

MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS, LIPOLÍTICOS, LEVEDURAS E FUNGOS EM
MANTEIGAS ELABORADAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Microorganisms Proteolitics, Lipolitics, Yeasts and Moulds Produced
in Rio Grande do Sul State

Marco Antonio R. de Brum*

RESUMO

O autor efetuou avaliações de microrganismos proteolíticos, lipolíticos, leveduras e fungos em amostras de manteigas elaboradas no Estado do Rio Grande do Sul, observando as seguintes contagens para os grupos citados: 57.294/ml, 44.173/ml, 274.113/ml respectivamente.

SUMMARY

The proteolitics and lipolitics microorganisms, yeasts and moulds were evaluated in samples of butter produced in Rio Grande do Sul State showing the average counts: 57.294/ml, 44.173/ml and 274.113/ml respectively.

INTRODUÇÃO

As técnicas de avaliação da qualidade microbiológica da manteiga, diferem daquelas que são utilizadas convencionalmente para a verificação das condições sanitárias e qualidade dos demais produtos lácteos. Tal fato deve-se a utilização de culturas puras "aromatizantes e acidificantes", adicionadas ao creme na fase de maturação (12).

A adição destes cultivos selecionados influem consideravelmente no conteúdo total de germes da manteiga, determinando, então a inviabilidade dos procedimentos de rotina para avaliações em manteigas elaboradas a partir de cremes maturados.

A flora da manteiga após a embalagem, está na dependência de uma série de contaminações que podem ocorrer durante o processamento tecnológico, que, em virtude de procedimentos inadequados, podem somar-se à sua flora normal.

* Professor Assistente do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. e Bolsista do CNPq.

Em laticínios, de um modo geral, destacam-se como principais contaminantes e possíveis causadores de alterações os seguintes grupos: mesófilos, termófilos, psicrotróficos, psicrófilos, termodúricos, lácticos, proteolíticos, lipolíticos, produtores de gás e patogênicos (11). Já na manteiga, produto que, durante a elaboração, passa por várias fases onde podem ocorrer contaminações, principalmente quando da lavagem e correção do teor de umidade, a água pode ser a principal responsável pelo acréscimo de flora indesejável quando não convenientemente tratada (12).

A flora veiculada pela água, se caracteriza, quase sempre, pela presença de bactérias pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus* e *Bacillus*, destacando-se espécies putrefativas do gênero *Proteus* e a espécie *Pseudomonas putrefaciens* (29).

Com relação a presença de outros microrganismos, o grupo dos fungos e leveduras pode ser citado como de grande importância, pois, tais contaminantes, na maior parte das vezes, a sua presença parece estar condicionada ao tempo e local onde permanece a manteiga após a operação de malaxagem, estágio de fabrico, talvez ainda responsável pela não fixação de padrões para este grupo, que na maior parte das vezes está representado pelos gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Sacharomyces* e *Torula* (4).

O estabelecimento de padrões microbiológicos para a manteiga e outros derivados, tem sido estudado por vários especialistas no assunto, tendo como principal objetivo a observações dos seguintes aspectos: estética, composição, saúde e economia (10, 23).

Os trabalhos até então desenvolvidos tem como finalidade primordial estabelecer resultados comparáveis, embora dentro de cada país ou grupo de países, surjam dificuldades relacionadas com o clima, hábitos e grau de desenvolvimento. Considerando as intenções da F.A.O., O.M.S. e da Comissão do Codex Alimentarius, os padrões ou normas devem ser em primeira lugar aplicáveis para os alimentos de maior consumo.

A manteiga é um dos derivados do leite que pode ser considerado neste grupo e devido a este fato, tem sido sugerido normas microbiológicas para o controle de sua qualidade. Em se tratando de manteigas elaboradas a partir de cremes pasteurizados, em trabalho recente a Escola Superior de Medicina Veterinária de Lisboa fez a seguinte proposição: Fungos e Leveduras $10^2/g$, microrganismos lipolíticos $10^2 \times 2/g$, proteolíticos 50/g, coliformes negativos e $1/g$, *Staphylococcus* negativo em 2 gramas e *Salmonella* negativo em 25 gramas (16).

Os estudos bacteriológicos relacionados com a manteiga, já remontam quase um século, STORCH realizou os primeiros ensaios em

1884 e introduziu a utilização de culturas lácticas em 1888. Dez anos depois, quase a totalidade das indústrias já usavam fermentos lácticos.

No Brasil as primeiras experiências com culturas lácticas selecionadas datam de 1908, (6) daí em diante várias foram as pesquisas relacionadas com a tecnologia e microbiologia da manteiga (9, 17, 18, 19, 20, 21), culminando em 1953 com a sugestão de padrões provisórios para levedos, bolores e coliformes (5).

Atualmente a rotina industrial ainda carece de dados para estabelecer o controle de qualidade dos produtos, ocorrendo então, por vezes, uma discreta diferença de produtos rotulados com a mesma característica.

O presente trabalho, objetivando a busca de subsídios para o estabelecimento de futuros padrões microbiológicos para a manteiga, atem-se em quantificar os microrganismos lipolíticos, proteolíticos, fungos e leveduras, com a finalidade de observar aspectos atuais do produto elaborado no Estado do Rio Grande do Sul, e assim apresentar sugestões que possibilitem a obtenção de produtos que possuam características semelhantes e possam ser controladas através de padrões de qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem constou de cinquenta pães de manteigas de diferentes procedências, adquiridas no comércio de Santa Maria, RS e conduzidas até o laboratório de análises em frascos previamente esterilizados acondicionados em "isopor" contendo gelo picado.

O preparo da amostra, constou do aquecimento do frasco de coleta com a respectiva aliquota de amostra em banho-maria Fanem, Modelo 102/N, à temperatura de 40°C (3) até a completa fusão.

A Metodologia utilizada para as avaliações microbiológicas foi preconizada por DEMETER (4), utilizando-se o seguinte procedimento:

Preparo das Diluições - Após a conveniente homogeneização das amostras, foram preparadas as diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em solução fisiológica peptonada aquecida à temperatura de 40°C em banho-maria Fanem Modelo 102/N e homogeneizadas em agitador Vortex-Genie, Modelo K-550-GE.

Semeadura - A técnica utilizada para a semeadura foi em massa, sendo observada a temperatura de 45°C para os meios de cultura, com a finalidade de obter-se a perfeita mistura dos mesmos com o inóculo nas placas de Petri.

Meios de cultura e diluições utilizadas - A contagem de proteolíticos foi realizada em ágar leite 1% (4), inoculando-se em massa

1 ml das diluições (10^{-2} e 10^{-3}). Para avaliação de lipolíticos foi utilizado o meio de ágar tributirina (2) semeando-se também em massa 1 ml da diluição (10^{-2} e 10^{-3}).

A avaliação de leveduras e fungos foi realizada em ágar-batata previamente acidificado com ácido tartárico 10% (1), semeando-se 1 ml da diluição 10^{-3} também em massa.

A incubação das placas para contagem de lipolíticos e proteolíticos foi realizada a 35°C em estufa Biomatic, Modelo 1342, pelo tempo de incubação para leveduras e fungos foram, respectivamente, 25°C e 72 horas.

Para contagem, como também para a identificação de ação lipolítica e proteolítica das colônias, foi utilizado contador de QUEBEC Modelo 3330 e estereomicroscópio AUs Gena Modelo SM XX.

RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

A Tabela 1 expõe os resultados obtidos para percentuais e médias de incidência de microrganismos proteolíticos. Estes resultados identificam uma variação considerável de microrganismos proteolíticos, ocorrendo um percentual de 44,44% com contagens de 10^4 A < $10^4 \times 5$, 26,66% das aliquotas com $10^4 \times 5 < 10^5$ e 13,33% com contagens de $10^5 < 10^5 \times 2$, sendo que 15,55% (restante das amostras) apresentam completa coalecência de colônias.

A média das amostras analisadas, conforme Tabela 4, foi de 57,294 microrganismos por mililitro de amostra, ocorrendo oscilações consideráveis nas contagens efetuadas para as diferentes amostras, conforme consta na Tabela 1 onde observa-se médias de 31.260 ml a 116.160 microrganismos por mililitro.

No que tange a microrganismos lipolíticos a Tabela 2 demonstra os resultados obtidos, onde também ocorreram oscilações consideráveis sendo que 4,44% das aliquotas apresentaram contagens de $10^3 < 10^4$, 40% com $10^4 < 10^4 \times 5$, 28,88% com valores de $10^4 \times 5$ A < 10^5 e 11,11 com contagens de 10^5 A < $10^5 \times 2$, tendo os 15,55% (restante das amostras) também apresentado coalecência de colônias, impossibilitando as contagens.

As médias para este grupo oscilaram entre 4.000 e 123.600 microrganismos lipolíticos por mililitro de amostra, sendo a média do total analisado de 44.173 por mililitro, conforme Tabela 4.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para percentuais e médias de incidência de leveduras e fungos, os quais também não fugiram aos parâmetros anteriormente analisados, apresentando oscilações consideráveis para as contagens efetuadas, sendo 4,4% com contagens de $10^3 < 10^4$, 20% com 10^4 A < $10^4 \times 5$, 20% com $10^4 \times 5$ A < 10^5 , 15,55%

Tabela 1. Percentuais e médias da incidência de microrganismos proteolíticos.

| | NÚMERO DE MICRORGANISMOS PROTEOLÍTICOS POR MILILITRO | | | | |
|------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| | ($10^3 < 10^4$) | ($10^4 < 10^5 \times 5$) | ($10^5 \times 5 < 10^5$) | ($10^5 < 10^5 \times 2$) | Coalecência de Col. |
| Percentual de amostras | - | 44,44 | 26,66 | 13,33 | 15,55 |
| Médias | - | 31.260 | 71.250 | 116.160 | - |

Tabela 2. Percentuais e médias da incidência de microrganismos lipolíticos.

| | NÚMERO DE MICRORGANISMOS LIPOLÍTICOS POR MILILITRO | | | | |
|------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| | ($10^3 < 10^4$) | ($10^4 < 10^4 \times 5$) | ($10^4 \times 5 < 10^5$) | ($10^5 < 10^5 \times 2$) | Coalecência de Col. |
| Percentual de amostras | 4,44 | 40,00 | 28,88 | 11,11 | 15,55 |
| Médias | 4.000 | 34.330 | 71.461 | 123.600 | - |

Tabela 3. Percentuais e médias da incidência de levedura e fungos.

| | NÚMERO DE COLÔNIAS DE LEVEDURAS E FUNGOS POR MILILITRO | | | | | |
|------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| | ($10^3 < 10^4$) | ($10^4 < 10^4 \times 5$) | ($10^4 \times 5 < 10^5$) | ($10^5 < 10^5 \times 2$) | ($10^5 \times 2 < 10^5 \times 5$) | ($10^5 \times 5 < 10^6$) |
| Percentual de amostras | 4,44 | 20 | 20 | 15,55 | 13,33 | 26,66 |
| Médias | 6.250 | 29.200 | 67.311 | 155.285 | 382.166 | 672.833 |

Tabela 4. Médias para os diferentes grupos de microrganismos por mililitro de amostra.

| MICROORGANISMOS | MÉDIAS |
|--------------------|---------|
| Proteolíticos | 57.294 |
| Lipolíticos | 44.173 |
| Leveduras e Fungos | 274.113 |

com variações de $10^5 < 10^5 \times 2$, sendo que os 39,99% das amostras restantes apresentaram as contagens mais elevadas oscilando entre $10^5 \times 2$ e $< 10^6$.

A média total de amostras analisadas, conforme Tabela 4, foi 274,113 colônias de leveduras e fungos por mililitro de amostra.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para proteolíticos e lipolíticos podem ser comparados com aqueles observados em outros trabalhos, embora nos mesmos ocorreram variações consideráveis para os grupos de microrganismos lipolíticos e proteolíticos, germe estes muitas vezes responsáveis por alterações no produto durante a conservação (7, 8, 14, 28), sendo também, além da manteiga, encontrados em contagens consideráveis no leite (15, 25).

Das espécies citadas pela literatura, o gênero mais constante parece ser o *Pseudomonas*, vinculado pela água (13, 26), principal fonte de contaminação quando não tratada convenientemente, antes da adição para correção do teor hídrico e na operação de lavagem da manteiga bruta.

No que tange ao grupo de leveduras e fungos, os resultados obtidos identificaram oscilações consideráveis, não verificando-se possibilidades de comparação com as citações da bibliográfica compilada (27, 22, 24), podendo-se, entretanto, concordar com as afirmações de que a presença de fungos e leveduras é sempre prejudicial. Quando aparecem em contagens elevadas, além de determinar muitas vezes defeitos no produto, também caracterizam a higiene precária do estabelecimento industrial.

Como medida para sanear em parte o problema e possivelmente enquadrar o produto em futuros padrões a serem estabelecidos, são convenientes as seguintes medidas:

- Controle semanal das culturas acidificantes e aromatizantes utilizadas na maturação do creme.
- Conservação dos cremes a temperaturas reduzidas.
- Pasteurização adequada dos cremes
- Utilização de água clorada para correção do teor hídrico do produto bem como para lavagem da manteiga bruta.
- Armazenamento em condições adequadas para embalagem do produto.
- Controle semanal de proteolíticos, lipolíticos e contagem total de germes na água industrial.
- Controle microbiológico do corante e cloreto de sódio utilizado na manteiga.
- Higienização adequada do equipamento destinado ao fabrico da manteiga.
- Utilização de luvas para o manuseio do produto.
- Higiene do pessoal que manuseia com o produto acabado e durante o fabrico.

CONCLUSÕES

Em face dos resultados obtidos podemos concluir que a amostra gem analisada de diversas manteigas produzidas no Estado do Rio Grande do Sul, apresenta contagens elevadas para microrganismos proteolíticos, lipolíticos, leveduras e fungos, demonstrando, possivelmente, a não observância de fatores que acarretam o aumento destes microrganismos.

LITERATURA CITADA

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - *Standard methods for the examination of dairy products*. *AJPH Year Book*, 1967, 121p.
2. ANDERSON, J.A. - An agar plate method for the detection and enumeration of lipolytic microorganisms. *J.Bact.*, (27): 69, 1934.
3. BRUM, A.M. - Pesquisa dos agentes microbiológicos que mais frequentemente determinam alterações na manteiga durante a conservação. *Revista Centro Ciências Rurais*, 1(4):87-100, 1971.
4. DEMETER, J.K. - Microbiologie der butter. *J.Bact.*, 1:141-146, 1956.
5. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO - *Produção Animal. Padrões Microbiológicos Provisórios para Exame de rotina das manteigas*. 1953. 20p.

6. DERTHET, J.J.A. - Instruções práticas para fabricação do queijo "Tipo Paulista". *Rev. Ind. Animal*, 1(4):418-427, 1930.
7. LACROSSE, R. - Caractères caséolytique ou lipolytique des bactéries psychrophiles isolées, dans les laits ou les crèmes conservées à basse température. *Le Lait*, 21(5):473-474, 1969.
8. MACY, O. - *Lactobacteriologia*. España, Zaragoza Editorial Acribia, 1969. 251p.
9. MADSEN, F. - A Pesquisa do grupo coliforme como contribuição ao controle sanitário na fabricação de manteiga. Tese E.S. Vet., Belo Horizonte, 1957.
10. MOSSEL, D.A.A. - Microbiological quality control in the food industry. *J. Milk and Food Technology*, 32:155-171, 1969.
11. OLIVEIRA, S.J. - Qualidade Microbiologica do leite. *Rev. ILCT*, 31(186):15-20, 1976.
12. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD - Normas para el examen de los productos lacteos, Washington, Oficina Sanitaria Panamericana, 1963. 540p.
13. RAMMELL, C.G. & HOWICK, S.M. - Isolation of *Pseudomonas putrefaciens* from water and butter. *The Dairy Technology*, 2(1):2-4, 1967.
14. RASIC, I.; MILIRE, S. & IHIC, D. - Study of keeping quality of butter from dairies in Voivodina. *Dairy Science Abstracts*, 17(10):222-226, 1967.
15. REINHOLD, G.N. - Bacteriological testing of raw milk and dairy products. *J. Milk y Food Technology*, 34(12):612-619, 1971.
16. RIBEIRO, R.M.A. - Padrões microbiológicos para alimentos portugueses. *Rev. Microbiologia*, 5(1):17-25, 1974.
17. ROGICK, F.A. - Flora coliforme das manteigas de consumo. *Bol. Ind. Animal*, 5(1-2):35-38, 1942.
18. ROGICK, F.A. & DIAS, A.S. - Pesquisas sobre manteigas em São Paulo e sua conservação em frigorífico. I, II, III, IV e V. *Bol. Ind. Animal*, 17:141-206, 1959.
19. ROGICK, F.A. & DIAS, A.S. - Tecnologia e controle sanitário de manteigas fabricadas e consumidas no Estado de São Paulo. *Bol. Ind. Animal*, 19:119-126, 1961.
20. ROGICK, F.A. - Investigações sobre a conservação da manteiga em Frigorífico. *Bol. Ind. Animal*, 19:127-134, 1961.
21. ROGICK, F.A. - Pesquisas sobre a tecnologia da manteiga. *Bol. Ind. Animal*, 19:137-151, 1961.

22. SANDOVAL, A.L.; PAULO, S.M. & KILLNER, M. - Estudo tecnológico e microbiológico de manteigas consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. ILCT*, 156-157:1-10, 1971.
23. SANTIAGO, O. - Controle microbiológico de qualidade. *Rev. ILCT*, 165:26-29, 1972.
24. SOUTO, A.B. & MARTINS, H. - Investigações microbiológicas sobre manteigas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 6(1):5-11, 1946.
25. THOMAZ, S.B. - Origine, présence et importance des bactéries psychrophilles dans le lait. *Milchwissens Chag.*, 21(5): 270, 1964.
26. THORNE, H. & ANDRENT, T. - *Pseudomonas aeruginosa* in market milk. *Dairy Science Abstracts*, 22:680-681, 1964.
27. VENTURA, J.A. - Counts of moulds and yeasts in butter. *Ind. Lechera*, 48(566):203-219, 1966.
28. YANKOV, Y. - Higiene and its importance in butter. *Izv. Manchnoizslid.*, 2:151-158, 1967.
29. ZARETT, D. - Microbiologie der butter. *J. Bact.*, 57:266, 1949.