



# Estudo Microbiológico do Tempo de Conservação a Frio de Leite Cru de Ovelha

Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

Ana Sofia Bentes Roque

## Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Doutora Cristina José Miguel Pintado

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Cristina José Miguel Pintado da Associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco.

Novembro 2018



## Agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com o apoio de várias pessoas, deste modo quero agradecer em primeiro lugar por toda a amabilidade, boa disposição, partilha de conhecimentos, incentivo e principalmente por toda a ajuda prestada e disponibilidade, às minhas orientadoras Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado e Doutora Cristina José Miguel Pintado.

À Associação Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar (CATAA), que me recebeu para concretização deste estágio no âmbito do projeto Inovação Aberta e Inteligente na Euroace – INNOACE, co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, através do Programa Interreg V-A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020.

Quero dar um especial agradecimento à Mestre Manuela Goulão, técnica superior do Laboratório de Microbiologia da ESA e à Mestre Ana Lúcia Silveira do Laboratório de Microbiologia do CATAA pelo apoio, incentivo e carinho que me deram em toda a parte prática deste trabalho.

Às Engenheiras Helena Martins, Conceição Amaro e Telma pela amizade e ajuda sempre que necessário nas tarefas de laboratório.

A todos os funcionários da ESA, bem como ao Senhor Diretor Professor Doutor Celestino de Almeida e à Doutora Elisa pela informação fornecida e incentivo.

Quero agradecer à minha irmã, ao meu namorado e à minha amiga Inês por me proporcionarem momentos de descontração e acompanhamento em situações mais difíceis, bem como todo o carinho, paciência e ânimo que me deram ao longo desta fase.

Quero agradecer ao meu irmão, ao meu pai e à minha avó pela ajuda, paciência, compreensão, sacrifícios e conselhos que me deram e transmitiram nesta etapa importante da minha vida e também ao meu tio e padrinhos que mesmo distantes, mostraram-se sempre presentes.

A toda a minha família e amigos que não referi aqui, mas que contribuíram positivamente, manifesto a minha gratidão.

Por fim, quero agradecer à minha mãe e ao meu avô, a quem dedico este trabalho, por olharem por mim onde quer que estejam.



## Resumo

Na nossa região, Beira Baixa, o leite cru é muito utilizado para o fabrico de queijo, o que torna importante conhecer os fatores que podem influenciar a sua qualidade. A refrigeração é um desses fatores, permitindo reduzir a multiplicação de microrganismos naturalmente presentes no leite, contudo um período prolongado de conservação do leite cru a baixas temperaturas compromete a qualidade desta matéria-prima. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito que a refrigeração provoca no leite cru de ovelha ao longo de quatro dias, ao nível de diferentes grupos de microrganismos.

Foram recolhidas quatro amostras de leite cru de ovelha de dois produtores diferentes (A e B), situados na vila de Alcains, distrito de Castelo Branco. As amostras foram recolhidas em datas diferentes, entre maio e outubro de 2018. As análises microbiológicas incidiram sobre a contagem de mesófilos aeróbios, de psicotróficos, de bolores e leveduras, de bactérias lácticas mesófilas e de lactococos mesófilos. Estas análises foram realizadas no dia da recolha do leite e ao fim de um, dois e quatro dias de conservação no frio. Foi igualmente efetuada uma seleção, purificação e caracterização de 151 isolados de bactérias lácticas e lactococos presentes nas amostras, dos quais foram identificados pelo método API 50 CHL 8 estirpes isoladas (4 provenientes de MRS e 4 provenientes de M17). Foi ainda realizado o teste do escurecimento para 50 fungos (48 leveduras e 2 bolores), baseado na observação da produção de pigmentos em placas de Agar - Queijo com e sem tirosina, onde apenas 5 fungos foram promotores de escurecimento.

Os resultados obtidos para o leite no dia da recolha permitem constatar que o grupo predominante são os mesófilos ( $5,4 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ), seguido dos lactococos ( $5,1 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ), bactérias lácticas ( $4,8 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ), psicotróficos ( $4,4 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ) e bolores e leveduras ( $3,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ). Verificou-se um aumento da carga microbiana ao longo do período de refrigeração, em particular para os mesófilos ( $6,8 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ) e os psicotróficos ( $6,6 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ), os quais são considerados microrganismos indicadores de qualidade. No caso particular dos mesófilos verificou-se que o leite do produtor A ultrapassou o critério microbiológico legal ao fim de 1 dia de refrigeração e o leite do produtor B ao fim de dois dias, desaconselhando a sua utilização para a produção de queijo. No que toca aos psicotróficos é de referir que um número elevado destes microrganismos ( $\geq 6 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ), como se verificou para os leites de ambos os produtores, compromete a qualidade do queijo laborado ao nível das suas características sensoriais (textura, cor), o que deprecia a imagem e o valor económico deste produto.

**Palavras chave:** Refrigeração; Mesófilos; Psicotróficos; Bactérias lácticas; Bolores e leveduras.



## Abstract

Given that today raw milk is widely used for the manufacture of cheese, it becomes important to know the factors that can influence its quality. Refrigeration is one of the factors to consider, which reduces the multiplication of naturally occurring microorganisms, which allows reducing the multiplication of naturally occurring microorganisms, however a prolonged period of conservation of raw milk at low temperatures impairs the quality of this raw material. The objective of the present study was to study the effect of refrigeration on sheep raw milk over four days at the level of different groups of microorganisms (indicators of quality and technological interest in the manufacture of cheese).

Four samples of raw milk of sheep were collected from two different producers (A and B), situated in the town of Alcains, district of Castelo Branco. The samples were collected in different dates, between May and October of 2018.

For each sample, duplicates were always prepared. The microbiological analyzes focused on the count of aerobic mesophiles, psychrotrophs, molds and yeasts, mesophilic lactic bacteria and mesophilic lactococci. These analyzes were performed on the sampling day and after one, two and four days of cold storage. A set of 151 isolates of lactic acid bacteria from milk samples was selected, purified and characterized and eight isolates (four from MRS Agar and four from M17 Agar) were identified by the method API 50 CHL. The browning test was still performed for 50 fungi isolates (48 yeasts and 2 molds), based on the observation of the production of pigments in Cheese Agar with and without tyrosine.

The results obtained for the milk on the sampling day of collection show that the predominant group are mesophiles ( $5.4 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ), followed by lactococci ( $5.1 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ), lactic acid bacteria ( $4.8 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ), psychrotrophs ( $4.4 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ) and molds and yeasts ( $3.5 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ). There was an increase in microbial load throughout the refrigeration period, in particular for mesophiles ( $6.8 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ) and the psychrotrophic ones ( $6.6 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ), which are considered quality indicators microorganisms. In the particular case of mesophiles it was found that producer A's milk exceeded the legal microbiological criterion after one day of refrigeration and producer B's milk after two days, discouraging its use for the production of cheese. As regards psychrotrophs, it is worth mentioning that a high number of these microorganisms ( $\geq 6 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$ ), as was observed for the milks of both producers, will compromise the quality of the processed cheese in terms of its sensory characteristics (texture, color), which depreciates the image and economic value of this product.

## Keywords

Refrigeration; Mesophiles; Psychrotrophic; Lactic acid bacteria; Molds and yeasts.



# Índice geral

Índice de figuras .....	XI
Índice de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XV
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>2</b>
2.1. Leite cru de ovelha .....	2
2.2. Refrigeração.....	3
2.3. Microrganismos mesófilos .....	5
2.4. Microrganismos psicrotóxicos .....	6
2.5. Bolores e leveduras.....	7
2.6. Bactérias lácticas.....	8
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>9</b>
3.1. Recolha do leite .....	9
3.2. Refrigeração do leite.....	9
3.3. Qualidade microbiológica do leite.....	10
3.4. Identificação de isolados.....	11
3.4.1. Seleção de colónias.....	11
3.4.2. Isolamento e caracterização.....	12
3.4.3. Identificação bioquímica.....	12
3.5. Teste do escurecimento em Agar-Queijo com e sem tirosina .....	14
3.6. Tratamento estatístico.....	14
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>14</b>
4.1. Temperatura do leite na recolha da amostra.....	14
4.2. Qualidade microbiológica do leite ao longo do período de refrigeração .....	15
4.3. Identificação da microbiota do leite cru de ovelha.....	21
4.4. Teste do escurecimento .....	23
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>26</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>30</b>
Anexo I. Caracterização morfológica macro e microscópica de colónias isoladas provenientes de M17.....	30

Anexo II. Caracterização morfológica macro e microscópica de colónias isoladas provenientes de MRS.....	31
Anexo III – Tabelas de identificação pelo método API 50 CHL Medium.....	32

## Índice de figuras

Figura 1. Recolha de leite nos produtores A (direita) e B (esquerda).....	9
Figura 2. Distribuição da amostra por oito recipientes. ....	10
Figura 3. Preparação da suspensão inicial. ....	10
Figura 4. Preparação das diluições decimais sucessivas. ....	10
Figura 5. Técnica de isolamento por esgotamento com quatro estrias. ....	12
Figura 6. Teste API 50 CHL utilizado para identificação de estirpes de bactérias lácticas.....	13
Figura 7. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de mesófilos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor A) .....	17
Figura 8. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de mesófilos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor B) .....	17
Figura 9. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de psicotróficos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor A) .....	18
Figura 10. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de psicotróficos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor B) .....	18
Figura 11. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de bolores e leveduras em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor A) .....	19
Figura 12. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de bolores e leveduras em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor B) .....	19
Figura 13. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de bactérias lácticas em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor A) .....	20
Figura 14. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de bactérias lácticas em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor B) .....	20
Figura 15. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de lactococos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor A) .....	20
Figura 16. Contagem (Log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de lactococos em leite de ovelha refrigerado ao longo de quatro dias (Produtor B) .....	20
Figura 17. Escurecimento em Agar-Queijo sem tirosina pela levedura L15 .....	23
Figura 18. Escurecimento em Agar-Queijo sem tirosina pelo bolor B25 .....	23



## Índice de tabelas

Tabela 1. Composição média do leite de vaca, cabra, ovelha e humano.....	3
Tabela 2. Parâmetros e métodos utilizados para avaliar a qualidade microbiológica do leite.....	11
Tabela 3. Isolamento/purificação de colónias: meio de cultura e condições de incubação. ....	12
Tabela 4. Qualidade da identificação bioquímica por API. ....	13
Tabela 5. Temperatura do leite no local da recolha. ....	14
Tabela 6. Efeito dos fatores Produtor, Data de recolha e Período de refrigeração na qualidade microbiológica do leite cru de ovelha. ....	16
Tabela 7. Caracterização de identificação de isolados provenientes de leite cru de ovelha. ....	22
Tabela 8. Escurecimento de bolores e leveduras ao longo do tempo em Agar-Queijo com e sem tirosina.....	24



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

API	Analytical Profile Index
CATAA	Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar
DRBC	Agar dicloro rosa Bengal cloranfenicol
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
MRS	Agar Man, Rogosa e Sharpe
PCA	Agar peptona caseína glicose extrato de levedura
PDA	Agar dextrose batata
UFC	Unidade Formadora de Colónia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>