

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				
	($10^3 < 10^4$)	($10^4 < 10^5 \times 5$)	($10^5 \times 5 < 10^5$)	($10^5 < 10^5 \times 2$)	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					
	($10^3 < 10^4$)	($10^4 < 10^5 \times 5$)	($10^5 \times 5 < 10^5$)	($10^5 < 10^5 \times 2$)	($10^5 \times 2 < 10^5 \times 5$)	($10^5 \times 5 < 10^6$)
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 lipolitic 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.