

# Inibição de *Escherichia coli* por bactérias lácticas e probióticas em leite fermentado com fibras de aveia aromatizado



ZACARCHENCO, P.B.1  
CHMIELEWSKA, D.2;  
TEIXEIRA, L. B.; MASSAGUER-ROIG, S.3;  
GALLINA, D.A. .1;  
SPADOTI, L.M. .1;  
SILVA, A.T.1;  
LISERRE, A.M.4;  
ANTUNES, A.E.C. 1

## RESUMO

A ação inibitória de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* sobre a população de *Escherichia coli* (ATCC 25992) foi verificada durante 28 dias de estocagem a 4°C. Leites fermentados por *Str. thermophilus* adicionados de *L. acidophilus* e *Bif. longum* foram inoculados com suspensões de *E.coli* nas concentrações de 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> ufc/ml, havendo também leite fermentado controle sem adição de *E.coli*.

Estes produtos continham fibra de aveia, aspartame, corante e saborizante de morango. *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* foram quantificados seletivamente. As determinações de coliformes a 30 e 45°C foram realizadas pela técnica do Número Mais Provável. A presença de *E.coli* foi verificada através de Fluorocult®. Durante os 28 dias de estocagem, houve

reduções nos valores de coliformes a 30 e 45°C nos leites fermentados adicionados de probióticos e *E.coli*.

## INTRODUÇÃO

A preocupação cada vez mais relevante com a vida saudável tem ajudado a desenvolver alguns setores de produtos. Com os alimentos *diet/light* mais que consolidados, é a vez de os alimentos funcionais ganharem atenção de fabricantes e consumidores. O mercado brasileiro de produtos funcionais, em geral, faturou cerca de US\$ 600 milhões em 2005 (15% do mercado de alimentos) e cresce cerca de 20% ao ano.

Para ilustrar a importância destes produtos, no Brasil, dentro da categoria de bebidas lácteas fermentadas, 84% das vendas são referente às caracterizadas como regulares, 8% referem-se

às *light/diet* e 8% às funcionais. Estes dados dizem respeito a volume. Em valor, as versões funcionais das bebidas lácteas fermentadas detém 15% de participação, enquanto as versões *light* ficam com 13%, segundo o gerente de produto da Batávia, Damiano Sanna, declarou à reportagem da Gazeta Mercantil (Azedo, 2007).

Leites fermentados têm alto valor nutricional e boa digestibilidade de lactose e proteínas, devido à fermentação láctica. O aumento da procura por alimentação mais saudável levou à adição de fibras a alimentos como os leites fermentados, pois o aumento de fibras na dieta é apontado como benéfico na prevenção de doenças como câncer de cólon, arteriosclerose e hipercolesterolemia associada, diabetes, diverticulose, hipertensão e obesidade (GOLDBERG, 1994).

1 Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL/TECNOLAT), Av. Brasil, 2880, Jd. Chapadão, CEP 13070-178, Campinas, Brasil, (19) 3743-1869/3883-7778, patyzacarchenco@yahoo.com.br

2 Bolsista FAPESP

3 FEA/UNICAMP; CP 6121, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

4 APTA REGIONAL – Pólo Regional Sudoeste Paulista - Sede Capão Bonito - CP 62, CEP 18300-970, Capão Bonito/ SP – Brasil

Shah (2007) salientou que o iogurte, que é um tipo de leite fermentado, é o mais importante modo de fornecer probióticos para o ser humano. O leite fermentado deste estudo, por conter probióticos e fibras, pode ser definido como alimento funcional de acordo com BISTRÖM & NORDSTRÖM (2002) e GOLDBERG (1994). Adicionalmente, o uso do aspartame reduz o teor de glicose na dieta sendo útil no tratamento e prevenção de obesidade e diabetes.

O leite fermentado deve atender à legislação vigente no Brasil que determina como valores máximos para coliformes a 30°C o índice de 100 NMP/g e, para coliformes a 45°C, 10NMP/g (BRASIL, 2007). Os microorganismos de leites fermentados inibem patogênicos e deteriorantes devido à síntese de ácidos e bacteriocinas (MUFAN-DAEDZA et al, 2006; IBRAHIM & BEZKOROVAINY, 1993).

No presente estudo, verificou-se a ação de *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* sobre *E. coli* (ATCC 25992) inoculada em leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* liofilizados, fibra de aveia, aspartame, corante e aromatizante. Foi realizada, também, caracterização físico-química da bebida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Quantificação de bactérias lácticas e probióticas

*Str. thermophilus* codificado por *STr*, *L. acidophilus* (LAC4) e *Bif. longum* (BL) foram quantificados com métodos reportados em ZACARCHENCO & MASSAGUER-ROIG (2004a e b). Estes microorganismos foram fornecidos na ocasião do estudo por Groupe Rhône-Poulenc, Rhodia Foods (Paulínia, SP, Brasil). As contagens foram realizadas em triplicata.

### Quantificação de coliformes a 30 e 45°C e detecção de *E. coli*

A quantificação de coliformes a 30 e 45°C foi realizada pelo método do Número Mais Provável descrito em VAN-DERZANT E SPLITTSTOESSER (1992). Para verificação da presença de *E. coli* utilizou-se Fluorcultâ (MERCK, 1994). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Preparo dos inóculos de *E. coli*

A suspensão de *E. coli* ATCC 25992 em caldo TSB com, aproximadamente, 10<sup>8</sup> células/g foi diluída e usada para inocular os leites fermentados C2, C3 e C4 (ver explicação a seguir). Analisou-se, também, a bebida sem adição de *E. coli* C1 (padrão). As análises foram realizadas nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 de estocagem.

### Elaboração dos leites fermentados

O produto de estudo foi um leite desnatado (Molico, Nestlé) reconstituído a 12% de sólidos, tratado termicamente (95°C/5 min.) e fermentado por *Str. thermophilus* a 43°C. Após atingir pH 4,7, o leite fermentado foi resfriado e batido, quando se adicionou os probióticos liofilizados, aroma idêntico ao natural de morango da Duas Rodas Industrial Ltda (0,2g/l), corante vermelho ponceau 4R também da Duas Rodas Industrial Ltda (0,005g/l), aspartame Ajinomoto (0,06g/100g) e fibra de aveia HF 600 VITACEL® Clariant (13g/l). Maiores detalhes sobre a elaboração deste produto podem ser encontradas em ZACARCHENCO & MASSAGUER-ROIG (2006) ou em Zacarchenco (2004c).

Amostras de leite fermentado foram porcionadas em recipientes estéreis, inoculadas ou não com *E. coli* nas colocadas a seguir e armazenadas a 4°C. Codificou-se C1 como o leite fermentado sem inóculo de *E. coli*,

com probióticos; C2: leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>1</sup> células. *E. coli*/g; C3: leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>2</sup> células. *E. coli*/g; C4: leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>3</sup> células. *E. coli*/g. Foram realizados três processamentos.

### Caracterização físico-química

Foram determinados o pH, pelo método potenciométrico, e a acidez titulável, teor de sólidos totais, gordura por extração etérea de Monjonier, porcentagem de cinzas e teores de nitrogênio total do leite fermentado segundo AOAC (1995). Os teores de nitrogênio total foram determinados pelo método de Kjeldahl, sendo os valores de nitrogênio multiplicados por 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína. As análises de dois processamentos foram realizadas em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores de gordura, proteína, umidade e cinzas do leite fermentado base para o estudo estão relacionados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Média (n=2) das determinações de gordura, cinzas, proteínas, extrato seco total, acidez e pH do leite fermentado usado para o estudo 1

Componente	
Extrato seco total – EST %	11,85
Gordura %	0,1
Proteína %	4,22
Cinzas %	0,92
pH	4,49
ácido láctico (p/v) %	0,83

1. leite fermentado por *Str. thermophilus* após reconstituição de leite em pó desnatado a 12% adicionado de fibra de aveia, corante, aromatizante e aspartame

Na Tabela 2 estão as médias dos resultados das análises para coliformes a 30 e 45°C dos leites fermentados dos três processamentos e na Tabela 3, as quantidades de células viáveis de *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*. Verificou-se inibição dos coliformes a 30 e 45°C ao longo do

período de estocagem indicando efeito inibitório dos microrganismos do leite fermentado sobre ambos os grupos.

A combinação C4 nos processamentos 1 e 3, no 7º dia, continha quantidades de coliformes totais/ml que excediam o recomendado na

legislação. Já no 14º dia, as formulações C4 continham quantidades de coliformes totais/ml dentro dos padrões legais. O leite fermentado não inoculado de *E. coli* apresentou coliformes fecais <3 NMP/ml em todos os processamentos, apontando boas condições higiênico-sanitárias.

**Tabela 2.** Determinação de coliformes a 30 e 45°C no leite fermentado com probióticos nos 3 processamentos (NMP/ml)

Combinações <sup>1</sup>	Tempo de armazenamento (dias)									
	2		7		14		21		28	
	fecais	totais	fecais	totais	fecais	totais	fecais	totais	fecais	totais
C1(1)	3	250	3	3	3	3	3	3	3	3
C1(2)	3	460	3	4	3	3	3	3	3	3
C1(3)	3	150	3	3	3	3	3	3	3	3
C2(1)	43	210	23	23	3	3	3	3	3	3
C2(2)	28	110	4	9	3	4	3	3	3	3
C2(3)	37	240	23	43	3	3	3	3	3	3
C3(1)	460	780	14	75	3	3	3	3	3	3
C3(2)	210	1100	4	43	3	4	3	3	3	3
C3(3)	270	1100	93	93	3	3	3	3	3	3
C4(1)	2400	1100	90	430	40	40	3	3	3	3
C4(2)	2800	1100	30	700	30	30	30	30	30	30
C4(3)	2100	1100	43	240	23	30	3	3	3	3

1. Apresentados valores dos 3 processamentos. Codificou-se C1 como o leite fermentado sem inóculo de *E. coli*, com probióticos; C2: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>1</sup> células. *E. coli*/g; C3: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>2</sup> células. *E. coli*/g; C4: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>3</sup> células. *E. coli*/g

**Tabela 3.** Média (n=3) das contagens de células viáveis de *Str.thermophilus* (STR), *L.acidophilus* (LAC) e *Bif.longum* (BIF) (UFC/ml)

Combinações <sup>1</sup>	Tempo de armazenamento (dias)														
	2			7			14			21			28		
	STR	LAC	BIF	STR	LAC	BIF	STR	LAC	BIF	STR	LAC	BIF	STR	LAC	BIF
C1	1,78 E+09	1,13 E+07	7,50 E+07	1,94 E+09	3,00 E+07	1,16 E+08	1,85 E+09	1,25 E+07	1,09 E+08	1,99 E+09	1,51 E+07	6,40 E+07	4,47 E+09	1,46 E+07	1,19 E+08
C2	1,73 E+09	3,18 E+07	1,15 E+07	1,74 E+09	3,01 E+07	5,12 E+07	2,30 E+09	1,47 E+07	4,33 E+07	1,79 E+09	1,54 E+07	1,10 E+08	1,70 E+09	2,88 E+08	2,18 E+08
C3	1,67 E+09	3,90 E+07	7,83 E+07	1,81 E+09	3,45 E+07	1,39 E+08	1,34 E+09	1,29 E+07	5,76 E+07	1,88 E+09	1,82 E+07	2,98 E+07	1,57 E+09	3,42 E+07	3,31 E+08
C4	1,53 E+09	4,12 E+07	1,12 E+07	1,80 E+09	3,65 E+07	5,59 E+07	1,68 E+09	4,01 E+07	1,24 E+08	1,81 E+09	2,19 E+07	6,39 E+07	1,98 E+09	2,92 E+07	2,32 E+08

1. Codificou-se C1 leite fermentado sem inóculo de *E. coli*, com probióticos; C2: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>1</sup> células. *E. coli*/g; C3: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>2</sup> células. *E. coli*/g; C4: Leite fermentado, com probióticos, inoculado com 10<sup>3</sup> células. *E. coli*/g

MASSA et. al. (1997) reportaram a sobrevivência de *E.coli* O157:H7 durante fermentação e armazenamento de bebida láctea fermentada por *Str. thermophilus* e/ou *Bif. longum*. A bebida inoculada com  $10^3$  células. *E. coli*/g mostrou redução de 1 log no 7º dia de estocagem. Estes dados reforçam os resultados apresentados neste trabalho. Em geral, as linhagens de *E.coli* patogênicas são mais tolerantes a pH baixos do que as não-patogênicas.

Após 28 dias de estocagem as contagens de probióticos ficaram entre  $8 \times 10^6$  e  $7 \times 10^7$  UFC/ml para *L. acidophilus*, e  $7,5 \times 10^7$  e  $5,5 \times 10^8$  p/ *Bif. longum*, acima de  $10^6$  céls/ml. Assim, os valores de células viáveis de microrganismos probióticos atende a um dos aspectos para que o produto possa ter a alegação de propriedade funcional como probiótico constante da Resolução nº 18 e 19 de 1999 e Resolução RDC nº 2 de 2002, do Ministério da Saúde. As contagens de *Str.thermophilus* se mantiveram constantes a, aproximadamente,  $10^9$  UFC/ml.

## CONCLUSÕES

O leite fermentado não inoculado com *E.coli* apresentou coliformes a  $45^\circ\text{C}$   $<3$  NMP/ml, o que caracteriza condições de processamento adequadas do ponto de vista higiênico-sanitário. Foi verificada a inibição de coliformes a  $30$  e  $45^\circ\text{C}$  ao longo da estocagem por microrganismos do leite fermentado. A população de *Str. thermophilus* não se alterou mesmo após 28 dias de estocagem a  $4^\circ\text{C}$ , mantendo-se a  $10^9$  UFC/ml.

O leite fermentado adicionado de probióticos apresentou células viáveis de *L. acidophilus* e *Bif. longum* ficaram acima de  $10^6$  UFC/ml, o que atende uma das exigências para que o produto tenha efeito benéfico sobre a saúde de quem o consome. ▶

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16<sup>th</sup> edition. Washington, vol. 1-2. 1995.
- AZEDO, S. Alimentos funcionais aumentam espaço nas gôndolas. **Gazeta Mercantil**, Caderno C, p. 6, 29/08/2007.
- Biström, M, Norsdröm, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development, **Trends in Food Science and Technology**. 13 (11): 372-379. 2002.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília: 24 outubro. 2007. Seção 1. p. 5. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília: 9 janeiro. 2002. Seção 1. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília: 3 maio. 1999. Seção 1. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília: 3 maio. 1999. Seção 1. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde.
- Goldberg, I. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Ed.Chapman & Hall. 1994.
- Ibrahim, S.A.; Bezkorovainy, A. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. **Journal of Food Protection**. 56 (8): 713-715 (1993)
- Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V. u. Pace, R.D., Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yogurt during preparation and storage at  $4^\circ\text{C}$ . **Letters in Applied Microbiology**. 24: 347-350. 1997.
- Merck. Manual de Médios de Cultivo. 1994.
- Mufandaedza, J.; Viljoen, B.C.; Feresu, S.B.; Gadaga, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**. v. 108, p. 147-152. 2006
- Shah, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 1262-1277. 2007.
- Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. **Compendium of Methods of Microbiology for Examination Foods**. APHA – Technical Committee Microbiology of .Methods Foods. 1992.
- Zacarchenco, P.B.; Massaguer-Roig,S. Enumeration of *Str. thermophilus* in the presence of *Bif.longum* and *Lac. acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 7/8, 370-372, 2004a.
- Zacarchenco, P.B.; Massaguer-Roig,S. Differential enumeration of *Bif.longum* and *Lac.acidophilus* in the presence of *Str.thermophilus* **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 5/6, p. 258-261, 2004b
- Zacarchenco, P.B.; Massaguer-Roig,S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Str.thermophilus*, *Bif.longum* e *Lac.acidophilus*, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.24, nº 4, Campinas, Oct./Dec. 2004c