Gram negativas (*Enterobacteriaceae*), conhecida também como “alambrado”. O oxigênio é introduzido por uma coluna central no interior do tanque, removendo o CO₂ produzido pelo metabolismo microbiano (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Após a fermentação, as azeitonas são acondicionadas em salmoura, contendo altas concentrações de sal (cerca de 10%) e baixo pH ($\text{pH} < 4,0$), estocadas em barricas plásticas de aproximadamente 300kg, até à comercialização (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Comercialização de azeitonas de mesa

De acordo com a legislação que estabelece as normas aplicadas à comercialização de azeitonas de mesa (COI, 2004), as azeitonas de mesa diferem quanto sua forma de apresentação e comercialização. Em relação à forma de apresentação, as azeitonas são designadas como: azeitonas inteiras, com ou sem pedúnculo; azeitonas descaroadas; azeitonas recheadas (pimentão, alho, amêndoa, anchovas, etc.) e azeitonas fatiadas. Quanto à comercialização, as azeitonas são classificadas em relação ao calibre (número de frutos contidos em um quilograma); qualidade dos frutos (extra, categoria I e categoria II) e ao método de conservação.

Os frutos podem ser conservados mediante as características da salmoura de acondicionamento (água, sal e conservantes) ou mediante tratamento térmico de pasteurização ou esterilização. Segundo o COI (2004), o processo de pasteurização deve alcançar, no mínimo, $62,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15min ($F_{62,4\text{ }^{\circ}\text{C}}=15\text{min}$), sendo aplicado às azeitonas envasadas em salmoura ácida ($\text{pH} < 4,5$), enquanto o processo de esterilização deve alcançar $121,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 15min ($F_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}}=15\text{min}$), sendo aplicado às azeitonas oxidadas tipo *Californian style* envasadas sob $\text{pH} > 4,5$ (COI, 2004). O valor de F corresponde ao tempo total de processo, em minutos, a uma temperatura fixa, para que se atinja a destruição do micro-organismo alvo, considerada consumada pela redução da população microbiana em 12 ciclos logarítmicos, no caso da esterilização, e 5 ciclos logarítmicos para a pasteurização, no produto acidificado (FDA, 2010; EFSA, 2005).

3 CONCLUSÃO

Nesse cenário, o consumo de azeitona no Brasil apresenta grande importância frente ao mercado mundial, estando entre os dez maiores consumidores e sendo o segundo maior importador de azeitonas de mesa no mundo. A aplicação inadequada dos processos de preservação pode acarretar prejuízos significativos à qualidade do produto, bem como incorrer em riscos à sanidade do consumidor, em caso de processamento inadequado. O presente trabalho revisa e detalha as alternativas de processamento, mostrando ser viável a adoção de diferentes estilos de processo, de acordo com a demanda do consumidor, de forma a originar produtos com a qualidade desejada e a segurança microbiológica requerida, e que atendam à legislação existente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, à Empresa Masgovi, à Embrapa Agroindústria de Alimentos, à CAPES e à FAPERJ, pelo incentivo e apoio à pesquisa.

4 REFERÊNCIAS

ARROYO-LÓPEZ, F.N. *et al.* Role of yeasts in table olive production. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.128, p.189-196, 2008.

ARROYO-LÓPEZ, F.N. *et al.* Predictive microbiology and table olives. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v.II, n.13, p.1452-1461, 2010.

BRENES, M. *et al.* Ripe olives storage liquids reuse during the oxidation process. **Journal of Food Science**, v.63, p.117-121, 1998.

BRENES, M. *et al.* Absorption of sorbic and benzoic acids in the flesh of table olives. **European Food Research and Technology**, v.219, p.75-79, 2004.

BRENES, M. Olive fermentation and processing: scientific and technological challenges. **Journal of Food Science**, v.69, n.1, p.33-34, 2004.

CARDOSO, S.M. *et al.* Naturally fermented black olives: effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.153-160, 2010.

CARMONA, S.J. *et al.* Proceso tradicional de aderezo de aceitunas verdes de mesa. Racionalización del “cocido”. **Grasas y Aceites**, v.62, n.4, p.375-382, 2011.

COI (CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL). Trade standard applying to table olives, 2004.

DE CASTRO A. *et al.* Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. **Journal of Food Engineering**, v.80, n.4, p.1206-1212, 2007.

DOULGERAKI, A. *et al.* Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black Conservolea olives in polyethylene pouches. **Food Control**, v.26, p.49-57, 2012.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request for the Commission related to *Clostridium spp* in foodstuffs. **EFSA Journal**, v.199, p.1-65, 2005.

EL-MAKHZANGY, A.; ABDEL-RHMAN, A. Physicochemical properties of “Azizi” green pickled olives as affected by alkali process. **Nahrung**, v.43, n.5, p.320-324, 1999.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Guidance for Industry Acidified Foods**. U.S. Department of Health and Human Services, 2010.

GARCÍA, P. *et al.* Effect of oxygen and temperature on the oxidation rate during the darkening step of ripe olive processing. **Journal of Food Engineering**, v.13, p.259-271, 1991.

GARCÍA, P. *et al.* Color fixation in ripe olives. Effect of the type of iron salt and other processing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.1364-1370, 2001.

GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. *et al.* **Table Olives. Production and Processing**. Londres: Chapman & Hall, 1997. 479p.

HURTADO, A. *et al.* Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. **Food Research International**, v.41, p.738-744, 2008.

IOOC (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL). Statistic of table olive's world production, 2013.

MALDONADO, M.B. *et al.* Difusión de sodio en aceitunas verdes durante el tratamiento alcalino. I: Efecto de la concentración de la lejía. **Grasas y Aceites**, v.54, n.4, p.358-364, 2003.

MARSÍLIO, V. *et al.* Phenolic compounds during California-style ripe olive processing. **Food Chemistry**, v.74, p.55-60, 2001.

MESQUITA, H.A. *et al.* Aspectos econômicos da produção e comercialização do azeite e azeitona. **Informe agropecuário – Epamig**, v.27, p.7-12, 2006. Disponível em: <<http://www.informeagropecuário.com.br/produtos.php?produto=60>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

MDIC (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR). **Sistema AliceWeb acesso à informação**, 2014.

MONTAÑO, A. *et al.* Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. **Food Chemistry**, v.82, p.297-302, 2003.

NISIOTOU, A.A. *et al.* Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.396-405, 2010.

NYCHAS, G.J.E. *et al.* Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.173-177, 2002.

PANAGO, E.Z. A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of *Conservolea* natural black olives. **Food Microbiology**, v.28, p.1301-1307, 2011.

PERES, C.M. *et al.* Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & technology**. v.26, p.31-42, 2012.

PSANI, M.; KOTZEKIDOU, P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1329-1336, 2006.

QUINTANA, M.O.D. *et al.* Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. **Grasas y Aceites**, v.48, p.297-311, 1997.

QUINTANA, M.O.D. *et al.* Evolución del crecimiento en salmuera a baja temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa. **Grasas y aceites**, v.56, n.1, p.9-15, 2005.

REJANO, L. *et al.* Nuevas tendencias en el tratamiento alcalino “cocido” de las aceitunas verdes aderezadas al estilo español o sevillano. **Grasas y Aceites**, v.59, p.197-204, 2008.

ROMERO C. *et al.* Colour improvement in ripe olive processing by addition of manganese cations. Industrial performance. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.75-81, 2001.

ROMERO, C. *et al.* Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.479-484, 2004.

RUIZ-BARBA, J.L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, A.R. A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. **Food Microbiol.** v.30, p.253-259, 2012.

SÁNCHEZ, A.H. *et al.* Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.67, p.115-122, 2001.

SÁNCHEZ, A.H. *et al.* Trends in table olives production. Elaboration of table olives. **Grasas y Aceites**, v.57, p.86-94, 2006.

SILES, F.J.S. Las nuevas tecnologías aplicadas al sector de La aceituna manzanilla fina sevillana. **Grasas y Aceites**, v.50, p.131-140, 1999.

SPYROPOULOU, K. *et al.* Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.66, p.3-11, 2001.

TASSOU, C.C. *et al.* Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. **Food Microbiology**, v.19, p.605-615, 2002.

UNSD (UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION). Demographic and social statistics, 2012.

CAPÍTULO 2

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gênero *Monascus*

O gênero *Monascus* foi estabelecido por Tieghem, (1884). Até os anos 70, o gênero era dividido em 23 espécies. Segundo Udagawa e Baba (1998) existem 10 espécies do gênero, sendo *M. ruber* (TIEGH. 1884), *M. bisporus* (ARX, 1970), *M. eremophilus* (HOCKING & J. PITT, 1988), *M. pallens* (CANNON, ABDULLAH e B.A ABBAS, 1995), *M. aurantiacus* (LI, 1982), *M. pilosus* (K. SAITÔ, D. HAWKSW. E J. PITT 1983), *M. purpureus* (WENT, 1995), *M. lunisporas* (UDAGAWA e H. BABA 1998), *M. floridanus* (CANNON & E.L. BARNARD, 1987) e *M. sanguineus*. (CANNON, ABDULLAH & B.A ABBAS, 1995). Em contrapartida, Li & Guo, (2004) dividem o gênero *Monascus* em 12 espécies, dentre as anteriores encontram o *M. albidulus*, *M. fumeus* e *M. rutilus*. Stchigel *et al.* (2004), relata a descoberta de uma nova espécie isolada do solo, no norte da Argentina, *M. argentinensis*. O gênero é pertencente à família dos Ascomicetos conhecidos também como fungos termorresistentes devido à produção de ascóporos (PIECKOVÁ *et al.*, 1994).

Monascus é caracterizado pela presença de cleistotécio envolto do ascocarpo, superficial e sem aberturas decorrentes isoladamente de cada hifa cercado de ramos, paredes hialinas ou amarronzadas. Apresentam ascos sub-esféricos para elipisoidal, contendo 2 ou 8 ascósporos, sendo mais comum 8. A fase assexuada ou estágio imperfeito (anamorfo) denomina-se *Basipetospora* (GUARRO *et al.*, 2012).

1.1.1 Fontes de contaminação das espécies

Os estudos sobre presença de fungos termorresistentes em frutas e vegetais evidenciam que a principal fonte de contaminação é oriunda do solo e a contaminação se dá durante a fase da pós colheita. Segundo SAMSON *et al.*(2000), espécies de *Monascus* têm sido relatadas como importantes contaminantes em frutas e vegetais como, arroz, sementes de aveia, azeitonas, soja, durante a pós colheita.

1.2 Fungos Termorresistentes

Os fungos termorresistentes constituem como os principais micro-organismos deteriorantes em produtos de frutas pasteurizadas. Pertencentes à classe dos ascomicetos, os fungos apresentam como principal características a produção de esporos sexuados, conhecidos como ascósporos, que são envolvidos por um saco chamado de asco, conferindo-os a capacidade de sobreviver à temperaturas aplicadas durante processo de pasteurização, causando grandes perdas econômicas (KOTZEKIDOU 1997; TOURNAS, 1994).

Dentre os fungos termorresistentes, temos os gêneros *Neosatorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces*, entre os mais importantes (KOTZEKIDOU, 1997; CARTWRIGHT & HOCKING 1984). Diversas deteriorações são ocasionadas em virtude da contaminação, porém as alterações mais comuns são, o desenvolvimento na superfície, produção de enzimas pectinolíticas extra celulares, amolecimento de frutas, aumento de pH (ARAGÃO 1989; PIECKOVÁ *et al.*, 1994; KOTZEKIDOU, 1997).

Em geral, os ascósporos de fungos termorresistentes são capazes de sobreviver em temperaturas superiores a 90 °C, por longos períodos (BEUCHAT & RICE, 1979). O tempo de redução decimal é estritamente dependente a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento. Segundo Taniwaki & Silva (1996), avaliando o efeito de diferentes fatores, como pH, presença de conservantes e açúcar em *B. fulva*, observaram que a susceptibilidade ao calor aumentou em decorrência a redução do pH e a presença de dióxido de enxofre, em contrapartida houve uma diminuição com a elevação da concentração de açúcar.

1.3 Resistência térmica

A resistência térmica de diferentes fungos termorresistentes tem sido estudada por vários pesquisadores. Aragão (1989), avaliou a resistência térmica de quatro cepas de fungo termorresistentes em polpa de morango, sendo o *Byssochlamys nivea* o mais resistentes.

Casella *et al.* (1990) observaram que os ascósporos de *Byssochlamys nivea* mais velhos (16 semanas) eram mais resistentes ao tratamento térmico do que os mais jovens (8 semanas). Zimmermann (2012) avaliou a influência da idade na resistência térmica dos ascósporos de *Byssochlamys fulva*, onde foi constatado que os ascósporos de 3 meses apresentaram maiores valores de D ou seja demonstraram maior resistência térmica em relação aos ascósporos de 1 mês. Em contrapartida, não foi observado a influência da concentração de sólidos solúveis presente no meio de aquecimento na resistência térmica em polpa de tomate.

Diferentemente de Zimmermann (2012), Panagou *et al.* (2001), constatou efeito

protetor pelo aumento da concentração de sólidos solúveis presente na salmoura, utilizada como meio de aquecimento. Os autores avaliaram a resistência térmica dos ascósporos de *Monascus ruber* em salmoura fermentada de azeitonas com 30 dias em diferentes temperaturas (70, 75 e 80 °C). Foi evidenciado um aumento no tempo redução decimal (valor D) de $D_{70\text{ °C}}=46,08$; $D_{75\text{ °C}}=4,91$ e $D_{80\text{ °C}}=0,88$ min para $D_{70\text{ °C}}=72,99$; $D_{75\text{ °C}}=7,98$ e $D_{80\text{ °C}}=1,04$ min, quando a concentração de cloreto de sódio foi aumentada de 5,6% para 10,5%.

A tabela 3 destaca os trabalhos sobre resistência térmica de diferentes fungos, apresentando a técnica utilizada, o meio de aquecimento e o modelo usado para determinação dos parâmetros cinéticos (D e z).

Tabela 1: Parâmetros de resistência térmica de fungos termorresistentes

Autor	Fungo	Valor de D_T °C (min)	Valor z (°C)	Método, Meio Utilizado e o Modelo
	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=81,3$ $D_{85}=16$ $D_{90}=0,9$	5	Tubos TDT com suco maçã (11.3° Brix; pH 2.5) Modelo Alderton Snell
Salomão <i>et al.</i> , 2004	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=153,8$ $D_{85}=22$ $D_{90}=1$	4,6	Tubos TDT com suco maçã (11.3° Brix; pH 3.5) Modelo Alderton Snell
	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=312,5$ $D_{85}=38,6$ $D_{90}=2,2$	4,6	Tubos TDT com suco maçã (11.3° Brix; pH 4.5) Modelo Alderton Snell
	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=208,3$ $D_{85}=30,1$ $D_{90}=2$	5	Tubos TDT suco maçã (11.31° Brix; pH 3.5) Modelo Alderton Snell
Salomão <i>et al.</i> , 2007	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=129,9$ $D_{85}=19$ $D_{90}=1,9$	5,5	Tubos TDT com suco mamão (13° Brix; pH 3.6) Modelo Alderton Snell
	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80}=73,5$ $D_{85}=13,2$ $D_{90}=1,5$	5,9	Tubos TDT suco abacaxi (12° Brix; pH 3.4) Modelo Alderton Snell

		D ₈₅ =45,45		
Slongo e Aragão (2007)	<i>Byssochlamys nivea</i>	D ₉₀ =4,56	4,5	Tubos TDT com suco abacaxi (pH=3,5 e 12° Brix) Modelo Alderton Snell
		D ₉₂ =1,26		
		D ₈₅ =30,3		
	<i>Neosartorya fischeri</i>	D ₉₀ =3,43	5,08	Alderton Snell
		D ₉₂ =1,06		
		D ₉₈ =27		Tubos TDT com néctar de maracujá
Ferreira <i>et al.</i> , 2011	<i>Byssochlamys fulva</i>	D ₁₀₁ =7,2	5,4	Modelo Alderton Snell
		D ₁₀₄ =2		
		D ₁₀₇ =0,6		
		D ₉₅ =55,2		Tubos TDT com néctar de abacaxi
	<i>Byssochlamys nivea</i>	D ₉₈ =13,6	5,5	Modelo Alderton Snell
		D ₁₀₁ =3,5		
		D ₁₀₄ =0,9		
		D ₈₇ =49.50		
Scaramuzza, & Berni (2014)	<i>Hamigera avellanea</i>	D ₉₀ =7.24	4,35	Embalagens polietileno com suco de maçã (12,7 °Brix; pH 3,8)
		D ₉₅ =0.68		
		D ₈₇ =24.39		
	<i>Thermoascus crustaceus</i>	D ₉₀ =4.67	4,42	
		D ₉₅ =1.82		

1.4 Modelos preditivos primários que descrevem a inativação térmica de fungos termorresistentes

A microbiologia preditiva é uma ciência que descreve, os efeitos de diferentes fatores (intrínsecos e extrínsecos) sobre o crescimento ou inativação microbiana nos alimentos, durante um período determinado. Para isso, utiliza-se modelos matemáticos, com a finalidade de prever o comportamento microbiano (DANNENHAUER, 2010). Porém o uso de modelos preditivos apresentam algumas limitações. Em geral, só podem ser aplicados dentro das condições avaliadas no estudo, não descrevendo bem, comportamentos baseado na extrapolação dos parâmetros. (FAKRUDDIN *et al.*, 2011).

Os modelos preditivos são classificados como modelos primários e secundários. Enquanto os modelos primários descrevem o comportamento em função do tempo, os

modelos secundários descrevem o comportamento microbiano em função de diversos parâmetros como, temperatura, acidez, atividade de água, teor de sal, entre outros (JAGANNATH & TSUCHIDO, 2003).

Em geral, os modelos preditivos baseiam-se nos parâmetros cinéticos de crescimento inerentes ao micro-organismo, como: (λ) duração da fase lag; (μ) velocidade específica máxima de crescimento (velocidade que a população duplica dentro da fase exponencial) e (A) densidade populacional máxima de crescimento final (maior contagem microbiana, na fase estacionária) (BATY & DELIGNETTE-MULLER, 2004).

A fase lag λ , conhecida também como fase de latência, é interpretada como a fase de adaptação do micro-organismo ao meio. Essa fase varia de acordo com as características de cada micro-organismo, assim como as características intrínsecas e extrínsecas do alimento. O tempo da fase lag é inversamente proporcional à taxa de crescimento específica máxima (BARANYI & ROBERTS, 1994).

Após a etapa de adaptação, toda a taxa metabólica do micro-organismo, está em função do seu crescimento, esse período é conhecido como fase log. Esta etapa é onde ocorre a maior atividade metabólica, conhecida também como fase de crescimento exponencial. A velocidade específica máxima é calculada a partir da inclinação da reta, representada pelo crescimento exponencial (MASSAGUER, 2006).

A densidade populacional máxima, é calculada durante a fase estacionária, onde a velocidade de crescimento é igual a velocidade de morte do micro-organismo, apresentando uma linearidade na curva de sobreviventes, pois não há crescimento ou redução da população microbiana (MASSAGUER, 2006).

Em geral, as curvas de sobreviventes de fungos termorresistentes apresentam características não lineares, devido à redução lenta dos sobreviventes. Essa faixa da curva, apresentada no início do processo é conhecida como “ombro”. Diversos autores relatam o aparecimento desse fenômeno na inativação de diferentes fungos termorresistentes, como ascósporos de *Byssochlamys fulva* (KOTZEKIDOU, 1997; ZIMMERMAN, 2012), ascósporos de *Talaromyces flavus* (KING e HALBROOK, 1987; ARAGÃO, 1989; HOFFMANN, 2004), ascósporos de *Monascus ruber* (PANAGOU *et al.*, 2002).

Em virtude da não linearidade das curvas, os modelos preditivos são utilizados para descrever o comportamento da curva e possibilitar a determinação dos parâmetros D e z podem ser obtidos através da aplicação dos modelos preditivos. Entre os modelos mais utilizados estão, os modelo de Weibull (MAFART *et al.*, 2002) e o modelo preditivo de Baranyi's (BARANYI *et al.*, 1993; BARANYI e ROBERTS, 1994),

O modelo de Weibull (Equação 1), descrito por Mafart *et al.*, 2002, é utilizado para descrever curvas de comportamento não lineares, onde são estimados 3 parâmetros, valor de delta (δ), p e N_0 . O parâmetro p descrito na equação, quando assumi valores maiores que 1, as curvas apresentam concavidades voltadas para baixo, indicando que o tempo para inativar um mesmo número de micro-organismos diminui progressivamente. Quando $p < 1$, as curvas apresentam concavidades voltadas para cima, assumindo que a população microbiana reduz rapidamente. Porém, à medida que o processo de destruição ocorre, uma cauda é formada, indicando que a população residual é altamente resistente. Este modelo é muito utilizado para descrever comportamento de fungo (PELEG, 2006; ARAGAO *et al.*, 2007).

$$N(t) = N_0 - (t/\delta)^p \quad \text{Eq (1)}$$

Sendo $N(t)$ a população de micro-organismos (UFC/mL) no instante t (tempo), N_0 a população inicial do micro-organismo (UFC/mL), p o fator de forma, e δ o fator de localização.

Os modelos sigmoidais com função de ajuste tem sido cada vez mais utilizado em detrimento aos modelos puramente sigmoidais, pois estes são capazes de descrever curvas sigmoidal completa devido a descrição da fase lag, diferentemente dos modelos puramente sigmoidais (FUJIKAWA, 2010). O modelo de Baranyi's tem sido um dos modelos sigmoidais com função de ajuste mais utilizados atualmente, ganhando popularidade, principalmente, a partir da disponibilidade da aplicação do modelo pelo uso de dois programas: DMFit e o MicroFit, distribuídos pelo Institute of Food Research, UK.

Curvas de crescimento sigmoidal apresenta três fases: Fase lag, exponencial e estacionária, descrita de forma geral pela equação 2 .

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{lag} \mu_{exp} \mu_{est} N(t) \quad \text{Eq (2)}$$

Onde o fator μ_{lag} descreve o comportamento da fase lag (função de ajuste), o fator μ_{exp} representa a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), o fator μ_{est} o início da fase estacionária (função de inibição) e $N(t)$ o número de células no tempo t (BERNAERTS *et al.*, 2004).

O modelo de Baranyi e Roberts é capaz de estimar 4 parâmetros principais: concentração inicial (y_0), fase lag ou a fase de ombro, velocidade máxima de crescimento ou

constante da taxa de morte e a concentração final, representando o início da cauda ou da fase estacionária (y_{end}) e 2 parâmetros relativos à curvatura: m_{Curv} e n_{Curv} , que descrevem a curvatura do modelo sigmóide no início e no fim da fase de crescimento, respectivamente. No modelo de baranyi's a função de ajuste é representada pela equação 3, enquanto que a função inibição é representada pela equação 4.

$$\mu_{lag} = \frac{q(t)}{q(t)+1} \quad \text{Eq (3)}$$

Sendo $q(t)$ função que representa a concentração do substrato limitante, a qual se altera com o tempo.

$$\mu_{est} = 1 - \left[\frac{N(t)}{N_{max}} \right]^m \quad \text{Eq (4)}$$

Sendo m um parâmetro da curva.

Substituindo as equações 3 e 4, na equação 2, resulta na equação 5.

$$\frac{dx}{dy} = \frac{q(t)}{q(t)+1} \times \mu_{max} \times \left[1 - \left(\frac{N(t)}{N_{max}} \right)^m \right] \times N(t) \quad \text{Eq (5)}$$

A equação 5 tem função explícita, apresentada pela equação 6.

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \left(\frac{1}{m} \right) \ln \left(1 + \frac{\exp(m\mu_{max} F(t)) - 1}{\exp(m(y_{max} - y_0))} \right) \quad \text{Eq (6)}$$

Sendo a função $F(t)$ representada pela equação (7),

$$F(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln \left(\frac{q_0 + \exp(-\mu_{max} t)}{1 - q_0} \right) \quad \text{Eq (7)}$$

2 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAGÃO, M.F.G. **Identificação e determinação da resitência térmica de fungos termorresistentes isolados de polpa de morango.** Campinas, 1989. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

ARX, JA. The genera of fungi sporulating in pure culture. **J. Cramer.** 1970.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A., MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiol.** V 10, p 43-59, 1993.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **Int. J. of Food Microbiol.** v 23, p 277-294, 1994.

BARNARD, E.L, CANNON, P.F., A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. **Mycologia.** v.79: p.479_484, 1987.

BATY, F. AND DELIGNETTE-MULLER, M.L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?. **Int. J. Food Microbiol,** 91: 261-277, 2004.

BEUCHAT, L. R.; RICE, S.L. *Byssochamys*. spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research,** v.25, p.237-288, 1979.

BRACKETT, R. E., Fruits, vegetables and grains. **Food microbiology, fundamentals and frontiers.** Washington, DC, USA: ASM Press, p. 1 27-138, 2001.

CANNON PF, ABDULLAH SK, ABBAS BA. Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. **Mycological Research.** v. 99: p. 659_662.1995.

CARTWRIGHT, P.; HOCKING, A. D. *Byssochamys* in fruit juices. **Food Tech.** In Aust. 36(5): 210-211, 1984.

CASELLA, M.L.A.; MATASCI, F.; SCHMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *B. nivea* ascospores. **LWT – Food Science and Technology,** v.23, p.404-411, 1990.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa. Madrid. 2004.

DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva.** Florianópolis. 2010. 147p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos apresentada ao. Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina,

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R.M.; MANNAN, K.S.B. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science [online],** v. 40, n. 2, p.121-131, 2011.

FERREIRA, E. H. D. R., MASSON, L. M. P., ROSENTHAL, A., SOUZA, M. D. L., TASHIMA, L., & MASSAGUER, P. R. D. Termorresistência de fungos filamentosos

isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14, 164-171, 2011.

FUJIKAWA, H. Development of a New Logistic Model for Microbial Growth in Foods. **Biocontrol Science**, v. 15, n. 3, p. 75-80, 2010.

GUARRO, J., G, J., STCHIGEL, A. M., FIGUERAS, M. J. Atlas of Soil Ascomycetes. Netherlands: CBS Biodiversity Series, 2012, 10. p 277-280

HOCKING AD, PITT JI., Two new species of xerophilic fungi and a further record of Eurotium halophilicum. **Mycologia** 80: 82_88. 1988.

HOFFMANN, M.V.G.S. **Estudo de Resistência Térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã**. Santa Catarina. 100p. Tese (Doutorado em Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, 2004).

HULL, R. Studies of *Byssochlamys fulva* and Control Measures in Process Fruit. *Appl. Biology* v 26 p 800-822, 1984

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2003.

KING, A.D.; HALBOOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254, 1987.

KOTZEKIDOU, P., Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of food science**, vol. 62, No. 2, 1997.

Li, ZQ., A new species of the genus *Monascus*. **Acta Microbiologica Sinica** 22: 118_122. (1982).

LI, ZQ., GUO, F. A further studies on the of *Monascus*. **Mycosystema**, v. 23 (1), pg 1-6, 2004

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I, On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model, **International Journal of Food Microbiology**, v,72, p,107-113, 2002.

MASSAGUER, Pilar Rodriguez. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005

PANAGO, E. Z; SCHILLINGERB, U.; FRANZ, C. M.A.P.; NYCHAS, G-J. E.. Microbiological and biochemical profile of *Cv. Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v 25, p 348-358, 2008.

PANAGO, E.Z., KATSABOXAKIS, C.Z., NYCHAS, G.-J.E., Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. **Int. J. Food Microbiol.** 76, p.11–18. 2002.

PELEG, MICHA. Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: models for Predicting Growth and Inactivation. CRS Series in Contemporary. **Food Science.**, 2006.

PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, p. 297-299, 1994.

SALOMÃO, B. C. M., MASSAGUER, P. R., COSTA, C. A., ARAGÃO, G. M. F. Influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.15, n.1, p.7-10, 2004.

SALOMÃO, B. C. M., SLONGO, A. P., & ARAGÃO, G. M. F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **LWT - Food Science and Technology**, 40(4), 676-680, 2007

SCARAMUZZA, N., & BERNI, E. Heat-resistance of *Hamigera avellanea* and *Thermoascus crustaceus* isolated from pasteurized acid products. **International Journal of Food Microbiology**, 168–169(0), 63-68, 2014

SLONGO, A. P., & DE ARAGÃO, G. M. F. Avaliação da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* E de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 25(2), 2007.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. 6.ed. Netherlands : Centra albureau Voor Schimmelcultures. 2000. p.42.

STCHIGEL AM, CANO J, ABDULLAH SK, GUARRO J., New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. **Stud Mycol.** v.50: p.299–306. 2004

TANIWAKI, M.H. e SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção**. Laboratório de Microbiologia, ITAL, Campinas, 1996.

TIEGHEM, P. van., *Monascus* genre nouveau de l'ordre des ascomycètes. **Bulletin de la Société Botanique** 31: 226_231. 1884.

TOURNAS, V.. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Crit. Rev. Microbiol.** 20 (4), 243-263, 1994.

UDAGAWA S, BABA H *Monascus lunisporas*, a new species isolated from mouldy feeds. **Cryptogamie Mycologie** 19: 269_276. 1998.

WENT., *Monascus purpureus*, le champignon de l'ang-quac, une nouvelle thélébolée. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique** 8: 1_18. 1895

ZIMMERMANN, M. **Resistência de esporos de byssochlamys fulva e bacillus coagulans em polpa de tomate sob condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas.** Santa Catarina: 2012 p 165. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal De Santa Catarina).

CAPÍTULO 3

INHIBITION OF *MONASCUS RUBER* GROWTH IN TABLE GREEN OLIVES OF ARAUCO CULTIVAR BY HURDLE TECHNOLOGY.

Em preparação para Revista Food Control (A2)

ABSTRACT

An ascomycete fungus was isolated for the first time from deteriorated brine storage of green olives of Arauco cultivar imported from Argentina and identified as *Monascus ruber*. Combined effects of different levels of sodium chloride (3.5 – 5.5%), sodium benzoate (0 – 0.1%), potassium sorbate (0 – 0.05%) and temperature (30 – 40 °C) on growth of *Monascus ruber* after 10, 30 and 50 days was investigated in brine of stored table olives using a response surface modeling. A full 2^4 factorial design with three central points was first used in order to screen the important factors and then a face-centered central composite design (FCCCD) was applied. Both preservatives prevented the fungal spoilage, but the potassium sorbate showed to be the most efficient preservative to eliminate the fungal population. Combined use of these preservatives did not show a synergy. The results showed that the use of sodium chloride may not be sufficient to prevent the fungal spoilage and at 30 °C enabled the major fungal growth. Results from this research could assist table olive industry to prevent the fungal spoilage in table olives in order to assure products with safety and quality standards.

Keys -word: *Monascus ruber*, table olives, hurdle technology.

1 INTRODUCTION

Table olive is one of the main fermented vegetable product in the western world. The fruit of the olive tree is considered unsuitable for fresh consumption, because of the presence of oleuropein, a glycoside naturally presented in the responsible for its bitter taste (F. Arroyo-López, Bautista-Gallego, Rodríguez-Gómez, & Garrido-Fernández, 2010). The main objective of the fruit processing is the elimination of oleuropein. There are several processes types, the most important known as Californian style, Greek Style and Spanish Style (Fernández, Fernandez-Diez, & Adams, 1997).

Monascus is a fungus belonging to the class of ascomycetes. The genus is characterized by the production of heat-resistant ascospores able to survive thermal pasteurization treatments (Brackett, 2001).

Monascus ruber is an important specie related to deterioration in food. This fungus is found in soil and is related to fruit post-harvest contamination. It is able to develop in an environment with low oxygen tension, low pH and high salt (NaCl) concentration. In table olives, deterioration results in fruit softening and increase the pH of brine, without necessarily growth of fungus mycelium on the brine surface. Such alterations cause, in addition to economic losses, risks of microbiological instability and product unsafety (E. Z. Panagou, Katsaboxakis, & Nychas, 2002).

Moulds spoilage could be controlled by the combining intrinsic and extrinsic factors. This technique is known as hurdle technology and involves the use of several factors like: pH, water activity, addition preservatives and temperature in combination, which may act synergistically to inhibit or retard microbial growth (Leistner & Gorris, 1995; López-Malo, Barreto-Valdivieso, Palou, & Martín, 2007). However, the antagonistic effects could be occur and the effectiveness of the antimicrobials would be greatly reduced (López-Malo, Maris Alzamora, & Palou, 2005).

The addition of preservatives is one of the most commonly techniques used in food preservation. Food safety is always increased and ensured by the use of these additives (Guynot, Ramos, Sanchis, & Marín, 2005; López-Malo, *et al.*, 2007; Rojo, *et al.*, 2015).

The efficiency of preservatives, like benzoate and sorbate is strictly dependent on the pH environment and the pKa of acids group. At low pH, these preservatives are more likely be in the undissociated state. This form allows additives to pass freely across the lipid membrane and inhibits the microbial growth (Bevilacqua, Campaniello, Sinigaglia, Ciccarone, & Corbo, 2012; Hirshfield, Terzulli, & O'Byrne, 2003).

According to the Trade Standards for Table Olives (IOOC), table olives can be preserved by heat treatment or by brine characteristics adjustment ($\text{pH} \leq 4.0$), with or without the use of preservatives. Among the allowed preservatives are benzoic and sorbic acid, as well as their corresponding salts of sodium and potassium, in the maximum limits at 1000 and 500 ppm, respectively (COI, 2004). However, information about the effect of the combined use of these preservatives in the fungus growth on table olive is still scarce.

The aim of this study was to evaluate the effects of combined use of several factors (NaCl, temperature, potassium sorbate and sodium benzoate) at different levels on the growth of *Monascus ruber* and the related spoilage of table olives after a period of 10, 30 and 50 days.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Fungal isolates and identification

The fungus was isolated from plastic drums containing 180 kg of olives Arauco cultivar, during its storage in brine ($\text{pH}=3.8$ and 10 % NaCl). Isolation was realized by inoculating 1mL of contaminated brine in PDA (Potato Dextrose Agar) acidified with 10 % tartaric acid, and incubated at 30 °C for 7 days. Identification of microorganism was made from the observation of micro and macroscopic characteristics, according to the method of key differentiation described by Udagawa & Baba, (1998) and modified by Stchigel, Cano, Abdullah, & Guarro, (2004). Microscopic evaluated characteristics were: the number of ascospores inside the asci, pigmented of ascomata, size and form of ascospores and presence/absence of patches on ascomata wall. Macroscopic evaluated characteristics were: colonies growth/no growth on CYA or MEA, presence/absence of soluble pigment and color of pigment formed. The measurements of microscopic structures were taken with lactophenol as mounting medium. These characteristics were evaluated after fungi growth on CYA (Czapeck Agar Yeast Extract) and MEA (Malt Extract Agar) at different temperatures (25 and 30 °C for 7 days).

2.2 Preparation of ascospore suspension

The fungus was grown in roux bottle containing 200 mL of nonacidified PDA for 1 month at 30 °C. Ascospores were harvested after scraping the inoculated PDA surface with a

sterile spatula using 10mL of sterile distilled water containing 0.1 % Tween 80 followed by filtration to remove hyphal fragments. The ascospores suspension was homogenized in vortex for 3 min to open the cleistothecia and liberate the ascospores. The procedure was followed by microscopic observation to assure a high proportion (> 90 %) of free ascospores. Microscopic counting in a Neubauer chamber resulted in 10^5 ascospores/ml suspension. Ascospores suspension was stored at 4 °C serving as inoculum for all experiments.

2.3 Experimental design

2.3.1 Full 2^4 factorial design

A full 2^4 factorial design with three central points was carried out to evaluate the effect of the concentration of NaCl (X_1); sodium benzoate (X_2); potassium sorbate (X_3); temperature (X_4) and their interactions on the fungal growth and his spoilage after 10, 30 and 50 days. Table 1 shows the codes, original variables and the level of the factors. The levels of the independent variables, like: sodium benzoate (X_2) and potassium sorbate (X_3) were selected based on the Trade Standards for Table Olives (COI, 2004). The gradients of NaCl (X_1) were chosen because it is commonly use by Brazilian table olive industries, while that the levels of temperature (X_4) were chosen according climatic conditions during storage of table olives in the country. Design of experiment was used by Statistica 7.0 software package (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) and performed a statistic analysis at 95 % confidence interval, such as analysis of variance (ANOVA), the Pareto chart standardized effects and the histogram of normal distribution residuals.

Table 1 - A full 2^4 factorial design with three central points. The codes, originals variables and the level of the factors.

Factors	Variables	Unit	Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
X_1	Sodium chloride (NaCl)	%	3.5	4.5	5.5
X_2	Sodium Benzoate	%	0.0	0.05	0.1
X_3	Potassium Sorbate	%	0.0	0.025	0.05
X_4	Temperature	°C	30	35	40

2.3.2 Face-centered central composite design (FCCCD)

From the results analyzed in the full 2^4 factorial designs, it could be seen the importance (Difference Significance) of the factors and checked the significance of the curvature, reflecting the need to conduct a more comprehensive experimental design. A FCCCD was done and analysis of variance (ANOVA) at 95 % confidence intervals realized. The experimental data were analyzed using response surface models and fitted to a polynomial model significant regression coefficients of the coded terms were utilized to predict the fungal growth. To evaluate the normality of distribution residues a Shapiro-Wilk numerical test was performed (Granato, de Araújo Calado, Jarvis, 2014).

2.4 Preparation of table olives samples

Each sample of table olive was prepared using fifteen green olives of Arauco cultivar (graded-size 320/360 olives/Kg), with 200 mL of acidified brine. The formulation was prepared according to the experimental design. The acidification was performed with the necessary amount of lactic acid 85 % to reach the final pH around 3.5 units. Initially, the samples were pasteurized at 100 °C for 10 minutes, with the aim of eliminating the current microbiota, allowing to evaluate only the growth and the resultant spoilage due to *Monascus ruber* contamination. Preliminary experiments showed that such a binomial time x temperature was the most appropriate treatment. Pasteurized samples of table olives were inoculated with 0,2 mL the ascospores suspension (section 2.2), to reach a level of around 10^2 ascospores per mL of brine. The samples were incubated at temperatures set in the experimental design.

2.5 Microbiological analysis and pH measurements

For enumeration of microbial growth 1 mL aliquot of sample was added to dilution tubes containing 9 ml of sterile distilled water. After subsequent decimal dilutions, the inoculation was performed by pouring in nonacidified PDA (Fluka - Sigma-Aldrich) in duplicate. All plates were incubated at 30 °C for 48 – 72 h. For each sample, the results were obtained by average counting of two plates and expressed as \log_{10} values.

3 RESULTS

3.1 Fungus identification

Figure 1 shows images of the microscopic and macroscopic structures which enabled the identification of the specie as *Monascus ruber*. The characteristics were: colonies growth on MEA and CYA (Figures 1a to 1d); presence of an undetermined number of ascospores in the ascomata (Figure 1e); ascomatal wall without patches and presence of ascomata pale coloured (Figure 1f); ascospores longer than 5µm (Figure 1g).

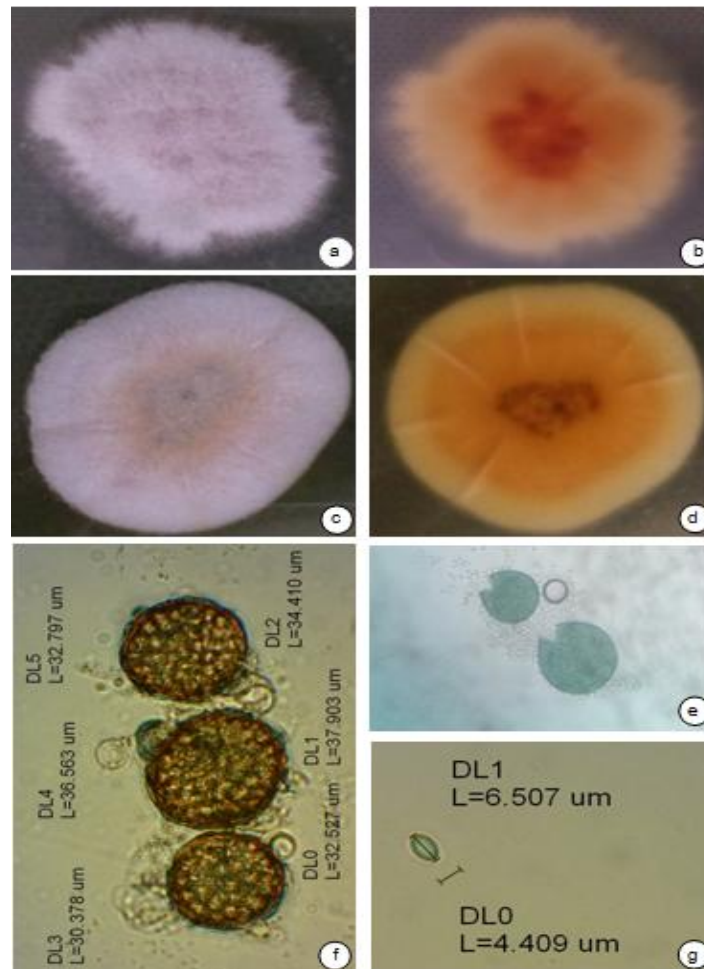


Figure 1: The characteristic of *Monascus ruber*. 1a-1b Colonies growth on Czapeck Agar Yeast Extract (CYA), representing the front characteristics (Fig 1a) and reverse characteristics (Fig 1b). 1c-1d Colonies growth on Malt Extract Agar (MEA), representing the front characteristics (Fig 1c) and reverse characteristics (Fig 1d). 1e. Undetermined ascospores inside of ascomata. 1f. Detail and size of ascomata. 1g. Detail and size of ascospores.

3.2 Effect of individual hurdles on microbial growth

The individual and combined effect of the independent variables on *Monascus ruber* growth at 10, 30 and 50 days are shown in Table 2. The results of fungal growth, was express in $\log_{10}(N/N_0)$ because it's very comom to conversion the data from microbial growth in mathematical transformation, like log transformation, to facilitated to obtaneid normal distribution of the data (Jarvis, 2008).

Table 2 - The results ($\log_{10} N/N_0$) of the factors effects in fungal growth for 10, 30 and 50 days. Evaluated by full 2^4 factorial design with three central points.

Standard order	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	$\log_{10} N/N_0$ (10 days)	$\log_{10} N/N_0$ (30 days)	$\log_{10} N/N_0$ (50 days)
1	3.5	0.0	0.0	30	1,53	1,72	1,95
2	5.5	0.0	0.0	30	1,35	1,55	1,66
3	3.5	0.1	0.0	30	0,26	0,40	0,55
4	5.5	0.1	0.0	30	0,27	0,47	0,72
5	3.5	0.0	0.05	30	-0,74	-0,81	-0,94
6	5.5	0.0	0.05	30	-1,03	-0,82	-0,88
7	3.5	0.1	0.05	30	0,37	0,60	0,32
8	5.5	0.1	0.05	30	0,26	0,54	0,80
9	3.5	0.0	0.0	40	1,09	1,62	2,00
10	5.5	0.0	0.0	40	1,05	1,53	1,86
11	3.5	0.1	0.0	40	0,16	0,28	-2,12
12	5.5	0.1	0.0	40	0,28	0,26	-2,03
13	3.5	0.0	0.05	40	-1,12	-1,17	-2,42
14	5.5	0.0	0.05	40	-1,09	-0,93	-1,95
15	3.5	0.1	0.05	40	0,04	0,07	-2,42
16	5.5	0.1	0.05	40	0,23	0,23	-0,47
17 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0,14	0,05	-0,09
18 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0,11	-0,26	-0,55
19 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0,23	-0,45	-0,06

The Pareto chart of Standardized Estimate Effect (Absolute Value) was constructed in order to evaluate the significance of each independent factors and their interactions (Figure 2). The factors and integrations that are positioned on the right to the p-value line present significant effects ($p < 0,05$). The factors that represent the highest influence in the response present the greatest absolute values. The signal shows if the factors have negative or positive influence in the fungal growth ($\log_{10}(N/N_0)$), in other words if it reduces or enhances the concentration of the fungus.

The plot of the means (Figure 3) were done to evaluated the effects of the significant interactions terms between sodium benzoate and potassium sorbatein the fungal growth at 10, 30 and 50 days based on the averages of the response values at the lower and higher levels.

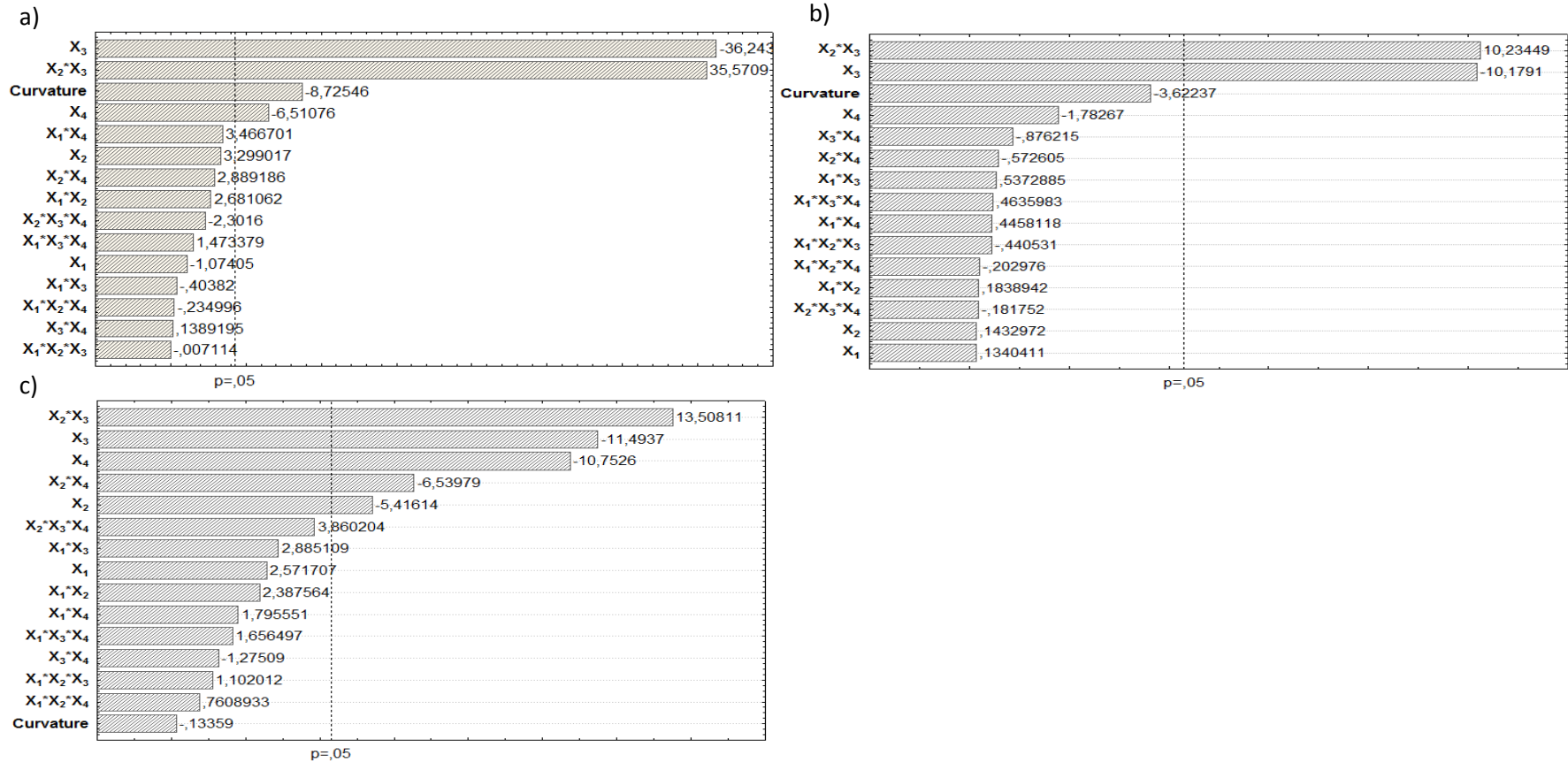


Figure 2: The Pareto chart of absolute standartized values of fungal growth at 10 days (a); 30 days (b) and 50 days (c) resulting from the model obtained by a full 2^4 factorial design with three central points.

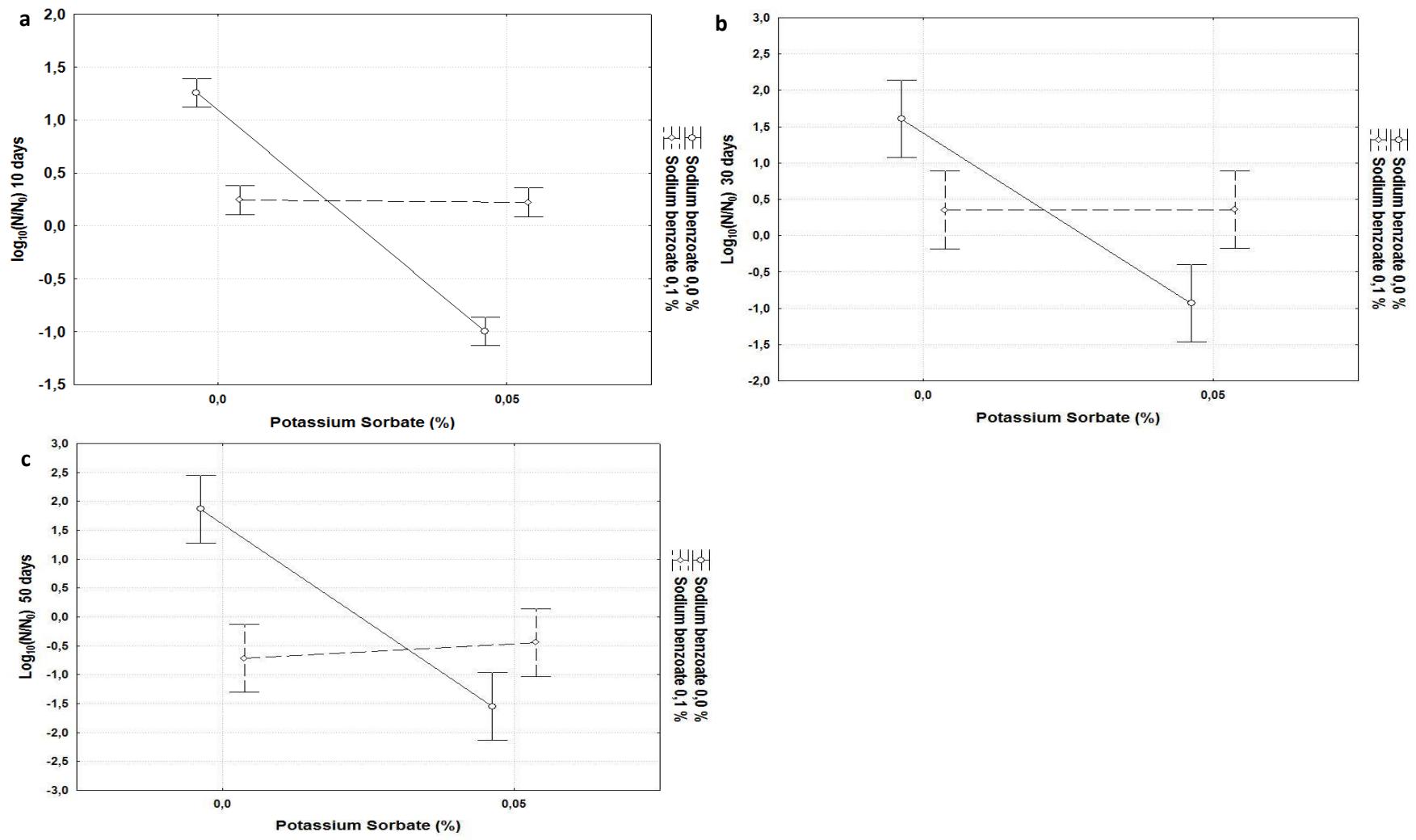


Figure 3-Plot with the mean values of the influence of factors significant interactions between preservatives in the growth of the *Monascus ruber* in table green olives of Arauco cultivar after 10 days (a); 30 days (b) and 50 days (c).

3.2.1 Results of fungal growth at 10 days

In figure 2a the Pareto chart shows the importance of the terms and their interactions after 10 days of fungal growth. By analyzing the graph it can be seen that significant terms in decreasing order of significance were: potassium sorbate (X_3); interaction between sodium benzoate and potassium sorbate ($X_2 * X_3$) and temperature (X_4). However, it is surprising that the interaction of $X_2 * X_3$ had a positive influence in the response at 95 % confidence interval. In the graph it could also be observed the significance of curvature, indicating the presence and influence of quadratic terms in the fungal growth model (Montgomery, 2008). So, it was necessary to employ a surface model design to achieve an optimal condition in order to reduce or eliminate the fungal growth and its deterioration.

According to Figure 3a, samples prepared without addition of preservatives showed average values at $\log_{10}(N/N_0)$ of 1.26, an increase of approximately 1 log cycle regarding the initial concentration, reaching the highest growth rate after 10 days. During the same period, in the samples added only with benzoate (0.1 %) it was observed very significant inhibitory effect on fungal growth rate, leading to an inhibition of about 80 % of the fungal population, when compared with the samples without the addition of preservatives. The results showed mean value equal to 0.24 $\log_{10}(N/N_0)$, showing that sodium benzoate is an important fungistatic agent. By contrast, according to the graph, it is observed that the use of sorbate at levels greater than 0.025 % there was a reduction in the initial count of the fungal population. About 90 % of the population was eliminated when it was used sorbate 0.05 %, indicating that the sorbate has a fungicidal effect on fungus. In contrast, the combined use of benzoate (0.1 %) and sorbate (0.05 %) in the table olives showed that response of growth was almost identical to the samples added only with benzoate (0.1 %), being indifferent the combined use of both factors. For this reason, the value found in the Pareto chart (Fig1a) presented positive signal, indicating that the interaction of the terms allowed the development of the fungus, although it is a very low growth due to the fungistatic effect.

Only in the samples without preservatives it was observed the development of mycelial mat on the brine surface and an increase in its pH. Figure 4 shows the visible growth of the fungus in the table olives brine. In figure 4a shows the samples incubated at 30 °C with 3.5 % of sodium chloride. In this sample it has occurred the highest development and greater increase in pH of 3.5 for 4.0 units.

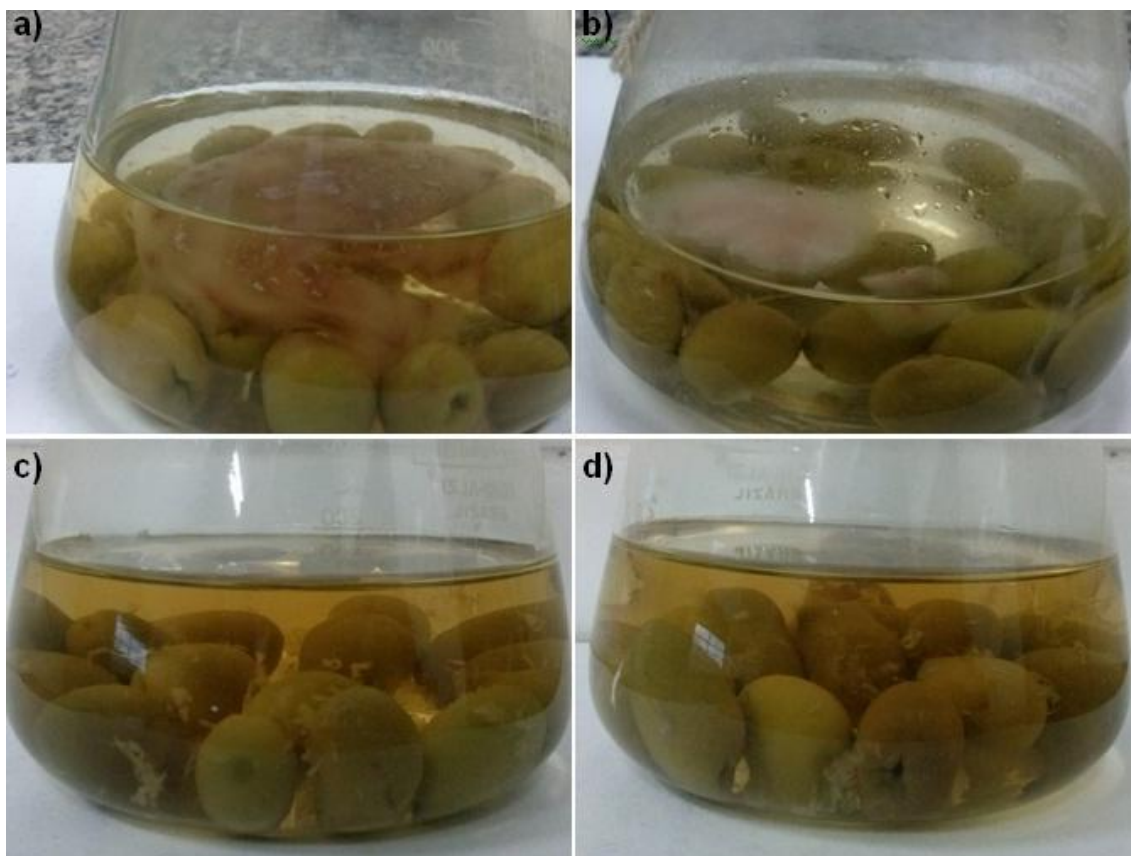


Figure 4. The development of mycelial mat on the brine surface of table green olives (Arauco cultivar) treated without preservatives. Letters (a) and (b) refer to samples incubated at 30 °C added with 3,5 % and 5,5 % of NaCl, respectively. Letters (c) and (d) correspond to samples incubated at 40 °C added with 3,5 % and 5,5 % of NaCl, respectively.

3.2.2 Results of fungal growth at 30 days

In Figure 2b the Pareto chart shows the terms and interactions that has significantly influenced the fungal growth after 30 days. The significant terms were potassium sorbate (X_3) and the interaction between sodium benzoate and potassium sorbate ($X_2 * X_3$) at 95 % confidence interval. It can be observed that the curvature was not significant, showing that had not the quadratic terms, so surface analysis design were not necessary. The mean values of significant terms after 30 days of growth are shown in Figure 3b. The results show a slightly higher growth rate after 10 days, and presented the same trend behavior on fungal growth after 10 days (Fig2a).

For all samples treated without preservatives, the pH increase was above of 4,5 units corresponding to a severe safe risk including possible growth of *Clostridium botulinium*.

3.2.3 Results of fungal growth at 50 days

According to Figure 2c, significant terms after 50 days of growth were: interaction between sodium benzoate and potassium sorbate ($X_2 * X_3$), potassium sorbate (X_3), temperature (X_4), interaction between sodium benzoate and temperature ($X_2 * X_4$) and sodium benzoate (X_2).

Figure 3c present the results of the interactions of the $X_2 * X_3$. In Figure 3c, by analyzing the results of the averages, it is observed that even after 50 days the fungal growth could be observed. In comparison to the initial concentration of the fungus, after 50 days there was an increase of two logarithmic cycles in fungus population. In general, the results indicated that the interaction effects between benzoate and sorbate showed the same trend in responses obtained after 10 and 30 days of growth. The results demonstrate that the use of preservatives helps in controlling the fungal growth and the resulting deterioration and the potassium sorbate was the most effective preservatives, due to their fungicidal action.

3.3 Reponse surface methodology of FCCCD

After evaluating the importance of the factors on the fungal growth at 10, 30 and 50 days using the a full 2^4 factorial design, a face-centered central composite design (FCCCD) with three central points was used to find the best set of values, giving the optimal condition to control the fungal growth and the resulting deterioration.

To perform the FCCCD, it was considered only the result of growth after 10 days due to the fact that the curvature was significant in the preliminary analysis of the full 2^4 factorial design, as shown in Figure 2a. For choosing the factors to be analyzed in FCCCD, it was used as a criterion the factors that have shown strong and weak effect on fungal growth, in other words the significant ($p < 0.05$) and the marginally significant ($0.05 > p < 0.1$) factors.

Table 3 shows the the results obtained after 10 days of fungal growth resulting from the FCCCD. From the ANOVA, a polynomial model was developed based on the regression analysis of the significant and marginally significant coded terms. Model resulting from the regression analysis are shown in Eqs. (1) below.

$$Y (10 \text{ days}) = 0,167 + 0,058X_2 + 0,258X_2^2 - 0,534X_3 - 0,082X_4 - 0,226X_4^2 + 0,054X_1 * X_4 + 0,558X_2 * X_3$$

Table3 - The results ($\log_{10} N/N_0$) of the factors effects in fungal growth for 10 days evaluated by FCCCD with three central points.

Standard order	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	$\log_{10} N/N_0$ (10 days)
1	3.5	0.0	0.0	30	1.53
2	3.5	0.0	0.0	40	1.09
3	3.5	0.0	0.05	30	-0.74
4	3.5	0.0	0.05	40	-1.12
5	3.5	0.1	0.0	30	0.26
6	3.5	0.1	0.0	40	0.16
7	3.5	0.1	0.05	30	0.37
8	3.5	0.1	0.05	40	0.04
9	5.5	0.0	0.0	30	1.35
10	5.5	0.0	0.0	40	1.05
11	5.5	0.0	0.05	30	-1.03
12	5.5	0.0	0.05	40	-1.09
13	5.5	0.1	0.0	30	0.27
14	5.5	0.1	0.0	40	0.28
15	5.5	0.1	0.05	30	0.26
16	5.5	0.1	0.05	40	0.23
17	3.5	0.05	0.025	35	0.25
18	5.5	0.05	0.025	35	0.42
19	4.5	0.0	0.025	35	0.46
20	4.5	0.1	0.025	35	0.67
21	4.5	0.05	0.0	35	0.61
22	4.5	0.05	0.05	35	0.10
23	4.5	0.05	0.025	30	0.00
24	4.5	0.05	0.025	40	0.16
25 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0.14
26 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0.11
27 (C)	4.5	0.05	0.025	35	-0.23

Based on the ANOVA of the FCCCD resulting data (table 4), the quality of fit of the response model was evaluated. To determine the accuracy of the quadratic response surface model to predict the fungal growth in table olives, it was observed the R^2 (coefficient of determination), the adjusted $-R^2$ and the distribution of the residuals.

Table 4 - ANOVA results of the fungal growth ($\log_{10}N/N_0$) from the FCCCD designs with three central points for 10 days.

Source	Sum of squares	df*	Mean squares	F - value	P - value
Model	10.74	7	1.53	389.38	
X₂	0.06	1	0.06	15.36	0.0594
X₂²	0.22	1	0.22	56.33	0.0173
X₃	5.14	1	5.14	1302.90	0.0008
X₄	0.12	1	0.12	30.68	0.0311
X₄²	0.17	1	0.17	43.08	0.0224
X₁*X₄	0.05	1	0.05	12.02	0.0741
X₂*X₃	4.99	1	4.99	1265.29	0.0008
Lack of Fit	0.88	17	0.05	13.20	0.0727
Pure Error	0.01	2	0.00		
Total SS	11.48	26			

* df = Degrees of freedom
 $R^2 = 0.9223$; $R_{Adj} = 0.8937$

In table 4, it can be noted that the R^2 and adjusted $-R^2$ values were 0.9223 and 0.8937, respectively. Considering that the response analyzed was microorganism growth, these values reveal the great accuracy and good fit of the data to the model.

The normal distribution of residuals was analyzed using the numerical method of Shapiro–Wilk (SW) and graph methodology, as show in figure 5. It could be risky to claim a normal distribution by graphical method, so the numerical methodology is the best way to describe the normality data (Granato, de Araújo Calado, & Jarvis, 2014). The test of Shapiro–Wilk showed to be the most powerful and efficient in compare of other tests, like: Anderson–Darling, Kolmogorov–Smirnov, Shapiro–Wilk and Lilliefors.(Razali & Wah, 2011).

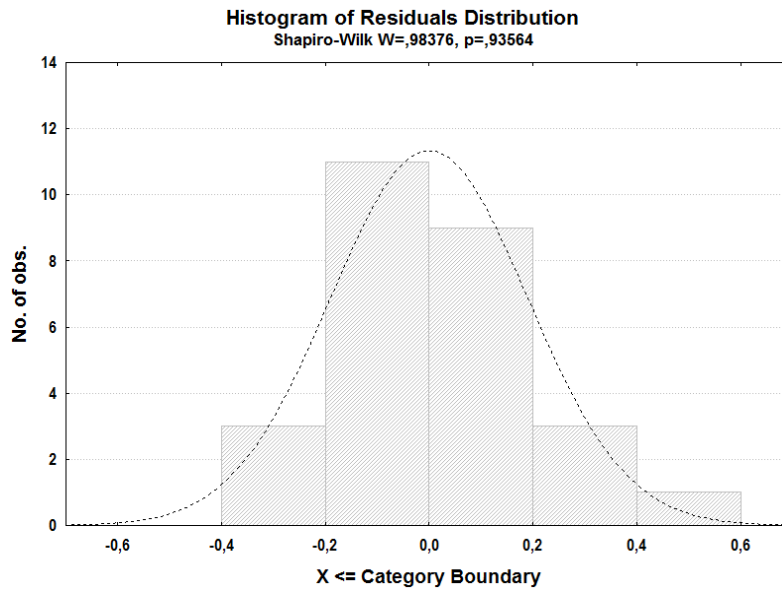


Figure 5. Histogram of residuals distribution overlaid on a normal distribution plot. The test of Shapiro–Wilk proved the normality of residuals distribution ($p = 0.93564$).

Figure 6 present the response surface plot of the interactions between potassium sorbate and sodium benzoate. In the graph it is possible to observe that the use of preservatives have a great influence on the fungal growth. The region of the maximum growth occurs when preservatives are not utilized. The samples prepared without preservatives showed an increase of brine pH and visual growth of the fungus. The pH increase was higher at 30 °C and NaCl 3.5 %.

By analyzing the effectiveness of the preservatives, from Figure 6 it can be observed that sorbate was more efficient than benzoate towards fungal growth inhibition. It can be seen that the increase in the concentration of sorbate provides greater effect on the prevention of microbial growth in comparison to benzoate. It is necessary to use lower concentration of sorbate to reach lower rates of growth, so it is possible to conclude that sorbate has higher inhibitory effect to the fungus. Only by using sorbate it was possible to reduce the initial concentration of the fungus, demonstrating the fungicidal effective. As it can be seen in Figure 6 that the region that provided satisfactory results involved concentration of potassium sorbate higher than 0,025 %. In such a region the lower concentration of preservatives allowed reaching fungal growth inhibition and deterioration of table olives.

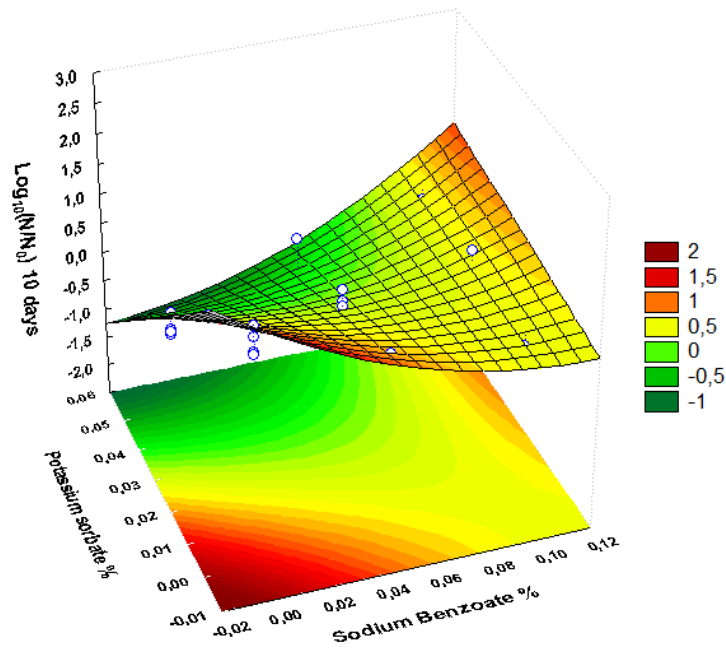


Figure 6. Response surface plot showing the effect of Potassium sorbate (X_2) and sodium benzoate (X_3) in the fungal growth ($\text{Log}_{10}(N/N_0)$) after 10 days.

4 DISCUSSION

By inoculating the *Monascus ruber* fungus isolated from spoiled green olives of Arauco cultivar, it was possible to further study and evaluate the inhibitory effects of salt (NaCl); potassium sorbate; sodium benzoate and temperature on the fungus growth in the stored product. In some countries like Brazil this type of deterioration caused by fungi is quite common during storage of fruits. Therefore the study of the individual and interactive effects is essential to ensure the safe production of table olives.

Based on the results, one can conclude that the fungus is salt (NaCl) tolerant, since there was growth in the samples even after 50 days of storage. These results show that the use of salt may not be sufficient to prevent the fungal spoilage. This conclusion is consistent with work by E. Z. Panagou, Skandamis, & Nychas, (2005), who isolated the fungus *Monascus ruber* from processed green table olives of Conservolea cultivar in Greece, and observed that this fungus may grow in brine containing 9 % of NaCl, thus evidencing the salt tolerance.

In our paper, the influence of temperature for all analysed period demonstrated major fungal growth when exposed to a temperature of 30 °C. This result is also in agreement with the previous mentioned study E. Z. Panagou, *et al.*, (2005) who evaluated the fungal growth by

gradient plate technique at 20, 30 and 35 °C and observed that the optimal conditions was similarly obtained when incubated at 30 °C.

Preservatives are used in several products to control fungal growth and spoilage. Organic acids like sorbic and benzoic acids are the most common preservative in foods (Suhr & Nielsen, 2004). The effectiveness of these compounds depends on many environment factors, like: pH, temperature, a_w , physical matrix of food) and their concentration (Fleet, 2011). The action is extremely pH-dependent because the microbial inhibition is due to their undissociated form, which is influence by the acid pKa. This form allows the preservatives to penetrate into the cell and to promote the cytoplasm acidification, thus inhibiting the fungal growth (Lambert & Stratford, 1999; Stratford, *et al.*, 2013).

In general, the sorbic acid (pKa = 4.76) tends to be more effective than benzoic acid (pKa = 4.20) due to the higher pKa. Consequently, there will always be a higher concentration of undissociated form in sorbic acid compared to the benzoic acid (Rojo, *et al.*, 2015).

In this study, the results showed the greater efficacy of potassium sorbate in inhibiting fungal growth compared to sodium benzoate, allowing the destruction of the initial fungus concentration when applied the maximum allowed amount. Similar results were obtained when evaluating the effect of these preservatives in inhibiting native yeast cocktail from table olives (F. N. Arroyo-López, Bautista-Gallego, Durán-Quintana, & Garrido-Fernández, 2008).

Arroyo López, Quintana, & Fernández, (2007) evaluated, in table olives and in presence of 0,05 % sodium benzoate, the resistance of *Issatchenkia occidentalis* isolated by (Arroyo, Durán, & Garrido, 2006). The results showed that this fungus was very resistance to preservatives, being inhibited by 0,03 % potassium sorbate. These results are somehow similar to the ones found by *Monascus ruber* in our work, that showed inhibition to the fungus at concentrations higher than 0,025 % potassium sorbate.

The combined use of two antimicrobial agents can produce different effects on the microbial population such as synergism, antagonism, and additive effects (Bidlas & Lambert, 2008; Denyer, Barry Hugo, & Harding, 1985). The results of this work showed that the combined use of preservatives in table olives did not result in synergistic effect, as expected. When used in combination, benzoate inhibited the action of sorbate on the fungus. This effect can be clearly seen in Figure 5. These results were according to the works by F. N. Arroyo-López, *et al.*, (2008) who evaluated by FIC methodology the effect of using sorbate and benzoate on a native yeast cocktail in table olives.

Probably, this phenomenon was due to the fact that these preservatives have the same mechanism of action on the microbial cell. The synergistic effect generally occurs when several antimicrobial factors that have different mechanisms of action are used in combination, thus promoting a greater associated impact than the additive or individual effect (Hugbo, 1976; Leistner, 2000; Leistner & Gorris, 1995).

5 CONCLUSIONS

Results of this research showed that combined use of sorbate potassium and sodium benzoate did not present a synergic effect, as expected, and sorbate potassium was the most efficient preservative to prevent *Monascus ruber* deterioration. Based on the response surface, the minimum inhibitory concentration was around 0.03 % of sorbate potassium. Results could be used in table olives industry to assist preventing the fungal spoilage. Its survival and growth can lead to deterioration including the pH increase up to pH up to risky levels related to pathogen. The knowledge of the combined technologies with appropriate hurdle levels in combination can contribute to design and control the process in order to assure safety and quality products to safety the consumer market demands.

6 REFERENCES

- ARROYO-LÓPEZ, F., BAUTISTA-GALLEG0, J., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F., & GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Predictive microbiology and table olives. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 1452-1461, 2010.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N., BAUTISTA-GALLEG0, J., DURÁN-QUINTANA, M. C., & GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives. **Food Microbiology**, 25(4), 566-574, 2008.
- ARROYO, L. F., DURÁN, Q. M., & GARRIDO, F. A. Microbial evolution during storage of seasoned olives prepared with organic acids with potassium sorbate, sodium benzoate, and ozone used as preservatives. **Journal of food protection**, 69(6), 1354-1364, 2006.
- ARROYO LÓPEZ, F. N., QUINTANA, M. C. D., & FERNÁNDEZ, A. G. Modelling of the growth–no growth interface of *Issatchenkia occidentalis*, an olive spoiling yeast, as a function of the culture media, NaCl, citric and sorbic acid concentrations: Study of its inactivation in the no growth region. **International Journal of Food Microbiology**, 117(2), 150-159, 2007.
- BEVILACQUA, A., CAMPANIELLO, D., SINIGAGLIA, M., CICCARONE, C., & CORBO, M. R. Sodium-benzoate and citrus extract increase the effect of homogenization towards spores of *Fusarium oxysporum* in pineapple juice. **Food Control**, 28(2), 199-204, 2012.
- BIDLAS, E., & LAMBERT, R. J. W. Quantification of hurdles: Predicting the combination of effects — Interaction vs. non-interaction. **International Journal of Food Microbiology**, 128(1), 78-88, 2008.
- BRACKETT, R. E. Fruits, vegetables, and grains. **Food microbiology. Fundamentals and frontiers**. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press. p, 127-138, 2001.
- DENYER, S. P., BARRY HUGO, W., & HARDING, V. D. Synergy in preservative combinations. **International Journal of Pharmaceutics**, 25(3), 245-253, 1985.
- FERNÁNDEZ, A. G., FERNANDEZ-DIEZ, M., & ADAMS, M. R. **Table olives: production and processing**: Springer, 1997.
- FLEET, G. H. (2011). **Chapter 5 - Yeast Spoilage of Foods and Beverages**. In C. P. K. W. F. Boekhout (Ed.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 53-63). London: Elsevier.
- GRANATO, D., DE ARAÚJO CALADO, V. M., & JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, 55(0), 137-149, 2014.
- GUYNOT, M. E., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., & MARÍN, S. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). **International Journal of Food Microbiology**, 101(2), 161-168, 2005.
- HIRSHFIELD, I. N., TERZULLI, S., & O'BYRNE, C. (2003). Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. **Sci Prog**, 86, p.4, 245-269.

HUGBO, P. Additivity and synergism *in vitro* as displayed by mixtures of some commonly employed antibacterial preservatives. **Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 11(1), 17-20, 1976.

JARVIS, B. **Statistical aspects of the microbiological examination of foods**: Academic Press, 2008.

LAMBERT, R. J., & STRATFORD, M.. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **J Appl Microbiol**, 86(1), 157-164, 1999.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, 55(1), 181-186, 2000.

LEISTNER, L., & GORRIS, L. G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, 6(2), 41-46, 1995.

LÓPEZ-MALO, A., BARRETO-VALDIVIESO, J., PALOU, E., & MARTÍN, F. S. Aspergillus flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. **Food Control**, 18(11), 1358-1362, 2007.

LÓPEZ-MALO, A., MARIS ALZAMORA, S., & PALOU, E. Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**, 99(2), 119-128, 2005.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**: John Wiley & Sons, 2008.

PANAGOU, E. Z., KATSABOXAKIS, C. Z., & NYCHAS, G.-J. E. Heat resistance of Monascus ruber ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. **International Journal of Food Microbiology**, 76(1-2), 11-18, 2002.

PANAGOU, E. Z., SKANDAMIS, P. N., & NYCHAS, G. J. Use of gradient plates to study combined effects of temperature, pH, and NaCl concentration on growth of Monascus ruber van Tieghem, an Ascomycetes fungus isolated from green table olives. **Appl Environ Microbiol**, 71(1), 392-399, 2005.

RAZALI, N. M., & WAH, Y. B.. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, 2(1), 21-33, 2011.

ROJO, M. C., ARROYO LÓPEZ, F. N., LERENA, M. C., MERCADO, L., TORRES, A., & COMBINA, M. Evaluation of different chemical preservatives to control Zygosaccharomyces rouxii growth in high sugar culture media. **Food Control**, 50(0), 349-355, 2015.

STCHIGEL, A. M., CANO, J. F., ABDULLAH, S. K., & GUARRO, J. New and interesting species of Monascus from soil, with a key to the known species. **Studies in Mycology**, 50, 299-306, 2004

STRATFORD, M., STEELS, H., NEBE-VON-CARON, G., NOVODVORSKA, M., HAYER, K., & ARCHER, D. B. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast

Zygosaccharomyces bailii. **International Journal of Food Microbiology**, 166(1), 126-134, 2013.

SUHR, K. I., & NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, 95(1), 67-78, 2004.

UDAGAWA, S., & BABA, H. *Monascus r*, a new species isolated from mouldy feeds. **Cryptogamie, Mycologie**, 19(4), 269-276, 1998.

CAPÍTULO 4

HEAT RESISTANCE OF *MONASCUS RUBER* ASCOSPORES ISOLATED FROM STORAGE BRINE OF GREEN OLIVES OF ARAUCO CULTIVAR

Em preparação para Revista Food Control (A2)

ABSTRACT

Heat resistance in brine (pH=3,5 and 3,5 % NaCl) of *Monascus ruber* ascospores isolated from storage brine of Green olives of Arauco cultivar imported from Argentina was studied. Decimal reduction time (D-value) at 70°, 75° and 80 °C was calculated from the thermal death parameters obtained by using of Baranyi's primary predictive model. D value was 26.92, 5.72 and 1.57 minutes for 70°, 75° and 80 °C, respectively. A z value of 8.1 °C was calculated from Thermal Death Time (TDT) curve. It was concluded that the *Monascus ruber* had a moderate heat resistance and the minimal thermal processing required by current legislation is not sufficient to eliminate the fungus in Table olives. These results could assist the Table olives industry to develop an efficient thermal process to avoid the *Monascus ruber* contamination.

Keys word: *Monascus ruber*, Branyi's model, Table olives.

1 INTRODUCTION

Heat resistant molds are microorganism belonging to the class of Ascomycetes, which had as main characteristic the formation of ascospores (sexually formed spores throughout structures called asci) that are very resistant to heat processes. They are the main contaminants of canned and pasteurized fruit juices, resulting in economic losses and risks to consumer health (Brackett, 2001; Tournas, 1994).

Heat resistant fungi are among the most important microorganisms in deteriorating of processed fruits and vegetables. Species, such as: *Byssochlamys fulva*, *B. Nivea*, *Talaromyces Flavus* and *Neosartorya fischeri*, are often isolated and related to deterioration in different products (Beuchat, 1986; Kotzekidou, 1997; Salomão, Slongo, & Aragão, 2007; Sant'ana, Rosenthal, & Massaguer, 2009).

Monascus ruber belongs to the class of ascomycetes and is an important specie related to food deterioration. The soil is the principal contamination source and the specie is mainly related to post harvest contamination (Guarro, Gené, Stchigel, & Figueras, 2012). Their ascospores are able to develop in an environment with low oxygen tension, low pH and high salt concentrations. In table olives, deterioration results in fruit , increase in the pH and development of red mycelial mat on the surface of brines table green olives (Panagou, Katsaboxakis, & Nychas, 2002).

Table olives is the greater importance fermented vegetable product in the western world. *M. ruber* was recently isolated, for the first reported time, in storage brine of green olives of Arauco cultivar commercialized in Brazil and imported from Argentina. Brazil has a great importance in world market of olives, being the second largest importer of the fruit. In the 2012/2013 crop year, the country imported about 109 000 tones and 75 % of that amount are originated from Argentina (MDIC, 2014; IOOC, 2015).

According to the Trade Standards for Table Olives (COI, 2004), table olives can be conserved by heat process, like pasteurization or with addition of preservatives. The objective of this research was to determine the thermal resistance of *M. ruber* ascospores in brine of canned table olives without preservatives, based on Thermal Death Tubes (TDT) technique. The results could be used in Brazilian Table olives industry to develop an effective process to eliminate the fungus without the addition of preservatives.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Fungus and preparation of ascospore suspension

The fungus used in this research was isolated and identification by item 3.1 of chapter 2. Suspension of ascospores was prepared after growth for 30 days at 30 °C in Roux bottle containing 200 mL of unacidified PDA (Fluka, Sigma-Aldrich). The ascospores were harvested by addition of 10 mL of sterile distilled water containing 0.1 % Tween 80 and ascospores were obtained after scraping the growth surface with a sterile glass rod with a rounded tip. Then, the suspension was filtrated through sterile glass cotton and collected in sterilized glass, to remove the hyphal fragments. Ascospores suspension were homogenized in vortex for 3 min to open the cleistothecia and liberate the ascospores. Microscopic observation revealed a high proportion (> 90 %) of free ascospores. Suspension concentration was 10^6 ascospores/ml and measured with a Neubauer counting chamber, which was stored at 4 °C and served as inoculum for all experiments. Suspension of ascospores was stored at 4 °C throughout the experiments.

2.2 Determination of heat resistance of *Monascus ruber*.

Thermal resistance experiments were realized in brine, containing pH=3.5 and 3.5 % NaCl. This composition was used based on a study to be published elsewhere on the effect of hurdle technology on *Monascus ruber* growth in canned table green olives of Arauco cultivar, showing that such composition allowed the highest fungus development among 27 different combinations tested.

For heat resistance determination sterile Thermal Death Tubes (TDT; 8 mm external diameter, 6 mm internal diameter and 1 mm wall thickness) were filled with 1.8 mL of brine and 0.2 mL of ascospores suspension (Item 2.2) reaching a final concentration at 10^5 ascospores/mL. The TDT tubes were sealed with the aid of a Blowtorch (Gas Map), then the tubes were submerged in ultrathermostatically water bath (Quimis[®], model Q214M with ± 0.1 °C of precision) for predetermined times at 70, 75 and 80 °C. The heating time lag was previously measured in TDT tubes containing 2 mL of brine with the aid of copper/constantan thermocouple and added to the time applied for each heat treatment.

After each treatment, the TDT tubes were removed and immediately transferred to ice water for one minute. Then it were homogenized and opened aseptically. Serial dilutions were

prepared and the count of survives ascospores were performed in duplicate, by spread plating 0,1 mL of dilutions on non acidified PDA (Fluka, Sigma-Aldrich) and incubated at 30 °C for 5 days. The counts of average were expressed in colony-forming units (cuf) per mL and survival curve for each temperature was done by regression of $\log_{10}(\text{cuf mL}^{-1})$ against time.

2.3 Modelling of Thermal Inactivation Kinetics of *M. ruber* in brine

Since survivors curve shape did not present log-linear behavior the Baranyi's primary predictive model (J Baranyi, Roberts, & McClure, 1993; J. Baranyi & Roberts, 1994) was chosen to model the survival curve of *M.ruber* in brine. The programme DMFit version 2.0 (Institute of Food Research, Norwich, UK) was used to estimate four main parameters values by fitting experimental survival data to the model, i.e. y_0 (upper point of the sigmoid curve, corresponding to the initial ascospore count); y_{end} (lower point of the asymptote curve or tailing, representing the lower ascospore count); *Survival period (shoulder region)* and the death rate constant, represented as K ($\log_{10}\text{cfu mL}^{-1} \text{seg}^{-1}$). The *D-values* could be estimated from death rate constants (K) as $D_{value} = 1/K$, and z-value was calculated by the thermal death time (TDT) curve, which was constructed by regressing of \log_{10} (*D-value*) against corresponding temperatures. The D-value is the time required at a given temperature to reduce 1 \log_{10} cycle of microorganism population and z-value represents the temperature required for 1 \log_{10} reduction in the D-value.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Heat resistance of *Monascus ruber*

Figure 1 shows the survival curves calculated using Baranyi's model for *Monascus ruber* in brines (3.5 % NaCl and pH=3.5) at different temperatures (70°, 75° and 80 °C). All thermal inactivation curves of *Monascus ruber* ascospores presented a nonlog-linear behaviour, with the presence of an initial shoulder region followed by a linear decline phase and a final tailing region. The shoulder region can be seen more clearly at lower temperature. By increasing the applied temperature, the death rate fully approached to a log-linear decrease, for instance the heat inactivation at 80 °C did not show a shoulder region and the lag phase could not be estimated by the model. Likewise, the kinetic parameter of y_{end} for 80 °C was not calculated because the tailing region was not presented in the survival curve, which can be seen

in the graph. Other studies obtained similar behavior of survival curves for *Neosartorya Fischeri* ascospores (Rajashekhara, Suresh, & Ethiraj, 2000; Salomão, *et al.*, 2007), *Byssoschlamys Fulva* ascospores (Kotzekidou, 1997), *Byssoschlamys nivea* (Engel & Teuber, 1991), and *Hamigera avellanea* and *Thermoascus crustaceus* ascospores (Scaramuzza & Berni, 2014).

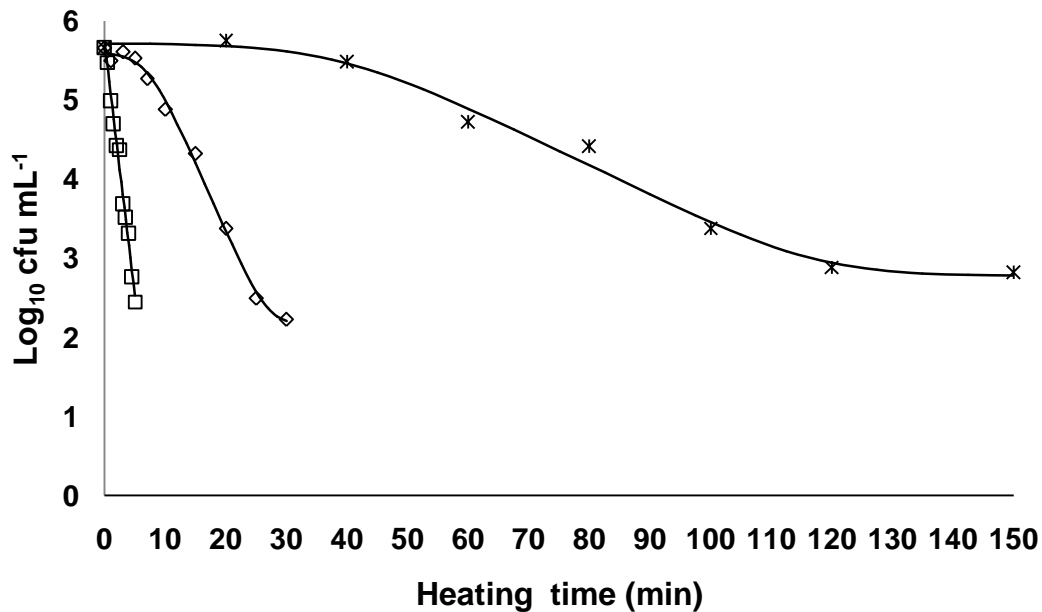


Figure 1. Survival curves of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3.5 and 3.5 % NaCl) at 70 °C (*), 75 °C (◇) and 80 °C (□)

Table 1 shows the outputs of kinetics parameters obtained by Baranyi's model for *M. ruber* in brine. It can be observed that Baranyi's model adjusted well the experimental data based on the small standard error (se(Fit.)) and high correlation coefficients (R^2). Low standard deviation (SD) was obtained, showing a good reproducibility of the data experiments.

From the parameters obtained by Baranyi's model it was possible to calculate the D-value for all temperature tested for *Monascus ruber* inactivation in brine, through from death rate constant (K) resulting from $D_{value} = 1/K$. As showed in table 1, the D-value for 70°, 75° and 80 °C were 26.92; 5.72 and 1.57 minutes, respectively. In preliminary experiment, ascospores of *Monascus ruber* did not survive at 85 °C for 30 seconds, and for this reason the D value at such temperature was not calculated.

These results are similar to D-values obtained by (Panagou, *et al.*, 2002). These authors reported about the heat resistance of *Monascus ruber* for the unique time so far, as far as we are

concerned, focusing on thermally processed green olives of Conservolea variety originated from Greece. The authors found D values for 70°, 75° and 80 °C in brine (pH=3.8 and 5.6 %NaCl) of about 49; 5 and 0,90 minutes, respectively. The difference in comparison to our research could be explained for different reasons like: difference in medium composition, another strain of mould and different technique to evaluate the heat resistance.

Table 1: Kinetics parameters resulting from Baranyi's model for heat resistance of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3.5 and 3.5 % NaCl) at 70°, 75° and 80 °C.

Temperature (°C)	Death rate constant (K)	Survival period (min)	D-value (min)	se(fit)	R ²	z-value (°C)	R ²
70	-0,0371 ± 0,00040	38,54 ± 10,05	26,92 ± 0,31	0,1615	0,9826		
75	-0,1747 ± 0,02864	7,10 ± 0,26	5,72 ± 1,12	0,0999	0,9943	8,10	0,9973
80	-0,6367 ± 0,12431	---	1,57 ± 0,31	0,1226	0,9867		

In relation to other studies, it can be observed that *Monascus ruber* had a moderate heat resistance when compared to other heat resistant moulds, as follows. Sant'ana, *et al.*, (2009) reported a δ (time of first decimal reduction) of 1,8 minutes at 95 °C for *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice; Ferreira, *et al.*, (2011) found a high heat resistances of *B. nivea* ascospores in commercial pineapple nectar of $D_{104\text{ }^{\circ}\text{C}}=0,9$ min and a $D_{107\text{ }^{\circ}\text{C}}$ of 0,6 min for *B. fulva* ascospores in commercial passion nectar; Beuchat, (1986) by evaluating the heat resistance of two strains of *Talaromyces flavus* ascospores found a $D_{91\text{ }^{\circ}\text{C}}$ ranged from 2,9 and 5,4 minutes in five different fruit juices; Salomão, *et al.*, (2007) reported a great heat resistance for *Neosartorya fischeri* ascospores in various juices, in pineapple juice (pH 3.4; 12 °Brix;) resulted a $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}=1,5$ min, whereas Slongo & DE ARAGÃO, (2007) obtained a $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}=3,43$ min in pineapple juice (pH 3,5; 12°Brix). More recently, Scaramuzza & Berni, (2014) evaluated the heat resistance of a *Hamigera avellanea* strain isolated from a spoiled semi-finished strawberry product and of a *Thermoascus crustaceus* from a spoiled sweetened beverage. They found a heat resistance for both moulds in three heats medium (Grape, apple juice and buffered glucose solution). *Thermoascus crustaceus* proved to be the most resistant in both original isolate media, like in apple juice by presenting a $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ of 1.82 min, while that *Hamigera avellanea* resulted in $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ of 0,68 min at the same temperature in that medium.

Figure 2, shows the thermal death time (TDT) curves used to calculate the z-value that was 8.1 °C. In general, the curve has a negative slope, showing that it exists a negative correlation between heat resistance and z-value, which evidences the reduction of ascospores heat resistance with the increase of temperature. This result shows that the fungus used in the present research suffers higher effect of temperatures elevation towards the decrease of resistance than the *Monascus ruber* isolated by Panagou, *et al.*, (2002), which presented z values in brine of 5,8 °C. According to Sant'ana, *et al.*, (2009) the efficiency of thermal processes to inactivate fungi spores are dependent on the z values of microorganisms, because small variations in temperature processes can minor affect the heat inactivation of fungus spores which have low z values. So, it's very important to control of temperatures of thermal process to prevent the survival of fungus and ensure microbiological safety of the product.

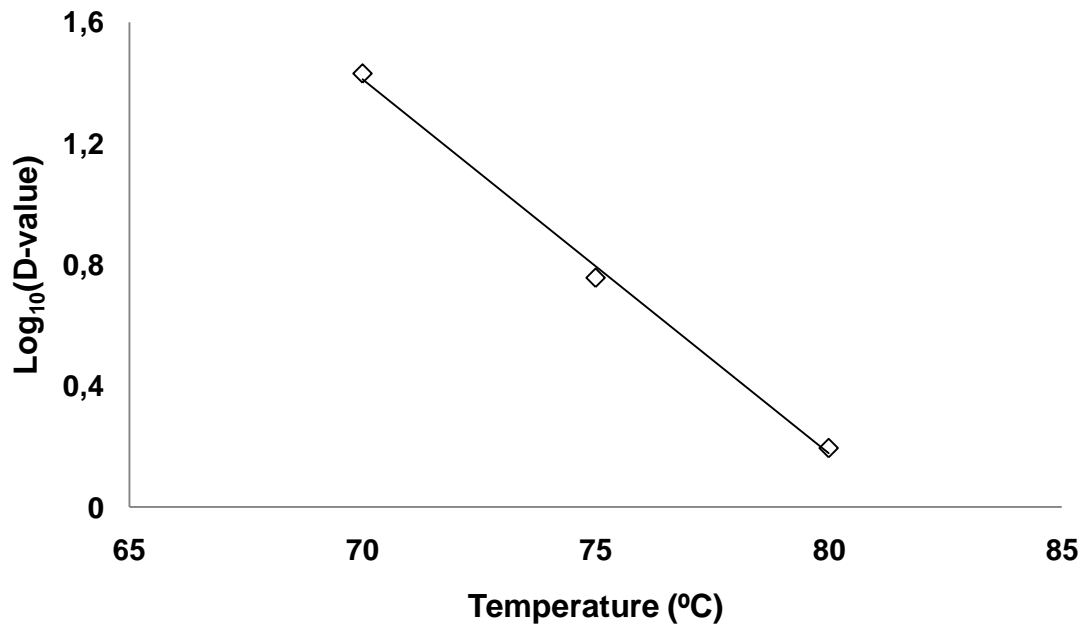


Figure 2. Thermal death time (TDT) curve of *Monascus ruber* ascospores in brine (pH=3,5 and 3,5 % NaCl)

Despite of moderate heat resistance, *M. ruber* ascospores are capable of withstands the heat treatment of table olives pasteurization. According to the COI (2004), pasteurization of table olives should reach at least 62.4 °C for 15 min ($F_{62.4\text{ °C}} = 15\text{ min}$) having as target microorganism the *Propionibacterium*. Table 2 shows the difference between the minimum treatment required by current legislation based on the equivalent of such microorganism ($F_{62.4\text{ °C}}=15\text{ min}$) and the at 70, 75 and 80 °C and the necessary treatment to inactivate 1 log cycle of *M. ruber*, based on the z and D values obtained by this work.

According to Table 2, it is observed that the minimal thermal processing required by the legislation is extremely low regarding the necessary to reduce one log cycle in microbial population. So, the thermal process of table olives is ineffective to eliminate the *M. ruber*, and their survival can result in relevant deterioration effects, such as softening the fruit, increase the pH to pathogen growth risky level and development of red mycelial mat on the brine surface of canned table green olives.

Table 2: Comparison between the minimum thermal treatment required according to legislation at 70, 75 and 80 °C and the necessary treatment to inactivate 1 log cycle of *Monascus ruber*,

Microrganism	Temperatures (°C)	Time (min) of Minimum treatment required by current legislation*	Necessary time (min) to reduction 1 log cycle
<i>Monascus ruber</i>	70	0.54	29.98
	75	0.06	5.75
	80	0.01	1.56

*equivalent resistance of *Propionibacterium*

4 CONCLUSION

Brazil has great importance across the world market, being the second major importer of olives. The knowledge of the thermal destruction kinetic (D and z values) of *Monascus ruber*, which was isolated during storage previously to the table olives elaboration

The current process and legislation requirement are not sufficient to eliminate the fungus at the required level based on the kinetics parameters. Its survival and growth can result in relevant deterioration effects, such as softening the fruit, increase the pH up to pathogen growth risky levels and development of red mycelial mat on the brine surface of canned table green. It is very important and necessary for Brazilian table olives industry to develop an effective process to avoid the fungus contamination in table olives without the addition of preservatives. The knowledge of the kinetic parameters can surely contribute to improve and adequate the processing procedure aiming to provide a product with adequate safety and quality requirement.

5 REFERENCES

- BARANYI, J., ROBERTS, T., & MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**, 10(1), 43-59, 1993.
- BARANYI, J., & ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **Int J Food Microbiol**, 23(3-4), 277-294, 1994
- BEUCHAT, L. R. Extraordinary Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* Ascospores in Fruit Products. **Journal of Food Science**, 51(6), 1506-1510, 1986.
- BRACKETT, R. E. (2001). Fruits, vegetables, and grains. **Food microbiology. Fundamentals and frontiers**. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press. p, 127-138.
- ENGEL, G., & TEUBER, M. (1991). Heat resistance of ascospores of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **Int J Food Microbiol**, 12(2-3), 225-233.
- FERREIRA, E. H. D. R., MASSON, L. M. P., ROSENTHAL, A., SOUZA, M. D. L., TASHIMA, L., & MASSAGUER, P. R. D. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados asépticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14, 164-171, 2011.
- GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A., & FIGUERAS, M. **Atlas of soil ascomycetes**: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2012.
- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, 62(2), 410-412, 1997.
- PANAGO, E. Z., KATSABOXAKIS, C. Z., & NYCHAS, G.-J. E. Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. **International Journal of Food Microbiology**, 76(1-2), 11-18, 2002.
- RAJASHEKHARA, E., SURESH, E., & ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, 17(3), 269-275, 2000.
- SALOMÃO, B. C. M., SLOGO, A. P., & ARAGÃO, G. M. F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **LWT - Food Science and Technology**, 40(4), 676-680, 2007.
- SANT'ANA, A. S., ROSENTHAL, A., & MASSAGUER, P. R. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. **J Appl Microbiol**, 107(1), 197-209, 2009.
- SCARAMUZZA, N., & BERNI, E. Heat-resistance of *Hamigera avellanea* and *Thermoascus crustaceus* isolated from pasteurized acid products. **International Journal of Food Microbiology**, 168-169(0), 63-68, 2014.

SLONGO, A. P., & DE ARAGÃO, G. M. F. Avaliação da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* E de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 25(2), 2007.

TOURNAS, V. Heat-Resistant Fungi of Importance to the Food and Beverage Industry. **Critical Reviews in Microbiology**, 20(4), 243-263, 1994.

CONCLUSÃO FINAL

Apesar de não possuir produção significativa de azeitonas, o Brasil apresenta grande importância no cenário mundial de azeitona, principalmente em relação às importações realizadas. Em virtude de sua importância comercial e do desconhecimento das características e processos de elaboração de azeitona de mesa. Para suprir tal ausência de informações, foi realizado um levantamento acerca da importância do país frente ao mercado mundial e uma abordagem detalhada sobre as principais tecnologias e os métodos de conservação relacionados à elaboração de azeitonas de mesa.

O fungo foi isolado, pela primeira vez, durante a estocagem de azeitonas verdes deterioradas do tipo Arauco importadas da Argentina sendo identificado a partir das características micro e macroscópicas de suas estruturas. A identificação resultou no fungo filamentosso *Monascus ruber* da classe dos ascomicetos. Observou-se que a deterioração causada pela contaminação do fungo em salmoura de azeitonas, ocasiona amolecimento do fruto, o desenvolvimento micelial de coloração avermelhada na superfície salmoura e aumento no pH, resultando em um perigo a segurança microbiológica do produto.

O conhecimento das tecnologias combinadas empregadas (NaCl; benzoato de sódio; sorbato de potássio e temperatura) com os níveis apropriados de obstáculo em combinação pode contribuir para conceber e controlar o processo de modo a assegurar produtos de segurança e qualidade para a segurança das demandas do mercado consumidor. Observou-se que fungo apresentou tolerância ao sal, crescendo na concentração de 5,5% NaCl, a temperatura também não foi capaz de inibir seu crescimento, apresentando cresce ótimo à temperatura de 30 °C. Em relação aos conservantes, o sorbato de potássio apresentou maior eficácia ao benzoato de sódio. Verificou-se que o uso de sorbato a uma concentração em torno de 0,03% apresentou efeito fungicida diferentemente do benzoato de sódio, que apresentou efeito fungistático em todo nível testado. Porém o uso isolado ou combinado entre ambos impediu o desenvolvimento das deteriorações relacionadas à contaminação pelo fungo. Portanto, independentemente da forma utilizada (isolado ou combinado), o uso de conservantes (sorbato ou benzoato) inibe o desenvolvimento da deterioração causada pelo fungo.

A partir dos parâmetros cinéticos de destruição (valor de D e z) obtidos após o tratamento térmico aplicado sobre os ascósporos do *Monascus ruber*, pode-se verificar, que o binômio tempo x temperatura estabelecidos pela legislação para o processo de pasteurização, não é capaz de eliminar a presença e a deterioração causada do *Monascus ruber*. Os valores

obtidos foram $D_{70\text{ }^{\circ}\text{C}}=26,92$, $D_{75\text{ }^{\circ}\text{C}}=5,72$ e $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}=1,57$ minutos apresentando valor de z referente à $8,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Portanto, torna-se importante e extremamente necessário, o conhecimento dos métodos de conservação e seus efeitos na eliminação do *Monascus ruber*. Os resultados obtidos neste presente estudo poderão auxiliar a indústria de conserva de azeitonas de mesa a desenvolver processos mais eficazes visando eliminar e/ou evitar a contaminação de *Monascus ruber* no produto final, garantindo a segurança microbiológica e a elaboração de conservas de azeitonas de mesa de qualidade.