



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS



ESTUDO DA FERMENTAÇÃO E VIDA-DE- PRATELEIRA DE BEBIDA SIMBIÓTICA FERMENTADA A BASE DE SOJA

Suzana Reis Evangelista
Engenheira de alimentos

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em Engenharia de
Alimentos.**

CAMPINAS - SP

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

Ev14s Evangelista, Suzana Reis
Estudo da fermentação e vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja / Suzana Reis Evangelista. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probiótico. 2. Prebiótico. 3. Soja. 4. Fermentação. 5. Vida-de-prateleira. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Study of the fermentation and shelf-life of a fermented soy based symbiotic beverage

Palavras-chave em inglês (Keywords): Probiotic, Prebiotic, Soy, Fermentation, Shelf-life

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Olga Lúcia Mondragón Bernal

Saartje Hernalsteens

Fatima Aparecida de Almeida Costa

Adriano Gomes da Cruz

Data da Defesa: 24/02/2011

Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de mestrado **Estudo da fermentação e vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja** defendida por Suzana Reis Evangelista, aprovado pela Comissão Julgadora em

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador – FEA/UNICAMP

Prof^a. Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal
Membro Titular – Depto. de Ciência dos alimentos/UFLA

Prof^a. Dra. Saartje Hernalsteens
Membro Titular – Depto. de Ciências Exatas e da Terra/UNIFESP

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa
Membro Suplente – FEA/UNICAMP

Dr. Adriano Gomes da Cruz
Membro Suplente – FEA/UNICAMP

Agradecimentos

Agradeço a Deus que sempre ilumina meu caminho.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, por toda orientação, atenção, amizade, ensinamentos, e principalmente por confiar em mim.

À Profa. Dr^a. Olga Lucía Mondragón Bernal, Profa. Dr^a. Saartje Hernalsteens, Dr^a. Fátima Aparecida de Almeida Costa e Dr. Adriano Gomes da Cruz, por participarem da banca examinadora, suas sugestões e correções foram de grande importância para este trabalho.

À Profa. Dr^a. Rosiane Lopes pelo empréstimo do reômetro, e a Aninha e Mari pela enorme ajuda com as análises.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e a Unicamp pela oportunidade de realização desse trabalho.

Às entidades e empresas pela doação do material utilizado nesta pesquisa: DANISCO pelos probióticos, OLVEBRA pelo extrato de soja, ORAFIT pelos frutoligosacarídeos e DOREMUS pelo antiespumante.

Aos professores e funcionários do Departamento e Faculdade de Engenharia de Alimentos.

A todo pessoal do LEB, pelo enorme companheirismo: Bárbara, Rosana, Marquinhos, Rafael, Andréa, Abraão, Mônica, Luige, em especial a Gi que muito me ajudou nas análises, Zama por me ajudar com o Dionex, Fifa por todas orientações, Profa. Bel pelos ensinamentos e Cris, Susan, Remi e Ana pela enorme amizade.

À Telma amiga de república, obrigada por me ajudar sempre, por todos momentos divertidos e complicados que dividimos, por toda amizade que vou guardar para sempre.

À turma do “mestrado”, Fran, Gustavo, Talita, Nelson, Paula, Lorena, Telma, Susan, Cris, Elisa e Adelaine obrigada pela amizade e por ajudar a aliviar a dor de estar longe de casa, vou sentir saudades.

Aos meus irmãos Pati e André pelo apoio.

Em especial ao Felipe, meu namorado, por entender desde o início a importância deste trabalho para mim, e me incentivar em todas minhas decisões, seu apoio foi fundamental.

E principalmente aos meus pais, pelo exemplo, apoio, incentivo, confiança e amparo, vocês foram minha base para me manter sempre confiante e nunca querer desistir.

Sumário

RESUMO GERAL	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
Objetivo Geral	3
Objetivos Específicos	3
PLANO DE TRABALHO	4
Capítulo 1	5
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1 – Antecedentes	6
1.2 – Alimentos Funcionais	6
1.3 – Probióticos	7
1.4 –Efeito dos probióticos na saúde	9
1.5 – Prebióticos	11
1.6 – Fruto-oligossacarídeos – FOS	13
1.7 – Simbióticos.....	14
1.8 – Extrato Hidrossolúvel de Soja.....	14
1.9 – Aceitação Sensorial de Soja	16
1.10 – Vida-de-Prateleira	17
1.11 – Propriedades reológicas de alimentos	20
Referência Bibliográfica	22
2. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA	30
CAPÍTULO 2. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA.....	31
2.1 INTRODUÇÃO.....	32

2.2 – MATERIAL E MÉTODOS	33
2.2.1 - Material	33
2.2.1.1 – Matéria-prima	33
2.2.1.2 – Culturas	33
2.2.1.2.1 – Contagem dos micro-organismos liofilizados	34
2.2.1.2.2 – Avaliação da viabilidade celular dos probióticos após congelamento	34
2.2.1.3 – Meio de Cultura	35
2.2.2 – Metodologia	35
2.2.2.1 – Preparo do inóculo	35
2.2.2.2 – Fermentação	35
2.2.2.3 – Condições do processo	35
2.2.2.4 – Metodologia Analítica	37
2.2.2.4.1 – Medição do pH	37
2.2.2.4.2 – Contagem de Colônias	37
2.2.2.4.3 – Análise de fruto-oligossacarídeos.....	38
2.2.2.4.4 – Análise de ácidos	38
2.2.2.4.5 – Cinética de crescimento microbiano.....	39
2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.3.1 – Planejamento experimental Plackett & Burman.....	39
2.3.2 – Efeito da sacarose, <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> sobre a fermentação.....	44
2.4 – Conclusão	50
2.5 – Referência Bibliográfica	51
3. ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA.....	55
CAPÍTULO 3. ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA	56
3.1 – Introdução.....	57

3.2	MATERIAL E MÉTODOS	58
3.2.1	– Material	58
3.2.1.1	– Matéria-prima	58
3.2.1.2	– Culturas	58
3.2.1.2.1	– Contagem dos micro-organismos liofilizados	59
3.2.1.2.2	– Avaliação da viabilidade celular dos probióticos após congelamento	59
3.2.1.3	– Meio de Cultura	60
3.2.2	– Metodologia	60
3.2.2.1	– Preparo do inóculo	60
3.2.2.2	– Fermentação	60
3.2.2.3	– Vida-de-prateleira	60
3.2.2.4	– Condições do processo	61
3.2.2.5	– Metodologia Analítica	62
3.2.2.5.1	– Medição do pH	62
3.2.2.5.2	– Medida de Sinérese.....	62
3.2.2.5.3	– Contagem de Colônias	62
3.2.2.5.4	– Determinação das propriedades reológicas	63
3.2.2.5.5	– Análise de Fruto-oligossacarídeos	63
3.2.2.5.6	– Análise de ácidos	64
3.2.2.5.7	– Cinética de crescimento microbiano.....	64
3.3	– Resultados e Discussão	65
3.3.1	– Resultado do planejamento experimental Plackett & Burman	65
3.3.2	– Resultados de experimentos com sacarose, <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	78
3.4	– Conclusão	85
3.5	– Referência Bibliográfica	86
	Conclusões Gerais e sugestões para trabalhos futuros	91

Índice de tabelas

Capítulo 2

Tabela 2. 1: Perda da viabilidade dos probióticos pelo congelamento.	35
Tabela 2. 2: Matriz do delineamento do Plackett & Burman com valores reais entre parênteses.....	36
Tabela 2. 3: Concentração do inóculo e de sacarose utilizados para as fermentações do extrato hidrossolúvel de soja.	37
Tabela 2. 4: Resultados do planejamento Plackett & Burman.	40
Tabela 2. 5: Efeitos das variáveis sobre o pH durante fermentação de extrato hidrossolúvel de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.	41
Tabela 2. 6: Efeitos das variáveis sobre a contagem total final, μx e Δx durante fermentação do extrato hidrossolúvel de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.....	42
Tabela 2. 7: pH durante a fermentação para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja.....	44
Tabela 2. 8: Contagens de probióticos (log UFC/mL), concentrações de fruto-oligossacarídeo (FOS) e sacarose, e consumo de substratos (%), em fermentados de extrato de soja adicionados de <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e sacarose.	46
Tabela 2. 9: Concentração de ácido láctico e acético (g/L) na fermentação de extrato hidrossolúvel de soja por bactérias probióticas.	49

Capítulo 3

Tabela 3. 1: Perda da viabilidade dos probióticos pelo congelamento.	60
Tabela 3. 2: Matriz do delineamento do Plackett & Burman com valores reais entre parênteses.....	61
Tabela 3. 3: Concentração do inóculo e de sacarose.....	62
Tabela 3. 4: Resultados do planejamento Plackett & Burman para: pH, sinérese, viscosidade aparente e contagem total (CT) durante a vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja.	66

Tabela 3. 5: Resultados obtidos no planejamento Plackett & Burman para: μ_x velocidade específica de crescimento e Δx variação do número de células durante vida-de-prateleira.	67
Tabela 3. 6: Efeitos das variáveis sobre a sinérese e viscosidade aparente (η_{ap}) durante a vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.....	68
Tabela 3. 7: Efeito das variáveis sobre a contagem total durante a vida-de-prateleira da bebida simbiótica fermentada a base de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.	71
Tabela 3. 8: Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,998$) para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira do delineamento experimental Plackett & Burman.	73
Tabela 3. 9: Concentração de fruto-oligossacarídeos (FOS) (g/L) durante vida-de-prateleira.	75
Tabela 3. 10: pH, viscosidade aparente ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$) e sinérese durante a vida-de-prateleira para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja.....	79
Tabela 3. 11: Contagem total ($\log \text{UFC/mL}$) μ_x (h^{-1}) e Δx (UFC/mL) para bebida fermentada a base de soja durante a vida-de-prateleira.	80
Tabela 3. 12: Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,998$) para bebidas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira.	81
Tabela 3. 13: Concentração de fruto-oligossacarídeos (FOS) (g/L) durante a vida-de-prateleira.	82
Tabela 3. 14: Concentração de ácidos acético e láctico (g/L) em bebidas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira.	84

Índice de figuras

Capítulo 2

- Figura 2. 1:** Cromatograma de FOS 5% (m/v). G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 47
- Figura 2. 2:** Cromatograma da composição de açúcares do ensaio 1 da bebida simbiótica a base de soja ao final da fermentação. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 47
- Figura 2. 3:** Cromatograma do extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v). G (glicose), F (frutose), GF (sacarose). 48

Capítulo 3

- Figura 3. 1:** Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 15 da bebida simbiótica a base de soja no início da vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 77
- Figura 3. 2:** Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 15 da bebida simbiótica a base de soja após 30 dias de vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 77
- Figura 3. 3:** Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 8 da bebida simbiótica a base de soja no início da vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 83
- Figura 3. 4:** Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 8 da bebida simbiótica a base de soja após 30 dias de vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose). 84

RESUMO GERAL

Existe, atualmente, uma busca pelo consumidor por alimentos que sejam ao mesmo tempo saudáveis e de qualidade. Com isso, diferentes produtos tem sido criados para atender essa demanda. O presente trabalho teve como objetivo estudar a fermentação e a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja, avaliando a influência das concentrações de extrato hidrossolúvel de soja, de fruto-oligossacarídeos (FOS), dos micro-organismos *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e da temperatura, além de observar alterações no produto pela adição de sacarose e dos micro-organismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As análises realizadas foram: pH, sinérese, viscosidade aparente, contagem de colônias, velocidade específica de crescimento (μ_x) e variação da contagem de células (ΔX). A fermentação foi realizada em frascos estáticos incubados em diferentes temperaturas, tendo a composição do meio e condições do processo definidas por um delineamento fatorial Placket & Burman. O estudo da vida-de-prateleira foi realizado em refrigeração (3-8 °C). Amostras foram retiradas em espaços predefinidos de tempo para as fermentações e nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias, no estudo da vida-de-prateleira. O extrato hidrossolúvel de soja se apresentou como um bom substrato para produção da bebida, porém na medida em que se aumenta sua concentração ocorre um aumento da sinérese, o mesmo fenômeno foi observado quanto à adição de FOS. Os probióticos ao final da fermentação tiveram contagem maior que 10^7 UFC/mL atendendo aos requisitos legais, e em sua maioria continuaram apresentando crescimento durante o período de estocagem, contribuindo para obtenção de um produto de qualidade. Temperaturas mais baixas foram melhores para o crescimento dos probióticos e viscosidade aparente do produto. A adição de sacarose provocou um menor consumo de FOS por parte dos probióticos, e a presença de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mostrou pouca variação no produto. Portanto a partir dos resultados obtidos no estudo da fermentação e vida-de-prateleira da bebida simbiótica a base de soja, pode-se concluir que para obtenção de um produto com maior qualidade ao final da fermentação e que conserve suas características durante a vida-de-

prateleira deve-se utilizar, de acordo com a faixa estudada, as seguintes condições de processo: temperatura mais baixa (em torno de 35°C), fruto-oligossacarídeos 3% (m/v) e sacarose 12% (m/v), que devem ser acrescentados ao final da fermentação, extrato hidrossolúvel de soja a 10% (m/v), e concentração dos probióticos de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL, exceto para *L. paracasei* que deve ser de 1×10^6 UFC/mL.

Palavras chaves: Bebida simbiótica, extrato de soja, fermentação láctica, vida-de-prateleira, Plackett & Burman.

ABSTRACT

Currently, there is a quest for foods that are both healthy and of good quality, so that different products have been designed to meet this demand. The present work aimed to study the fermentation and shelf-life of a soy-based symbiotic drink, assessing the influence of the concentrations of: soymilk, fructooligosaccharides (FOS), *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and of the temperature. Additionally, sucrose and the microorganisms *Streptococcus thermophilus* (ST) and *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (LB) were further added. The responses were: pH, syneresis, viscosity, cell count, specific growth rate (μ_x) and variation of cell count (ΔX). The fermentations were carried out in still flasks, incubated at different temperatures, at medium compositions and process conditions as defined by a Plackett & Burman factorial design. Samples were collected at predefined spaces of time for fermentation and for shelf-life at 0, 10, 20 and 30. It has been shown that the soymilk is a good substrate for the production of the beverage, but at higher concentrations leads to increased syneresis, the same phenomenon observed for addition of FOS. Probiotics at the end of fermentation had ideal concentration, and the most of them went on growing during the *shelf-life* storage period, helping to maintain the quality of the product. Lower temperatures were better for the probiotics growth and product viscosity. The addition of sucrose resulted in a lower consumption of FOS. On the other hand, the addition of ST and LB showed meaningless variation in the product. So, from the results obtained in the study of fermentation and *shelf-life* of symbiotic drink soy-based, it can be concluded that to obtain a product with the highest quality at the end of fermentation and to retain its characteristics during *shelf-life* should be used, according to the range studied, the following process conditions: low temperature (around 35°C), FOS 3% and 12% sucrose, which must be appended to the end of fermentation, the aqueous extract of soybean 10% of probiotics and concentration of 5.5×10^6 CFU/mL, except for *L. paracasei* that should be of 1×10^6 CFU/mL.

Keywords: drink symbiotic, soymilk, lactic fermentation, shelf-life, Plackett & Burman.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente os alimentos são vistos como um veículo de promoção do bem-estar e saúde e, ao mesmo tempo, como redutores dos riscos de algumas doenças, incentivando as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e visando atender à demanda por produtos que sejam ao mesmo tempo saudáveis e atrativos (Komatsu *et. al.*, 2008).

São considerados alimentos funcionais aqueles que além de fornecerem a nutrição básica promovem a saúde. Esse potencial é obtido através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se a promoção da saúde e não a cura de doenças (Sanders, 1998). Assim, alimentos que contenham probióticos e prebióticos são considerados funcionais.

Um alimento funcional probiótico deve conter micro-organismos que vão atuar em toda a extensão do trato gastro-intestinal, atingindo-o em um estado viável e em números significativos para serem benéficos ao anfitrião, o que requer que sobrevivam às condições ácidas do estômago e à bÍlis no intestino delgado (Fooks *et al.*, 1999, Stanton *et al.*, 2001).

O prebiótico foi originalmente definido como um ingrediente alimentar não digerível, que atua estimulando seletivamente o crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, podendo melhorar a saúde do hospedeiro (Gibson & Roberfroid, 1995; Fooks *et al.*, 1999; Knorr, 1998). Atualmente existe uma definição mais abrangente, publicada no relatório do Encontro técnico da FAO sobre Prebióticos, como sendo um componente alimentar não viável que confere benefícios à saúde do hospedeiro associados com a modulação da sua microbiota (Pineiro *et al.*, 2008).

O extrato hidrossolúvel de soja é um substrato que tem se apresentado com potencial para produção de novos produtos com apelo saudável, porém encontra grande rejeição devido ao seu sabor característico que lembra feijão cru (Behrens, 2002). Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que quando a soja passa por processos de fermentação, esse sabor desagradável diminui, sendo mais

aceito sensorialmente, além de poder ser mascarado com adição de saborizantes (Mondragón-Bernal, 2010; Branco et. al. 2007).

Mondragón-Bernal (2004) realizou fermentações em frascos não agitados e demonstrou que o extrato hidrossolúvel de soja é um meio eficaz para cultivo de probióticos *L. paracasei subsp. paracasei LBC81*, *L. acidophilus LAC4* e *B. longum BL04*, atingindo contagem de células de 10^{10} - 10^{13} UFC/mL, em até 20-24 horas de fermentação, com e sem adição de prebiótico (fruto-oligossacarídeos). Posteriormente Mondragón-Bernal (2009) desenvolveu um estudo onde observou que *L. rhamnosus* inoculado junto com *L. acidophilus*, *L. paracasei*, e *B. longum*, melhora as características de estabilidade do produto durante a vida-de-prateleira, verificando que a soja e a sacarose foram as variáveis que mais apresentaram efeito significativo positivo para o alimento simbiótico, em aspectos como diminuição da sinérese, maior viscosidade aparente e maior contagem total e de bifidobactéria.

Com base no exposto acima, e dando continuidade aos estudos realizados por Mondragón-Bernal, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da temperatura, concentração de extrato hidrossolúvel de soja, fruto-oligossacarídeos e probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*) na produção de bebida simbiótica a base de soja, tanto no processo de fermentação quanto na vida-de-prateleira, utilizando a metodologia de planejamento fatorial Plackett & Burman, visando esclarecer a influência das concentrações dessas variáveis e verificação da temperatura ótima do processo, assim como observar a influência das culturas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (tradicionais do iogurte) e sacarose no crescimento dos probióticos e características do produto como viscosidade e sinérese.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar as variáveis que afetam a produção de bebida simbiótica a base de soja, adicionando o prebiótico fruto-oligossacarídeos, e os probióticos: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*.

Objetivos Específicos

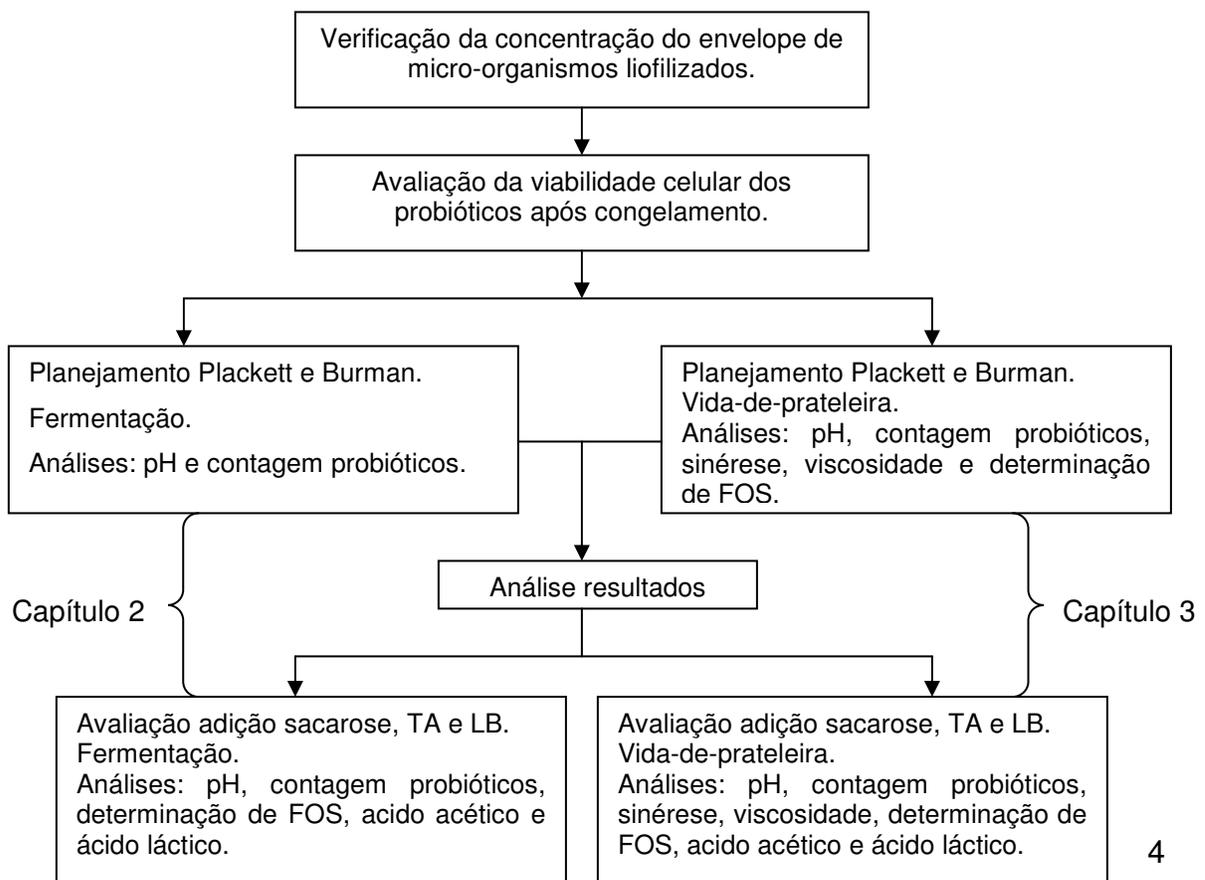
Avaliar a influência da concentração do extrato hidrossolúvel de soja, fruto-oligossacarídeo, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e da temperatura no processo de fermentação da bebida simbiótica.

Estudar durante 30 dias de vida-de-prateleira do produto simbiótico sob refrigeração o pH, contagem de células, sinérese, viscosidade, concentração de fruto-oligossacarídeos, ácido láctico e ácido acético.

Realizar experimentos com adição de sacarose e cultura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* e observar as variações na fermentação e vida-de-prateleira do produto.

PLANO DE TRABALHO

A primeira etapa do trabalho consistiu na verificação da concentração de células dos envelopes dos micro-organismos liofilizados, e em seguida foi realizada a avaliação da viabilidade celular dos probióticos após congelamento. Esses dois procedimentos foram realizados para padronizar o inóculo utilizado nos ensaios e estão descritos no início dos capítulos 2 e 3. Após essa etapa foi realizado um planejamento do tipo Plackett e Burman para avaliar a influência de diferentes variáveis na produção da bebida simbiótica durante a fermentação e vida-de-prateleira do produto. Posteriormente com base nos resultados obtidos no planejamento foram realizados ensaios para verificar o efeito da adição de sacarose, *Streptococcus thermophilus* (TA) e *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (LB) durante a fermentação e vida-de-prateleira. Assim a dissertação foi dividida em capítulos da seguinte forma: Capítulo 1 apresenta a revisão bibliográfica geral, Capítulo 2 se refere ao estudo da fermentação (planejamento do tipo Plackett e Burman e ensaios posteriores), Capítulo 3 estudo da vida-de-prateleira (planejamento do tipo Plackett e Burman e ensaios posteriores). O fluxograma a seguir mostra as etapas do trabalho.



Capítulo 1.

1. Revisão Bibliográfica

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 – Antecedentes

Mondragón-Bernal (2004) realizou fermentações em frascos não agitados e demonstrou que o extrato hidrossolúvel de soja é um meio eficaz para cultivo de probióticos *L. paracasei subsp. paracasei LBC81*, *L. acidophilus LAC4* e *B. longum BL04*, atingindo contagem de células de 10^{10} - 10^{13} UFC/mL, em até 20-24 horas de fermentação, com e sem adição de prebiótico (fruto-oligossacarídeos). A melhor condição encontrada pelo autor foi a 37°C, proporção de 40/60 de *L. acidophilus + L. paracasei / B.longum*, com inóculo de 5×10^5 UFC/mL, 20 g/L de xarope tendo 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato hidrossolúvel de soja desengordurado, num total de 17,75 horas de fermentação atingindo $1,24 \times 10^9$ UFC/mL, e o produto final foi considerado simbiótico por conter prebióticos e probióticos em quantidades superiores às mínimas exigidas para esse tipo de alimento 10^7 UFC/mL (ANVISA, 2002).

Posteriormente Mondragón-Bernal (2009) desenvolveu um estudo onde observou que *L. rhamnosus* inoculado junto com *L. acidophilus*, *L. paracasei*, e *B.longum*, melhora as características de estabilidade do produto durante a vida-de-prateleira, verificando que a soja e a sacarose foram as variáveis que mais apresentaram efeito significativo positivo para o alimento simbiótico, em aspectos como diminuição da sinérese, maior viscosidade aparente e maior contagem total e de bifidobactéria.

1.2 – Alimentos Funcionais

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, em meados de 1980, como alimentos similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal que demonstram além de suas funções básicas nutricionais, benefícios fisiológicos capazes de reduzir o risco de doenças crônicas. Esses alimentos se tornam conhecidos como Alimentos para Uso

Específico de Saúde – Foods for Specified Health Use - (FOSHU) (Roberfroid, 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, na Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, considera a alegação de propriedade funcional do alimento quando ele é consumido como parte da dieta usual e forneça além das funções nutricionais básicas, efeitos benéficos a saúde, sendo seguro seu consumo sem supervisão médica.

Os alimentos funcionais têm sido desenvolvidos em praticamente todas as categorias de alimento de inúmeras formas, abrangendo uma ampla gama de produtos incluindo desde iogurtes com probióticos a ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 (Siró et al., 2008; Williamsom, 2009).

Os consumidores desde alguns anos de uma maneira geral estão mais interessados em alimentos funcionais devido a diversos fatores: uma maior conscientização da relação entre saúde e nutrição, o interesse em prevenir ao invés de curar doenças e aumento da evidência científica para sua eficácia (Sanders, 1998). Para que um produto funcional tenha sucesso entre os consumidores é importante que contenha descrições claras sobre os benefícios causados pelo seu consumo, não informando somente a presença de ingredientes benéficos, mas também o que eles ocasionam (Bleiel, 2010). A mensagem do efeito na saúde de um produto específico deve ser transmitida através de meios credíveis de uma maneira simples e de uma forma que possa ser facilmente alcançada pelos consumidores (Siró et al., 2008).

Diversos estudos são realizados com o objetivo de produzir e avaliar a relação dos alimentos funcionais com a saúde. Há evidências crescentes desses benefícios como por exemplo na redução do colesterol e tratamento de diarreia aguda em adultos e crianças (Williamsom, 2009).

1.3 – Probióticos

O interesse pelo uso de micro-organismos vivos com o propósito de manutenção da saúde, além de prevenção ou auxílio no tratamento de doenças, vêm aumentando ao longo dos anos (Fooks, 1999), e atualmente os alimentos

probióticos são um dos maiores mercado de alimentos funcionais e representam um enorme potencial de crescimento para a indústria alimentar (Granato, 2010).

Guarner & Schaafsman (1998) definiram os probióticos, como sendo: “Micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos na saúde do indivíduo”. No entanto a definição mais aceita até hoje é que: “os probióticos são micro-organismos vivos, administrados em certas quantidades que conferem benefícios a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Um micro-organismo probiótico deve atender certas exigências que são: resistência ao ambiente ácido estomacal, a bile e às enzimas pancreáticas, adesão às células da mucosa intestinal, capacidade de colonização, produção de substâncias antimicrobianas contra as bactérias patogênicas e ausência de translocação (Fooks et. al., 1999).

A seleção de alimentos adequados para fornecer probióticos é um fator fundamental que deve ser levado em conta para o desenvolvimento de alimento probiótico. Originalmente era realizada por produtos lácteos, porém atualmente há uma tendência crescente de desenvolvimento de novos produtos. Também observa-se a disponibilização dos ingredientes funcionais em cápsulas, apesar de haver dúvidas sobre a eficácia dessa forma de consumo, já que exclui o potencial efetivo sinérgico com o alimento (Ranadheera et. al., 2010).

O intestino humano e animal são habitados naturalmente por bifidobactérias. A microflora no intestino do bebê é ocupada por 80 % de bifidobactérias e essa população parece ser relativamente estável até a idade adulta, quando começa seu declínio. Essa população microbiana é influenciada pela dieta, antibióticos, estresse, etc. (Tamime *et al.*, 1995).

As bifidobactérias são micro-organismos gram-positivas, anaeróbios (no entanto, algumas são tolerantes ao oxigênio) e requerem nutrientes especiais, o que dificulta seu isolamento e crescimento em laboratórios. Segundo Tamime *et al.* (1995), elas crescem em meios que contêm triptose, fitona (peptona de soja), extrato de levedura, agrupam-se em colônias com forma de disco voador com bordas bem definidas. Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20 °C a 46 °C e morrem a 60 °C. O pH ótimo de crescimento é 6,5-7,0, não havendo

crescimento em valores de pH inferiores a 5,1 e superiores a 8,0 (Gimenez, 2002).

Atualmente estudos científicos *in vivo* usando animais ou voluntários humanos têm demonstrado que o consumo de células vivas destes microorganismos tem efeito sobre a microbiota do trato digestivo, algumas cepas são capazes de sobreviver ao estomago e ao trânsito intestinal e atingem o cólon em número elevado (Shah, 2007).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* fazem parte do grupo *Lactobacillus casei*, são importantes para a indústria alimentícia (Atobe, 2003) e também largamente utilizados como probióticos.

As bactérias lácticas compreendem vários gêneros que incluem um considerável número de espécies. Geralmente são bacilos gram-positivos, catalase negativos, que crescem sob condições de microaerofilia a anaerobiose estrita, não são esporulados e fermentam carboidratos, tendo como principal produto final o ácido láctico (Stiles & Holzapfel, 1997)

Na produção de alimentos probióticos deve-se fazer uma seleção adequada de linhagens que mantenham sua viabilidade durante elaboração e armazenamento, sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal, e confirmem propriedades tecnológicas adequadas a esse produto. (Komatsu, et al., 2008).

1.4 –Efeito dos probióticos na saúde

O uso de probióticos pela espécie humana tem sido principalmente o de adjunto dietético, para repor e/ou prevenir o desbalanceamento da microbiota intestinal. As principais espécies que têm sido empregadas para fins probióticos são bactérias do gênero *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* além de *Bifidobacterium* (Ferreira & Teshima, 2000).

Vários benefícios à saúde são atribuídos à ingestão de alimentos contendo probióticos, como por exemplo a redução do colesterol, produção de vitamina B, redução de patógenos intestinais, tratamento de diarreia, regularização da flora

intestinal e aumento da biodisponibilidade de nutrientes, alguns desses benefícios foram comprovados cientificamente e outros ainda necessitam de mais estudos em humanos (Cummins, 2009).

Segundo Ferreira & Teshima. (2000), as diarreias hospitalares têm aumentado nas últimas décadas, sendo que a grande causa é o emprego crescente de antibióticos de última geração, de amplo espectro de atuação. Estes antibióticos, além de eliminarem o agente etiológico para o qual a droga é direcionada, eliminam também micro-organismos benéficos, causando distúrbio da microbiota intestinal do hospedeiro. Como resultado, micro-organismos como *Clostridium difficile*, resistentes à maioria dos antibióticos, aumentam em número, e suas toxinas respondem pela maioria de diarreias hospitalares. *Enterococcus* e *Escherichia coli* são outros grupos microbianos que causam problemas devido à resistência adquirida. Os probióticos auxiliam no reequilíbrio da microbiota intestinal após consumo de antibióticos (Atobe, 2003).

Diversos estudos têm comprovado a ação benéfica dos probióticos como *Lactobacillus casei Shirota*, modula a flora intestinal, diminuindo a atividade enzimática fecal, tem efeito positivo sobre o câncer de bexiga e câncer cervical e não influencia no sistema imune de sujeitos saudáveis. *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) diminui a atividade enzimática fecal, reduz a diarreia associada a antibióticos em crianças, serve no tratamento e prevenção de rotavirus e diarreias agudas em crianças, auxilia no tratamento da diarreia recorrente causada por *Clostridium difficile*, modula a resposta imune, alivia os sintomas de dermatite atópica em jovens. *L. plantarum* DSM9843 (299v), modula a flora intestinal e incrementa a excreção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes. *L. reuteri* (BioGaia Biologics) diminui a diarreia causada por rotavirus em crianças, protege e dá boa tolerância em adultos HIV-positivos (Saarela *et al.* 2000).

Em estudos realizados com crianças que consumiram probióticos foi observado que *Bifidobacterium bifidum* ajuda a diminuir a incidência de diarreia aguda em crianças e que os lactobacilos encurtam ataques de diarreia por uma média de um dia, como esses ataques duram uma média de três a quatro dias esta é uma redução significativa, além disso esses probióticos também reduziram

a severidade da diarreia (Saavedra et al., 1994; Van Niel et al., 2002; Cummings, 2009).

Algumas cepas de lactobacilos mostraram a supressão de microorganismos patogênicos como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Serratia marcescens* (Drago et al., 1997; Granato et al., 2010).

A administração de probióticos para imunodeprimidos, pode ter um efeito positivo sobre a resposta imune, principalmente quando um ou mais probióticos são administrado em conjunto, como o caso de quando lactobacilos é administrado em conjunto com bifidobactérias (Cunningham-Rundle et al., 2000; Granato et al., 2010).

Estudos demonstram que o consumo de iogurte composto por suas bactérias tradicionais como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, sem adição de outras culturas promovem benefícios para a saúde, como efeitos benéficos sobre a digestão da lactose, redução da severidade e duração da diarreia aguda ou prevenção de doenças alérgicas, sendo assim essas culturas podem ser consideradas como probióticas, porém devem existir mais comprovações de quais culturas apresentam esses efeitos (Guarner et al., 2005).

1.5 – Prebióticos

O prebiótico foi originalmente definido como um ingrediente alimentar não digerível, que atua estimulando seletivamente o crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, podendo melhorar a saúde do hospedeiro (Gibson & Roberfroid, 1995, Fooks *et al.*, 1999, Knorr, 1998). Atualmente existe uma definição mais abrangente, publicada no relatório do Encontro técnico da FAO sobre Prebióticos, como sendo um componente alimentar não viável que confere benefícios à saúde do hospedeiro associados com a modulação da sua microbiota (Pineiro et al., 2008).

O critério para classificação dos prebióticos como ingredientes alimentares, inclui: não deve ser hidrolisado na parte superior do trato gastrintestinal e nem ser absorvido; fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no cólon;

alteração na composição da microflora do cólon a favor de uma composição mais saudável; induzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (Fooks et. al. 1999).

Os prebióticos mais comumente utilizados incluem inulina, fruto-oligossacarídeos, gluco-oligossacarídeos, Isomalto-oligossacarídeos, oligossacarídeos da soja, xilo-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos e lactulose (Pineiro, 2008). Alguns alimentos possuem naturalmente substâncias prebióticas como alho-poró, almeirão, aspargo, banana, alcachofra, alho, cebola, soja, trigo e aveia (Williamsom, 2009).

Nos últimos anos houve um rápido aumento no uso de prebióticos como alimentos funcionais e novos produtos estão sendo desenvolvidos a todo tempo, sendo adicionados a produtos como suplementos, produtos lácteos, pães e bebidas (Williamsom, 2009).

Os prebióticos aumentam seletivamente o crescimento de bactérias benéficas como os lactobacilos e as bifidobactérias, em detrimento a outros tipos de bactérias que poderiam ser potencialmente nocivas (Williamsom, 2009).

Estudos foram realizados utilizando humanos demonstrando que o consumo regular de alimentos prebióticos resultam em mudanças estatisticamente significativas na composição da microbiota do intestino, ocasionando uma ampla gama de benefícios à saúde como o aumento das bifidobactérias na nutrição infantil, reduzindo o risco de infecções e sintomas alérgicos, melhora do quadro clínico e bem estar dos pacientes com doenças intestinais inflamatórias, redução da incidência de tumores e cânceres e aumento da absorção de cálcio (Roberfroid, 2007).

A soja contém prebióticos como rafinose e estaquiose que são promotores naturais do crescimento de bifidobactérias (Tamime, et al.,1995). Os produtos da soja vêm sendo avaliados como veículos para probióticos, e em estudos recentes têm indicado uma série de benefícios para a saúde, os efeitos sinérgicos entre os probióticos e produtos da soja sugerem que essa combinação pode exercer efeitos vantajosos e aumentar valores terapêuticos (woo et al., 2009).

1.6 – Fruto-oligossacarídeos – FOS

Os fruto-oligossacarídeos – FOS são oligossacarídeos de ocorrência natural, principalmente em produtos de origem vegetal (Hartemink et al., 1997, Passos & Park, 2003), mas as concentrações presentes são baixas, exigindo um consumo muito elevado para a obtenção dos efeitos fisiológicos desejados. São formados por uma molécula de sacarose, com uma, duas ou três unidades de frutose unidas, mediante ligações β -(1-2) à molécula de sacarose (Ferreira & Teshima, 2000).

Podem ser divididos em dois grupos do ponto de vista comercial: o grupo que é preparado por hidrólise enzimática de inulina e o que é preparado por reação enzimática de transfrutossilacção a partir de sacarose (Passos & Park, 2003).

Os FOS são conhecidos como prebióticos, desde que promovem o crescimento de probióticos, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação de FOS na dieta, intensifica a viabilidade e adesão dos probióticos e ao mesmo tempo inibem algumas bactérias patogênicas (Yamashita et al., 1984, Passos & Park, 2003). Podem ser utilizados em formulações de diversos alimentos como: sorvetes, sobremesas lácteas, biscoitos, produtos de panificação como substitutos de carboidratos e no desenvolvimento de produtos com teor reduzido de açúcar (Passos & Park, 2003).

Os efeitos benéficos da ingestão de FOS têm sido comprovados por diversos estudos. Esses açúcares não convencionais foram classificados como assistentes dos micro-organismos benéficos presentes no trato intestinal, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*. Eles melhoram o metabolismo das bifidobactérias e diminuem o pH no intestino grosso, inibindo bactérias putrefativas. A ingestão diária desses carboidratos pode resultar num aumento de bifidobactérias no trato intestinal (Hartemink et al., 1997, Passos & Park, 2003).

1.7 – Simbióticos

Alimentos simbióticos são aqueles que possuem em sua composição bactéria probiótica (lactobacilo e/ou bifidobactéria) e ingredientes prebióticos (Roberfroid *et al.*, 1998). É importante no desenvolvimento de alimento simbiótico a seleção de linhagens de micro-organismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (Ferreira & Teshima, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados para obtenção de produtos que se apresentem como simbiótico, utilizando diferentes tipos de probióticos e prebióticos. Para produtos derivados de soja, foi verificado que a mistura *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus* e *B. longum* em presença de FOS após 20 horas de fermentação, atingiu uma população de 10^{10} UFC/mL, sendo a máxima contagem para *B. longum*. Os probióticos *B. longum* e *L. paracasei* puros e *L. acidophilus* em misturas, aproveitam bem os nutrientes da soja, ainda mais quando se associam lactobacilos com bifidobactérias, gerando relações simbióticas, como a disponibilidade de proteínas e a redução da acidez do meio por *L. acidophilus*, e a disponibilidade de açúcares pelas bifidobactérias devido à atividade da enzima β -galactosidase, fortalecendo o crescimento de *L. acidophilus* (Mondragón-Bernal, 2004).

Os probióticos isolados ou em misturas consomem os mono, di e oligossacarídeos provenientes tanto da soja como os FOS adicionados, produzindo principalmente ácido láctico com leve produção do ácido acético. Sensorialmente isto é benéfico, tanto pela diminuição do flavor original da soja, quanto pela melhora na digestibilidade (Mondragón-Bernal, 2004, Hou *et al.*, 2000).

1.8 – Extrato Hidrossolúvel de Soja

Segundo Zangelmi & Tagliolatto (1982), é de conhecimento geral que as proteínas de origem animal são de melhor qualidade pelo balanço de aminoácidos essenciais. A proteína de soja é muito parecida à proteína de origem animal e

supera as outras do reino vegetal, sendo uma alternativa de consumo para pessoas que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela ingestão de leite materno ou leite bovino.

A presença de inibidores de proteases na soja pode diminuir a digestibilidade protéica, porém o binômio tempo x temperatura empregado na preparação do extrato hidrossolúvel de soja, destrói quantidades suficientes a esses inibidores, não prejudicando o desempenho nutricional do produto (Monteiro & Martino, 2006).

O consumo de soja tem sido associado a vários efeitos que melhoram a saúde, mediados por seus componentes bioativos, como as isoflavonas que são substâncias, envolvidas em atividades anti-carcinogênicas, na redução de perda de massa óssea e na diminuição do colesterol do sangue (Góes-Favoni, 2004). No entanto alguns desses componentes bioativos só podem trazer benefícios à saúde na bioconversão por micro-organismos gastrointestinais, o que leva a um interesse crescente de avaliar as possibilidades de utilização de probióticos para melhorar a atividade biológica de alimentos a base de soja (Woo et. al., 2009).

Apesar de todas as características benéficas da soja, o consumo do extrato hidrossolúvel de soja ainda encontra rejeição, devido ao sabor e aroma desagradáveis gerados pela ação de enzimas presentes nos grãos que atuam sobre os ácidos graxos polinsaturados conferindo um sabor desagradável que lembra feijão cru (Behrens, 2002). Essa característica da soja pode ser alterada utilizando-se diferentes processos tecnológicos que melhoram o sabor, como a fermentação, extensivamente empregada para desenvolver vários produtos. Um exemplo é a fermentação do extrato de soja por *L. acidophilus* e *L. casei*, que contribui na melhoria não somente do sabor, mas também do aroma do produto. Esses micro-organismos principalmente *L. casei*, possuem atividade proteolítica que é responsável pela formação de precursores do aroma e sabor, contribuindo para a eliminação do sabor desagradável. (Chou & Hou, 2000). A fermentação pode ser realizada também pelas bifidobactérias, pois a soja possui fatores bifidogênicos, como os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, assim, como outros açúcares (sacarose, frutose, glicose, galactose), vitaminas do complexo B e

fontes de nitrogênio das proteínas, sendo um ótimo substrato para seu crescimento (Chou *et al*, 2000, Hou *et al*, 2000, Tamime *et al*,1995).

Mondragón-Bernal (2004), estudou o desenvolvimento de algumas espécies de probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) em cultura pura e em mistura, em extrato hidrossolúvel desengordurado de soja, com e sem adição de fruto-oligossacarídeos e avaliou o processo e formulação da bebida, verificando que as culturas puras de *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *B. longum* têm ótimo crescimento em extrato hidrossolúvel de soja, sendo um excelente meio para cultivo de probióticos. Posteriormente Mondregón-Bernal (2009), avaliou o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* como cultura pura e em mistura com os probióticos anteriormente estudados, em extrato hidrossolúvel de soja com e sem adição de sacarose, observando que o crescimento do inóculo puro de *Lactobacillus rhamnosus* em extrato hidrossolúvel de soja foi fraco, atingindo no máximo de 7,65 log UFC/mL, já em meio contendo a sacarose e o mix de probióticos, além de aumentar a contagem total dos probióticos alcançando mais que 9 log UFC/mL em 16 horas, favorece a estabilidade do produto em relação a sinérese e comportamento reológico, além de melhorar as características funcionais pela presença de uma nova linhagem probiótica.

Para aumentar o consumo de soja, além de investir em processos tecnológicos, é necessário que os consumidores tenham maior acesso as informações sobre a qualidade nutricional do produto e seus efeitos benéficos para saúde, no sentido de estimular a compra e o hábito de consumo pela população no geral (Benadi *et. al.*, 2007).

1.9 – Aceitação Sensorial de Soja

A aceitação sensorial da soja pode ser melhorada de diversas formas, adicionando-se polpa de fruta, como morango que possui boa aceitação de sabor, além de apresentar melhora nas características de cor e viscosidade do produto (Branco, 2007). Aplicação de processos como fermentação e desodorização do

extrato hidrossolúvel de soja também podem ser utilizados para melhorar as características sensoriais do produto (Moraes et. al., 2006).

Behrens (2002) estudou a aceitação a partir de um Mapa Interno de Preferência, para bebidas de soja em diferentes sabores fermentadas com *L. casei* ou *L. acidophilus* ou uma mistura comercial contendo *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*, suplementadas com sacarose e lactose. A mistura adicionada com sacarose obteve os melhores resultados em termos de aceitação. Ainda nesse estudo o autor verificou que as alegações de caráter nutricional e de saúde geraram alta expectativa e intenção de compra entre os consumidores, concluindo que é possível melhorar a qualidade sensorial da soja, e que as propriedades nutricionais e de saúde podem ser utilizadas na promoção do novo produto aumentando o potencial de seu sucesso no mercado consumidor.

Mondragón-Bernal (2010), avaliou sensorialmente bebida simbiótica fermentada a base de soja no sabor “leite condensado” tendo boa aceitação, principalmente amostras formuladas com maior concentração de sacarose (maior ou igual a 12%). Grande porcentagem dos provadores apresentaram intenção de compra, observando que a otimização da composição da bebida em relação à sacarose e aromatizantes leva a uma maior aceitação sensorial do produto e intenção de compra pelo público alvo.

1.10 – Vida-de-Prateleira

Segundo Moura & Germer (2004), muitas são as reações de transformação dos alimentos processados em suas vidas úteis. Mesmo tendo a deterioração microbiana sob controle; outras reações, tais como alterações de cor, sabor, textura, qualidade nutricional e funcional podem comprometer o alimento. Os fatores que influenciam a velocidade das reações de transformação são vários: temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor de oxigênio, estado da matriz sólida, presença de catalisadores e outros. Além disso, os alimentos, por advirem de material biológico, são sistemas extremamente complexos, nos quais as diversas reações de deterioração acontecem simultaneamente, com diferentes cinéticas, dificultando a previsão da vida-de-prateleira.

Segundo Teixeira-Neto & Moura (apud Moura & Germer, 2004), durante a formulação dos produtos alimentícios, em muitos casos, são agregadas substâncias químicas que visam o controle das reações de deterioração, além de outras que buscam conferir características funcionais a esses alimentos, ou mesmo melhorar o seu conteúdo nutricional. Do ponto de vista de conservação dos alimentos, esses aditivos são muito importantes e devem ser sempre considerados na avaliação da vida-de-prateleira dos produtos, sendo valiosos na otimização dos resultados pretendidos e na extensão do *shelf-life*.

A manutenção da funcionalidade dos probióticos está relacionada a diversos fatores tanto no processo de produção como no período de estocagem. É importante que as cepas probióticas utilizadas sejam compatíveis com as culturas do ácido láctico convencionalmente utilizada no processamento de produtos lácteos, evitando problemas como inibição pelo ácido, peróxido, e outros metabólitos que podem afetar o processo diminuindo o rendimento e a qualidade do produto final (Saccaro et al., 2009, Collado et al., 2007).

Os baixos valores de pH que as bactérias probióticas são submetidas durante o processamento e armazenamento de produtos lácteos, como iogurtes e leite fermentados também requer atenção, geralmente essas bactérias possuem pH ótimo de crescimento entre 5 e 9. A embalagem é outro ponto importante no que diz respeito a produtos lácteos probióticos. Sabe-se que as bactérias probióticas preferem um ambiente anaeróbico ou de microaerofilia, assim, a exposição de tais micro-organismos ao oxigênio em uma embalagem pode resultar em menor viabilidade (Talwalkar & Kailasapathy 2004).

Outro inconveniente relacionado com a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento é o estresse causado pelo frio. As baixas temperaturas reduzem a fluidez da membrana, prejudica as funções do DNA e RNA relacionadas com a transcrição e de tradução e redução da atividade enzimática (Corcoran et al., 2007).

A utilização de métodos e materiais de embalagem adequados é importante para garantir que o produto atenda às expectativas das pessoas que os consomem, garantindo a preservação do potencial terapêutico dos probióticos durante toda vida útil de armazenamento (Granato et al., 2010).

Tipicamente, os alimentos são misturas multicomponentes que contém proteínas e polissacarídeos. As interações entre proteínas e polissacarídeos desempenham um papel importante na estrutura e estabilidade de alimentos processados. O controle ou manipulação dessas interações macromoleculares é um fator chave no desenvolvimento de produtos e processos alimentícios (Ye, 2008).

Durante o processo de fabricação, as interações entre esses biopolímeros, tanto quanto interações competitivas com outros componentes do sistema (água, lipídeos, açúcares, íons de metais, surfactantes, etc.) são determinantes na relação entre a estrutura e as propriedades dos alimentos (Ye, 2008). Dado o meio aquoso apropriado e as condições de processo, a maioria das proteínas e polissacarídeos podem ser utilizados para conferir propriedades espessantes e/ou gelificantes quando presentes em concentrações suficientemente altas (Dickinson, 1998).

Dois tipos de parâmetros influenciam as interações entre polissacarídeos e proteínas: parâmetros químicos, que incluem pH, massa molecular, força iônica, concentração de polímeros, e razão entre os polímeros e os parâmetros físicos e mecânicos como temperatura e condições de cisalhamento (Magnin & Dumitriu, 2005). O pH desempenha um papel importante nas interações proteína-polissacarídeo por causa da sua influência no grau de ionização dos grupos funcionais carregados dos biopolímeros. A formação de complexos entre esses polímeros ocorre em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas. (Ye, 2008).

Mondragón-Bernal (2009), estudou a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja com diferentes formulações e observou que a sacarose e o extrato hidrossolúvel de soja foram as variáveis com efeito mais significativo positivo sobre a estabilidade do produto em relação a sinérese, viabilidade da população probiótica e características reológicas, dando mais estabilidade ao produto no período de estocagem. Ainda nesse estudo o autor observou que o produto simbiótico com sacarose favorece a viabilidade da bifidobactéria e apresenta comportamento reológico de fluido do tipo Herchel-Bulkley, e que o pH em torno de 4 melhora a viscosidade aparente e características sensoriais do produto,

observou também que as contagens dos probióticos mantiveram-se em ótimas concentrações (maior que 7 log UFC/mL) garantido a funcionalidade do produto durante a vida-de-prateleira.

1.11 – Propriedades reológicas de alimentos

A Reologia pode ser vista como a ciência da deformação e do escoamento da matéria, ou seja, é o estudo da maneira, segundo a qual os materiais respondem à aplicação de uma determinada tensão ou deformação. (Steffe, 1996).

O estudo das propriedades reológicas dos alimentos, é essencial para várias aplicações que incluem desde os projetos e avaliação de processos até o controle de qualidade (Rao & Kenny, 1977, Rao, 1986; Toneli et al., 2005),

Segundo Steffe (1996) podem-se destacar diversas áreas na indústria de alimentos que o conhecimento dos dados reológicos é essencial dentre eles estão à determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos; controle intermediário ou final da qualidade de produtos; testes de tempo de prateleira, avaliação da textura de alimentos e correlação com testes sensoriais, análise de equações reológicas de estado.

O estudo da deformação em fluidos pode ser realizado submetendo-os a uma deformação contínua, a uma taxa constante. Essa condição pode ser idealizada com a utilização de duas placas paralelas com o fluido colocado no espaço entre elas. O prato inferior é fixo e o superior se move a uma velocidade constante. O escoamento de cisalhamento simples, também, pode ser chamado de escoamento viscométrico, inclui o escoamento axial em uma tubulação, o escoamento rotacional entre cilindros concêntricos, o escoamento rotacional entre cone e placa e o escoamento rotacional entre placas paralelas (Toneli et al., 2005).

Os fluidos podem ser classificados quanto a relação entre taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, em fluidos newtoniano a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional a taxa de deformação e a resistência que o fluido oferece ao escoamento é caracterizado como a viscosidade. Os fluidos

newtonianos, por definição, possuem uma relação, estritamente, linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, com a linha passando pela origem, e o coeficiente é a viscosidade, como é o caso de líquidos puros, soluções verdadeiras diluídas e poucos sistemas coloidais (Pasquel, 1999; Steefe, 1996, Toneli et al., 2005).

Todos os fluidos que não possuem a relação entre taxa de deformação e a tensão de cisalhamento constante podem ser chamados de não newtoniano, sendo o coeficiente de viscosidade para esses fluidos são chamados de viscosidade aparente, que é dependente da taxa de deformação, uma das possíveis características de fluidos não-newtonianos é a existência de uma tensão residual que é uma tensão finita necessária para que o fluido comece a escoar, é um conceito prático e muito importante na determinação das condições de processo e na análise de qualidade de produtos como manteiga e iogurte (Pasquel, 1999; Steefe, 1996, Toneli et al., 2005).

Os fluidos não-newtonianos podem ser divididos em viscoelásticos (propriedades de fluidos e de sólidos simultaneamente) e inelástico que podem ser classificados como dependentes (Tixotrópico ou Reopético) ou independentes do tempo (Pseudoplástico, Dilatante, Plástico de Bingham e Herschel-Bulkley) (Toneli et al., 2005). Fluidos com comportamento reológico independente do tempo, sob condições de temperatura e composição constantes, apresentam viscosidade aparente dependente somente da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento. Para o caso de fluidos com comportamento dependente do tempo, a viscosidade aparente, também, depende da duração dessa taxa de deformação (Rao & Kenny, 1977, Rao, 1986; Toneli et al., 2005). Dos fluídos independentes do tempo os Pseudoplásticos e Dilatantes não necessitam de uma tensão inicial de cisalhamento para começar a escoar, já os Plástico de Bingham e Herschel-Bulkley, necessitam de uma tensão inicial para começar a escoar, sendo que o Plástico de Bingham tem uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação.

Referência Bibliográfica

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Resolução RDC No. nº 18, de 30 de abril de 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde.** Resolução RDC No. 2, 7 de janeiro de 2002.

ATOBÉ, J. H.; **Efeito do leite fermentado contendo Lactobacillus casei Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana.** São Paulo, 2003. Tese (Doutor em farmácia) Universidade de São Paulo.

BEHRENS, J. H. **Aceitação, atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja (Glycine Max L-Merril).** Campinas, 2002. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

BENADI, R., MIGUEL, D. P., CHAVES I. R., JUNG, E. B., OLIVEIRA, P. F., GUAGLIANONI, D. G., ROSSI, E. A. consumo de soja e seus produtos derivados na cidade de araraquara-sp: um estudo de caso. **Alim. Nutr.** v. 18, n. 1, p. 27-34, 2007.

BLEIEL, J. Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? **International Dairy Journal.** v. 20, p. 303-306, 2010.

BRANCO, I. G., TEIXEIRA, A. M., RIGO, M., BEZERRA, J. R. M. V., COUTINHO, M. R., ARGANDONA, E. J. S., BASTOS, R. G. Avaliação da aceitabilidade sensorial de uma bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja, polpa de

morango e sacarose. **Revista Ciências Exatas e Naturais**. v. 9, n. 1, p. 129-141, 2007.

CHOU, C., HOU, J. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 56, p. 113-121. 2000.

COLLADO M. C., MERILUOTO J., SALMINEN S. Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus? **J. Dairy Sci**. v. 90, p. 2170–2176. 2007.

CORCORAN B. M., STANTON C., FITZGERALD G., ROSS R. P. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. **Curr. Pharm. Des**. v. 14, p. 1382–1399, 2007.

CUMMINGS , J. H. Probiotics: better health from ‘good’ bacteria? **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin** v.34, p. 198–202, 2009.

CUNNINGHAM-RUNDLES S., AHRNE S., BENGMARK S., JOHANN-LIANG R., MARSHALL F., METAKIS L., CALIFANO C., DUNN A. M. Probiotics and immune response. **Am. J. Gastroenterol**. v. 95, p. S22–S25 2000.

DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Food Science & Technology**, v.9, p.347-354, 1998.

DRAGO L, GISMONDO M. R., LOMBARDI A., HAEN C., GOZZONI L. Inhibition of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin. **FEMS Microbiol Letters**. v. 153, p. 455–463, 1997.

(FAO/WHO) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **Health and nutritional properties of probiotics in food**

including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba. 34 p. 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acessado em: janeiro de 2011.

FERREIRA, C. L.L., TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** ano III –n. 16 – set./out. p. 22-25, 2000.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy journal.** v.9, p.53-61, 1999.

GIBSON, G. R., & ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition,** v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIMENEZ P., M. A. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pósacidificação de iogurtes.** Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 86 p.

GOES-FAVONI, S. P.; BELEIA, A. P.; CARRAO-PANIZZI, M. C.;MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 24, n. 4, 2004.

GRANATO, D., BRANCO G. F., A. G., CRUZ, A. G., FARIA, J. A. F., NAZARRO, F. Functional foods and Nondairy probiotic product development: Trends and ponts, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** v. 9, p. 292-302, 2010.

GRANATO D., BRANCO G. F., CRUZ A. G., FARIA J. A. F., SHAH N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** v. 9, p. 455-470, 2010.

GUARNER1 F., PERDIGON G., CORTIER G., SALMINEN S., KOLETZKO B., MORELLI L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**. v. 93, p. 783-786, 2005.

GUARNER F., SCHAAFSMA G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v.39, p. 237-238, 1988.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**. v.383, p.367-374, 1997.

HOU, J-W., YU,R-C.,CHOU,C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**. v.33. p. 393-397, 2000.

KNORR, Dietrich. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

MAGNIN, F. & DUMITRIU, S. Interactions between polysaccharides and polypeptides. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides: Structures Diversity & Functional Diversity**. 2ed, New York: Marcel Dekker, 2005, capítulo 12.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes prebióticos e probióticos**. Campinas, 2004. Dissertação(Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja**. Campinas, 2009. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L., RODRIGUES M. I., BOLINI H. M. A., MAUGERI, F. Optimization of synbiotic fermented food from hydrosoluble soy extract applying experimental design and sensory analysis techniques. **Journal of Sensory Studies** . v. 25 p. 371-389, 2010.

MONTEIRO, M. R. P., MARTINO, H. S. D. Avaliação nutricional e sensorial do extrato hidrossolúvel de soja. **Rev. Min. Enf.** v. 10, n. 2, p. 113-117, 2006.

MORAES, R. M., HAJ-ISA, N. M. A., ALMEIDA, T. C. A., MORETI R. H. Efeito da desodorização nas características sensoriais de extratos hidrossolúveis de soja obtidos por diferentes processos tecnológicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n. 1, p. 46-51, 2006.

MOURA, S. C. S. R., GERMER, S. P. M. **Reações de Transformação e Vida-de-Prateleira de Alimentos processados** - Manual Técnico No. 6. Terceira edição. Campinas: ITAL, 2004, 92 p.

PASQUEL, A. Gomas: Utilização e aspectos reológicos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v.33, n.1, p.86-97, 1999.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicação na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**. v. 33, n.2, p. 385-390. 2003.

PINEIRO M., ASP, N. G., REID G., MACFARLANE, S., MORELLI, L., BRUNSER, O., TUOHY, K. FAO technical meeting on prebiotics. **J. Clin. Gastroenterol.** v. 42, p. s156-s159, 2008.

RANADHEERA, R. D. C. S., BAINES, S. K., ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International** v.43, p. 1-7, 2010.

RAO, M. A; KENNY, J. F. Flow properties of selected food gums. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal** . v. 8, n.3, p. 142-148, 1975.

RAO, M. A.; RIZVI, S. S. H. **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker, 1986, p. 398

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-10, 2002.

ROBERFROID M., GIBSON G. R., HOYLES L., MCCARTNEY A. L., RASTALL R., ROWLAND I., WOLVERS D., WATZL B., SZAJEWSKA H. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**. v. 104, p. S1-S63, 2010.

ROBERFROID, M.B., VAN LOO, J. A. E., GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of Chicory and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**. v.128, p. 11-19, 1998.

SAARELA, M; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v. 84, p. 197-215, 2000.

SAAVEDRA J. M. , BAUMAN NA, OUNG I. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **The Lancet**. v. 344, p. 1046–1049 1994.

SACCARO D. M., TAMINE A. Y., PILLEGGI A., OLIVEIRA M. N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. **Int. J. Dairy Technol**. v. 62, p. 397–404, 2009.

SANDERS M. E. Overview of Functional Foods : Emphasis on Probiotic Bacteria. **Int. Dairy Journal.** v. 8, p. 341 – 347, 1998.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefit. **International Dairy Journal.** v. 17 p. 1262-1277 (2007).

SIRÓ, I., KÁPOLNA, B. LUGASI, A. 2008. Funcional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite.** v. 51, p. 456-467, 2008.

STANTON C, GARDINER G., MEEHAN H., COLLINS K., FITZGERALD G., LYNCH P. B., ROSS R. P. Market potential for probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 73, p. 476-483, 2001.

STEEFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering.** Freeman Press, East Lansing, 1996, p. 412

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.36, p.1-29, 1997.

TALWALKAR A. I., KAILASAPATHY K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Curr. Issues. Intest. Microbiol.** v. 5, p.1–8, 2004.

TAMIME, A., MARSHALL, V. ROBINSON, R.. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research.** v. 62 p. 151-187, 1995.

TONELI J. T. C. L., MURR F. E. PARK X. K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.** v.7, n. 2, p. 181-204, 2005.

VAN NIEL C. W., FEUDTNER C., GARRISON M. M. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. **Paediatrics**. v. 109, p. 678–684, 2002.

WILLIAMSOM, C. Functional foods: What are the benefits? **British Journal of Community Nursing**. v. 14, p. 230-236, 2009.

WOO, Y. P., FUNG, W. Y., EASA, A. M., LIONG, M. T. Probiotic-fermented soyfoods: benefits and enhanced bioactivities. **Acta Alimentaria**. v. 38, n. 3, p. 381-391, 2009.

YE, A. Complexation between Milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p. 406-415, 2008.

YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**. v.4, p. 961-966, 1984.

ZANGELMI, A.B.C., TAGLIOLATTO, M.A. (1982). **Produtos de soja, leite, farinha e outros: Serie Tecnologia Agroindustrial**. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coord. da indústria e comércio.1982. p 97-132.

Capítulo 2

2. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA

CAPÍTULO 2. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA

RESUMO

Existe atualmente grande interesse do consumidor por alimentos que além de fornecerem a nutrição básica, tenham em sua composição compostos que contribuam para a saúde. O presente trabalho teve como objetivo estudar a fermentação de bebida simbiótica a base de soja, avaliando a influência das adições de extrato hidrossolúvel de soja, fruto-oligossacarídeos (FOS), *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, assim como da temperatura e observar alterações no produto pela adição de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As análises realizadas foram: pH, contagem de colônias, e determinação da velocidade específica de crescimento (μ_x) e variação da contagem de células (ΔX). A fermentação foi realizada em frascos sem agitação em estufa e a composição do meio e condições do processo foram definidas através do planejamento experimental tipo Plackett & Burman. O extrato hidrossolúvel de soja se apresentou como um bom substrato para produção da bebida, os FOS tiveram um melhor efeito em baixas concentrações, os probióticos ao final da fermentação apresentaram contagens acima de 10^6 UFC/mL atendendo aos requisitos legais e contribuíram para a obtenção de um produto com qualidade funcional. Temperaturas mais baixas foram melhores para o crescimento dos probióticos. A adição de sacarose provocou um menor consumo de FOS, enquanto que a presença de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* representou pouca variação no produto. Portanto para a produção da bebida fermentada pode-se utilizar o extrato hidrossolúvel de soja na maior concentração estudada (10%), os fruto-oligossacarídeos em torno de 3%, e a temperatura do processo deve ser mantida a 35°C, de acordo com os valores estudados.

Palavras chaves: bebida simbiótica, soja, fermentação, sacarose, Plackett & Burman.

2.1 INTRODUÇÃO

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, em meados de 1980, como alimentos similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal que demonstram além de suas funções básicas nutricionais benefícios fisiológicos e, ou reduzem o risco de doenças crônicas, conhecidos como Alimentos para Uso Específico de Saúde – Foods for Specified Health Use - (FOSHU) (Roberfroid, 2002). Assim, alimentos contendo probióticos e prebióticos são considerados funcionais.

Para que um produto funcional tenha sucesso entre os consumidores é importante que contenha descrições claras sobre os benefícios causados pelo seu consumo, não informando somente a presença de ingredientes benéficos, mas também o que eles ocasionam (Bleiel, 2010). A mensagem do efeito na saúde de um produto específico deve ser transmitida através de meios credíveis de uma maneira simples e de uma forma que possa ser facilmente alcançada pelos consumidores (Siró et al., 2008).

Na produção de alimentos probióticos deve-se fazer uma seleção adequada de cepas que mantenham sua viabilidade durante sua elaboração e armazenamento, sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal, e confirmem propriedades tecnológicas adequadas a esse produto. (Komatsu, et al., 2008).

O alimento simbiótico é aquele que proporciona a ação conjunta do probiótico e prebiótico. Na sua produção é importante a seleção de linhagens de micro-organismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (Ferreira & Teshima, 2000).

Estudos vêm sendo realizados para avaliar a produção de alimentos adicionados de prebióticos (Haully et. al. 2005), no qual os frutooligossacarídeos (FOS) são os mais utilizados, e de probióticos, sendo que as culturas mais estudadas são as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Cunha et. al., 2008; Donkor et. al., 2005; Farnworth et. al., 2007). Entretanto a maioria das pesquisas tem sido desenvolvidas para avaliar a adição em conjunto dos probióticos e prebióticos,

obtendo-se um produto final de melhor qualidade (Akalin et. al., 2007; Yeo & Liong 2010, Mondragón-Bernal, 2009).

O extrato hidrossolúvel de soja tem sido estudado para produção de bebida simbiótica e vem se apresentando como um excelente meio para o cultivo dos probióticos, porém as condições do processo devem ser otimizadas para não prejudicarem a qualidade do produto (Mondragón-Bernal, 2009).

Dessa forma, com base no exposto acima, o presente trabalho objetivou avaliar a fermentação da bebida simbiótica a base de soja, suplementada de fruto-oligossacarídeos e dos probióticos: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Assim como analisar o efeito da adição de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ao produto.

2.2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 - Material

2.2.1.1 – Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi a seguinte: Extrato hidrossolúvel de soja orgânico, (Provesol PSA Orgânico – Brasil), Antiespumante lecitina de soja (Doremus - Brasil) (grau alimentício), Fruto-oligossacarídeos (FOS) (Raftilose 95® da Orafiti – Bélgica) e Sacarose (Synth – Brasil).

2.2.1.2 – Culturas

Os micro-organismos utilizados (*Bifidobacterium longum* BL04, *Lactobacillus acidophilus* LAC4, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, *Lactobacillus rhamnosus* LR32, *Streptococcus thermophilus* TA40 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340), foram fornecidos pela Danisco liofilizados e em embalagens lacradas.

2.2.1.2.1 – Contagem dos micro-organismos liofilizados

Foi realizada a verificação da concentração de células dos envelopes dos micro-organismos liofilizados de acordo com metodologia proposta por Vinderola & Reinheimer (2000) e modificada por Mondragón-Bernal (2004). Os envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas e pesados 0,01 g dos micro-organismos, transferidos para tubos com água peptonada 0,1% e incubados a 37°C durante 30 minutos para ativação dos micro-organismos. Posteriormente, realizou-se diluição decimal e plaqueamento por profundidade em meio agar MRS, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, em anaerobiose e aerobiose, e posteriormente foi realizada a contagem e identificação das colônias.

2.2.1.2.2 – Avaliação da viabilidade celular dos probióticos após congelamento

Envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas, pesados e transferidos para tubos contendo extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v), incubados por 30 minutos em repouso, a 37°C, para ativação dos micro-organismos. Fez-se então diluição decimal em água peptonada e plaqueamento por profundidade em meio agar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, em anaerobiose e aerobiose e realizada a contagem das colônias. Após a diluição os tubos contendo os micro-organismos em extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v) foram congelados.

Depois de aproximadamente 24 horas de congelamento, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e realizada a diluição decimal e o plaqueamento conforme descrito anteriormente. Calculou-se a porcentagem de redução de colônias pelo congelamento através da contagem antes e depois de congelar as amostras. A redução da viabilidade de cada probiótico se encontra na Tabela 2.1.

Tabela 2. 1: Perda da viabilidade dos probióticos pelo congelamento.

Micro-organismos	Contagem antes de congelar (UFC/mL)	Contagem depois de congelar (UFC/mL)	Redução da viabilidade (%)
<i>L. acidophilus</i>	$9,1 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	63,7%
<i>L. paracasei</i>	$5,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	58,8%
<i>L. rhamnosus</i>	$3,3 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	18,2%
<i>B.longum</i>	$6,9 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^{10}$	37,7%

2.2.1.3 – Meio de Cultura

Ágar MRS (Oxoid - Inglaterra) adicionado de 0,01% azul de anilina.

2.2.2 – Metodologia

2.2.2.1 – Preparo do inóculo

No preparo do inóculo, os envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas, pesados e transferidos para frascos contendo extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v), incubados por 30 minutos em repouso, a 37°C, e posteriormente congelados (-18 °C). Para a fermentação o inóculo foi descongelado a temperatura ambiente e transferido para o meio a ser fermentado.

2.2.2.2 – Fermentação

A fermentação foi conduzida em tubos de 50 mL fechados contendo o meio a ser fermentado pasteurizado a 116°C por 4 minutos e resfriado rapidamente (Mondragón-Bernal 2004). A fermentação foi realizada até o pH do meio atingir valores próximo a 5, amostras foram coletadas periodicamente para análise de: pH, contagem dos probióticos, determinação de ácido acético e ácido láctico.

2.2.2.3 – Condições do processo

Primeiro foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis: concentração de inóculo, composição do meio e temperatura do processo sobre contagem dos probióticos e pH. Posteriormente, as variáveis

foram fixadas, e novos ensaios realizados com adição de sacarose e diferentes micro-organismos introduzidos.

O planejamento experimental adotado foi do tipo Plackett & Burman de 12 ensaios e três pontos centrais, com um total de 15 ensaios (Rodrigues & lemma, 2009), sendo 7 variáveis independentes: concentração do extrato hidrossolúvel de soja, concentração de fruto-oligossacarídeos, temperatura, contagem inicial de: *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *B.longum*. Na Tabela 2.2 estão apresentadas às condições dos ensaios com as variáveis codificadas e reais.

Tabela 2. 2: Matriz do delineamento do Plackett & Burman com valores reais entre parênteses.

Ensaio	Variáveis independentes						
	EHsoja (%)	FOS (%)	Temp. (°C)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	<i>B.longum</i> (UFC/mL)
1	1 (10)	-1 (3)	1 (40)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
2	1 (10)	1 (5)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
3	-1 (4)	1 (5)	1(40)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
4	1 (10)	-1 (3)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
5	1 (10)	1 (5)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
6	1 (10)	1 (5)	1 (40)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
7	-1 (4)	1 (5)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
8	-1 (4)	-1 (3)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
9	-1 (4)	-1 (3)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
10	1 (10)	-1 (3)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
11	-1 (4)	1 (5)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
12	-1 (4)	-1 (3)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
13	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)
14	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)
15	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental foram realizados outros ensaios variando a concentração de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Tabela 2.3), sendo realizados nas seguintes condições: temperatura 35°C, 10% (m/v) de extrato hidrossolúvel de

soja, 3% (m/v) de fruto-oligossacarídeos, $5,5 \times 10^6$ UFC/mL de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B.longum* e 1×10^6 UFC/mL de *L. paracasei*.

Tabela 2. 3: Concentração do inóculo e de sacarose utilizados para as fermentações do extrato hidrossolúvel de soja.

Ensaio	Sac. (%)	TA (UFC/mL)	LB (UFC/mL)
1	0	0	0
2	12	0	0
3	0	0	1×10^6
4	0	1×10^6	0
5	0	1×10^6	1×10^6
6	12	0	1×10^6
7	12	1×10^6	0
8	12	1×10^6	1×10^6

*Sac: sacarose, TA: *Streptococcus thermophilus*, LB: *Lactobacillus bulgaricus*.

2.2.2.4 – Metodologia Analítica

2.2.2.4.1 – Medição do pH

O pH das amostras foi medido em potenciômetro Mettler Toledo 320 pH Meter.

2.2.2.4.2 – Contagem de Colônias

Para contagem de probióticos, presentes na bebida simbiótica, alíquotas de 1 mL de amostra foram transferidos para tubos com 9 mL de água peptonada (0,1%), a partir dessa diluição foram feitas diluições subseqüentes necessárias à análise do produto. Das diluições adequadas realizou-se o plaqueamento em profundidade em meio Agar MRS com 0,01% azul de anilina, incubadas por 72h a 37°C em aerobiose e anaerobiose (Mondragón-Bernal, 2009).

2.2.2.4.3 – Análise de fruto-oligossacarídeos

Para a análise de fruto-oligossacarídeos fez-se a remoção de células e proteínas adicionando-se 0,01 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra que foram centrifugadas em centrífuga Sorval refrigerada a 9640 g por 10 min a 5 °C. O sobrenadante foi diluído em água deionizada e filtrado em filtros de 0,22 µm (Mondrágón-Bernal, 2004).

As amostras foram identificadas e quantificadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD), utilizando um sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EUA), que consiste de uma bomba gradiente GP50, um detector eletroquímico ED-40 operando na forma de pulso amperométrico (eletrodo de ouro e eletrodo de referência de Ag-AgCl). Os produtos foram analisados em uma coluna de troca aniônica CarboPac PA 100 (240 x 4 mm) e pré-coluna CarboPac PA100 (50 x 4 mm). A eluição foi realizada a 1 mL.min⁻¹ em uma solução de NaOH (100 mM) e um gradiente linear de NaOH 100 mM contendo acetato de sódio (0 - 500 mM). A curva padrão foi construída utilizando-se padrões de kestose, nistose e 1-frutosilnistose (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), glicose, frutose e sacarose (Merck). A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas, respectivamente, por meio do tempo de retenção (t_R) e padronização externa com a injeção de no mínimo 7 pontos em concentrações diferentes dos açúcares padrões de grau cromatográfico. (Aguiar-Oliveira, 2010).

2.2.2.4.4 – Análise de ácidos

Para a análise de ácidos acético e láctico, as amostras foram preparadas de acordo com metodologia proposta por Donkor et al. (2005) com algumas modificações. Foram adicionados 0,2 mL de ácido nítrico 15,5 M e 2 mL de água deionizada em 6 mL de amostras. A mistura foi centrifugada em centrífuga Nova Técnica a 785 g por 20 minutos para remoção de células e proteínas. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm, diluído e analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Usou-se um cromatógrafo a líquido Varian modelo 9010 com injetor automático, forno para coluna, bomba ternária e detectores UV-Vis e índice de refração conectados em série. A fase móvel consistiu em uma solução aquosa de ácido sulfúrico pH 2,60.

A eluição foi isocrática com vazão da fase móvel de 0,6 mL/min, em coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (BioRad) de 300 mm x 7,8 mm x 9 µm, e respectiva pré-coluna aquecidas a 35°C. A detecção dos compostos foi realizada por detector UV-Vis com comprimento de onda fixado em 204 nm (para a quantificação dos ácidos láctico e acético). O tempo total da análise foi de 20 minutos (Cruz et al., 2010).

2.2.2.4.5 – Cinética de crescimento microbiano

Foram determinadas a velocidade específica de crescimento e a variação do número de células. A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi calculada de acordo com a equação 1:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 1}$$

onde X= número de células. A variação do número de células (Δx) foi calculada pela diferença entre as contagens final e inicial. A velocidade específica de crescimento foi calculada para contagem total de probióticos e a variação do número de células para *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium longum*.

2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 – Planejamento experimental Plackett & Burman

Os resultados obtidos para as respostas analisadas durante a fermentação são apresentados na Tabela 2.4.

Pode-se observar que os valores de pH inicial variaram entre 6,0 e 6,5, diminuindo durante a fermentação, sendo que após 6 horas alguns ensaios apresentaram pH inferior a 5. Neste ponto os frascos começaram a serem congelados, pois pH próximo a 5 foi o critério utilizado para finalizar a fermentação, pois nessas condições as amostras já se apresentavam com consistência firme, devido a desnaturação das proteínas solúveis da soja e formação de coágulo, o que ocorreu em diferentes tempos para cada ensaio.

Tabela 2. 4: Resultados do planejamento Plackett & Burman.

Ensaio	pH						CTF (log UFC/mL)	μ_x (h ⁻¹)	Δx (log UFC/mL)	
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10h	CT	CT	LC	BL
1	6,5	6,4	6,2	5,7	5,0	-	8,65	0,45	0,70	1,73
2	6,5	6,4	6,3	6,0	5,6	5,1	8,32	0,30	0,60	0,09
3	6,0	5,8	5,3	4,8	-	-	7,40	-	-	-
4	6,5	6,4	6,0	5,2	4,9	-	8,22	0,26	0,71	1,31
5	6,2	6,0	5,9	5,6	5,2	4,8	8,36	0,28	0,50	0,64
6	6,1	5,9	5,4	4,9	-	-	7,96	0,20	0,55	-
7	6,5	6,3	5,9	5,0	-	-	7,25	0,20	0,59	0,73
8	6,0	5,7	5,1	4,5	-	-	7,88	0,07	0,03	0,45
9	6,0	5,9	5,8	5,4	5,0	-	8,03	0,26	0,35	0,10
10	6,2	6,1	5,9	5,7	5,5	5,1	8,29	0,40	0,83	0,18
11	6,5	6,4	6,4	6,1	5,7	5,1	7,50	0,07	0,43	0,09
12	6,5	6,5	6,4	6,2	5,7	5,1	7,77	0,40	1,10	-
13	6,3	6,2	5,9	5,5	4,9	-	8,24	0,48	0,62	0,73
14	6,2	6,1	5,8	5,3	5,1	-	7,89	0,04	0,19	0,42
15	6,2	6,1	5,7	5,2	5,1	-	8,01	0,10	0,41	0,71

*CTF: Contagem total final, μ_x : velocidade específica de crescimento, Δx : variação do número de células. CT: Contagem total, LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*.

Para contagem total dos probióticos todos os ensaios atingiram valores superiores ao mínimo exigidos pela legislação 10⁷ UFC/mL (Anvisa, 2002) ao final da fermentação, sendo o menor valor de 7,25 log UFC/mL. Em relação aos resultados obtidos para μ_x e Δx não foi possível calcular estes parâmetros para o ensaio 3, e para os ensaios 6 e 12 em relação aos *Bifidobacterium longum*, devido a variabilidade dos bioprocessos que envolvem micro-organismos, e ao fato da metodologia utilizada, para contagem de colônias, estar sujeita a variabilidades consideráveis, apesar das repetições realizadas, o que diminui muitas vezes a confiabilidade dos resultados. Isto pode ser constatado pelos valores obtidos nos pontos centrais (ensaios 13 a 15) que apresentaram grande variação.

Os resultados foram analisados pelo software STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., USA) e estão apresentados na Tabela 2.5 e 2.6.

Tabela 2. 5: Efeitos das variáveis sobre o pH durante fermentação de extrato hidrossolúvel de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.

Efeitos estimados para o pH				
Variáveis independentes	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas
R ²	0,9834	0,9796	0,9618	0,9255
Média	6,288	6,156	5,870	5,439
Curvatura	-0,082	-0,078	-0,113	-0,152
X1: EHsoja (%)	0,072	0,082	0,163	0,195
X2: FOS (%)	0,018	-0,008	-0,047	-0,032
X3: Temperatura (°C)	-0,035	-0,132	-0,470	-0,808
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	-0,015	-0,052	-0,117	-0,285
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	-0,405	-0,488	-0,627	-0,568
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	0,015	0,035	0,020	-0,045
X7: <i>B.longum</i> (UFC/mL)	0,018	0,025	0,023	0,015

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,10$).

Como pode ser observado na Tabela 2.5, as variáveis que apresentaram efeito significativo a 90% de confiança no valor do pH foram a concentração inicial de soja, *L. paracasei* e temperatura de fermentação. A soja apresentou efeito significativo positivo em todos os tempos de fermentação sobre o pH, o que era de se esperar, já que o extrato hidrossolúvel de soja possui um pH em torno 6,8 e é o principal constituinte da bebida. Assim, quanto maior sua concentração maior será o efeito tamponante exercido.

A temperatura influenciou no pH negativamente, ou seja, quanto maior a temperatura mais rapidamente cai o valor de pH, devido ao crescimento microbiano. Em relação à influência causada pelos micro-organismos, somente o *L. acidophilus* e *L. paracasei* influenciaram no pH, negativamente, sendo que para o *L. paracasei* essa influência ocorreu durante toda a fermentação. O mesmo não ocorreu em relação à influência causada por *L. acidophilus*, que foi somente no final. Este efeito negativo sobre o pH se deve ao fato que durante o crescimento dos micro-organismos probióticos há um consumo de açúcares, tanto da soja como de FOS, e produção de ácidos acético e láctico (Donkor et. al., 2007) causando queda do pH, sendo maior essa produção pelos probióticos *L. paracasei* e *L. acidophilus*.

No que concerne aos dados da Tabela 2.6, pode-se constatar que as concentrações iniciais de soja e FOS apresentaram efeito significativo sobre a contagem total final de células, porém para a soja esse efeito foi positivo, enquanto que para os FOS negativo.

Tabela 2. 6: Efeitos das variáveis sobre a contagem total final, μ_x e Δx durante fermentação do extrato hidrossolúvel de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.

Efeitos estimados para contagem total final, μ_x (h^{-1}) e Δx				
Variáveis independentes	CTF (log UFC/mL)	μ_x (h^{-1})	Δx (LC) (log UFC/mL)	Δx (BL) (log UFC/mL)
R ²	0,8984	0,5674	0,6552	0,6807
Média	7,968	0,229	0,407	0,478
Curvatura	0,155	-0,043	-0,163	-0,220
X1: EHsoja (%)	0,661	0,178	0,405	0,674
X2: FOS (%)	-0,341	-0,158	-0,394	-0,505
X3: Temperatura (°C)	-0,152	-0,115	0,496	-0,144
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	0,083	0,000	0,294	-0,243
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	0,031	-0,106	-0,451	-0,325
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	-0,189	0,010	-0,107	-0,148
X7: <i>B. longum</i> (UFC/mL)	0,035	0,033	0,458	0,012

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,10$). * CTF: Contagem total final, LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*.

Portanto, quanto maior a concentração de soja maior será a contagem final de células, na faixa de valores estudados neste trabalho. Em estudo desenvolvido por Mondragón-Bernal, (2004), foi avaliado o crescimento de probiótico em diferentes concentrações de extrato hidrossolúvel de soja, FOS, quantidade de inóculo, proporção dos probióticos e temperatura. Tanto os lactobacilos estudados (*L. acidophilus*, *L. paracasei*) como o *B. longum* apresentaram um bom crescimento em soja, pois ela possui uma variedade de substratos: sacarose, estaquiose, rafinose, glicose e frutose que podem ser utilizados pelas culturas, apresentando uma maior variedade em relação ao leite (Champagne et. al., 2009), apresentando um efeito significativo positivo sobre a contagem total de probióticos. A temperatura também apresentou efeito significativo, porém negativo, apresentando um melhor crescimento em torno de 37°C.

A adição de FOS, apesar de ser um substrato para os probióticos e ajudar no seu crescimento, não contribuiu para um aumento da população microbiana. Foi observado por outros autores que o uso de FOS pelos micro-organismos, acarreta uma maior produção de ácidos acético e láctico (Yeo & Liong, 2009; Yeo & Liong 2010) diminuindo mais rapidamente o valor do pH, e conseqüentemente diminuindo o crescimento microbiano. Altas concentrações de FOS podem interferir negativamente na contagem final de probióticos.

Ainda na Tabela 2.6, pode-se notar que as variáveis estudadas não interferiram significativamente nos resultados obtidos para μ_x e Δx de *Lactobacillus* spp. No resultado de Δx para o *B. longum*, a concentração de soja apresentou efeito positivo, e a concentração de FOS e *L. paracasei* com efeito negativo. Porém como já foi dito anteriormente esses resultados apresentam uma menor confiabilidade devido à variabilidade dos bioprocessos que envolvem micro-organismos, e ao fato da metodologia utilizada, para contagem de colônias, estar sujeita a variabilidades consideráveis, apesar das repetições realizadas.

Em ensaios realizados por Mondragón-Bernal (2004), foi avaliada a influência da concentração de soja extrato hidrossolúvel de soja e de outras variáveis no crescimento de *B. longum*, sendo uma variável significativa com efeito positivo no processo, o que está de acordo com sua capacidade de hidrolisar açúcares como rafinose e estaquiose presentes na soja devido a sua atividade α -galactosidase (Yeo & Liong, 2009). A concentração de *L. paracasei* interferiu negativamente na variação do crescimento de *B. longum*. Essa característica foi observada em estudo realizado por Mondragón-Bernal (2004), no qual culturas de *L. paracasei* e *B. longum* foram cultivadas juntas, sendo que o crescimento de *L. paracasei* foi favorecido, apresentando uma contagem final maior do que quando cresceu em monocultura.

Diante desses resultados, fixou-se a concentração de soja a 10% por apresentar efeito positivo sobre o pH e contagem total final, a concentração de FOS foi mantida no menor nível de 3% por apresentar efeito negativo na contagem total final em altas concentrações, além de ser um substrato com alto valor agregado. A concentração dos probióticos por não apresentar influência nas variáveis foram mantidas no ponto central ($5,5 \times 10^6$ UFC/mL) com exceção de *L.*

paracasei pela interferência na variação de *B. longum* foi mantido no menor nível (1×10^6 UFC/mL), e a temperatura selecionada foi de 35°C, pois temperaturas mais elevadas causam um menor crescimento dos probióticos.

2.3.2 – Efeito da sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* sobre a fermentação

Após a realização do experimento Plackett & Burman, as variáveis foram fixadas e os novos ensaios realizados nas seguintes condições: soja 10% (m/v), FOS 3% (m/v), temperatura de 35°C, concentração dos probióticos: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. longum* na concentração de $5,5 \times 10^6$ (UFC/mL) e *L. paracasei* na concentração de 1×10^6 (UFC/mL), com adição de sacarose 12% (m/v), *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, em alguns ensaios.

Foram calculados o consumo de FOS e de sacarose, queda do pH durante o processo e a contagem de unidade formadora de colônia ao final do processo.

A variação do pH durante a fermentação é apresentada na Tabela 2.7.

Tabela 2. 7: pH durante a fermentação para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja.

Ensaio	Condições dos ensaios			pH			
	Sacarose (%)	TA (UFC/mL)	LB (UFC/mL)	0 h	2 h	4 h	6 h
1	0	0	0	6,5	6,4	6,3	6,0
2	12	0	0	6,4	6,3	6,2	5,8
3	0	0	1×10^6	6,5	6,4	6,3	6,0
4	0	1×10^6	0	6,4	6,4	6,3	5,8
5	0	1×10^6	1×10^6	6,4	6,4	6,4	5,8
6	12	0	1×10^6	6,4	6,3	6,1	5,6
7	12	1×10^6	0	6,4	6,3	6,1	5,1
8	12	1×10^6	1×10^6	6,4	6,3	6,2	5,4

*TA: *Streptococcus thermophilus*, LB: *Lactobacillus bulgaricus*.

O valor do pH inicial não variou consideravelmente (6,4 – 6,5). Durante a fermentação os ensaios nos quais foram adicionados de sacarose apresentaram um decréscimo mais acentuado. Mondragón-Bernal (2009), realizou um estudo no qual foram avaliadas diferentes formulação de bebidas a base de soja com e sem adição de sacarose, sendo que as bebidas com sacarose apresentaram um menor valor de pH. O mesmo autor realizou um planejamento Plackett & Burman para avaliar diferentes variáveis na produção de bebida a base de soja, onde a sacarose era uma das variáveis e apresentou um efeito positivo sobre o produto quanto à estabilidade durante a vida-de-prateleira, proporcionando menores porcentagens de sinérese e maior viscosidade aparente, podendo ser utilizada na maior concentração estudada de 12% (m/v).

O decréscimo no valor de pH das amostras com sacarose (Ensaio 2, 6, 7 e 8) se deve ao aumento da produção de ácidos pelos micro-organismos, não implicando, no entanto, que a qualidade do produto final esteja comprometida, pois pode melhorar outras características do produto, como a aceitação sensorial e a sinérese (Mondragón-Bernal, 2009). Por outro lado, não houve grande variação do pH devido à adição das culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Ensaio 3, 4, 5,6,7 e 8).

Na Tabela 2.8 são apresentadas a contagem final dos micro-organismos e as concentrações iniciais e finais de FOS e sacarose.

O valor apresentado para os FOS corresponde à soma das concentrações de kestose, nistose e 1-frutosilnistose. O produto FOS comercial utilizado, é um hidrolisado de inulina, contendo oligossacarídeos de cadeia maior do que os acima descritos, e que não puderam ser quantificados pela falta dos respectivos padrões, o que pode ser observado na Figura 2.1, cromatograma do FOS puro, o que significa que os valores expressos na Tabela 2.8, não correspondem ao total real de FOS, mas sim uma quantia aproximada. As amostras possuem maior teor de FOS ao representado na tabela.

A metodologia utilizada (Aguiar-Oliveira, 2010), possibilita verificar se houve consumo de FOS.

Tabela 2. 8: Contagens de probióticos (log UFC/mL), concentrações de fruto-oligossacarídeo (FOS) e sacarose, e consumo de substratos (%), em fermentados de extrato de soja adicionados de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e sacarose.

Ensaio	Contagem final (log UFC/mL)			FOS (g/L)			sacarose (g/L)		
	LC	BL	CT	Inicial	Final	Consumo (%)	Inicial	Final	Consumo(%)
1	8,45	8,18	8,64	22,27	16,61	25,42	16,3 ³	7,55	53,68
2	8,30	8,08	8,50	27,88	21,37	23,35	98,6	94,32	4,34
3	8,34 ¹	7,71	8,43	20,04	16,50	17,66	15,16 ³	9,05	40,30
4	8,12	6,85 ²	8,14	20,52	17,20	16,18	14,33 ³	7,38	48,50
5	8,19 ¹	7,36 ²	8,25	24,97	15,59	37,57	13,66 ³	5,25	61,57
6	8,18 ¹	6,30	8,18	24,15	23,26	3,69	98,36	97,86	0,51
7	7,85	7,58 ²	8,03	26,14	21,33	18,40	101,6	92,61	8,85
8	7,92 ¹	7,30 ²	8,09	27,39	24,87	9,20	104,15	97,15	6,72

*LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*, CT: Contagem total ¹Incluí contagem de *Lactobacillus bulgaricus*, ²Incluí contagem de *Streptococcus thermophilus*, ³Ensaio sem adição de sacarose.

Assim, tanto a sacarose quanto os FOS são consumidos durante a fermentação, porém, de forma geral, os ensaios apresentaram uma diminuição no consumo de FOS quando sacarose foi adicionada, o que pode ser esperado, pois a sacarose é geralmente mais facilmente assimilada pelos micro-organismos do que os FOS. Ao final da fermentação, existe uma concentração de FOS no produto geralmente menor que no início, conforme mostrado na Figura 2.2 que apresenta o cromatograma do ensaio 1. Essa concentração final permite afirmar que o produto tem características prebióticas, mas não que é rico em fibra, pois para isso é necessário haver um mínimo de 3% de oligossacarídeos, que foi a quantidade inicial utilizada nesse trabalho. Portanto, para se ter um produto final com alegação de rico em fibra é necessário adicionar quantidades maiores que 3% de FOS, para compensar o consumo dos micro-organismos.

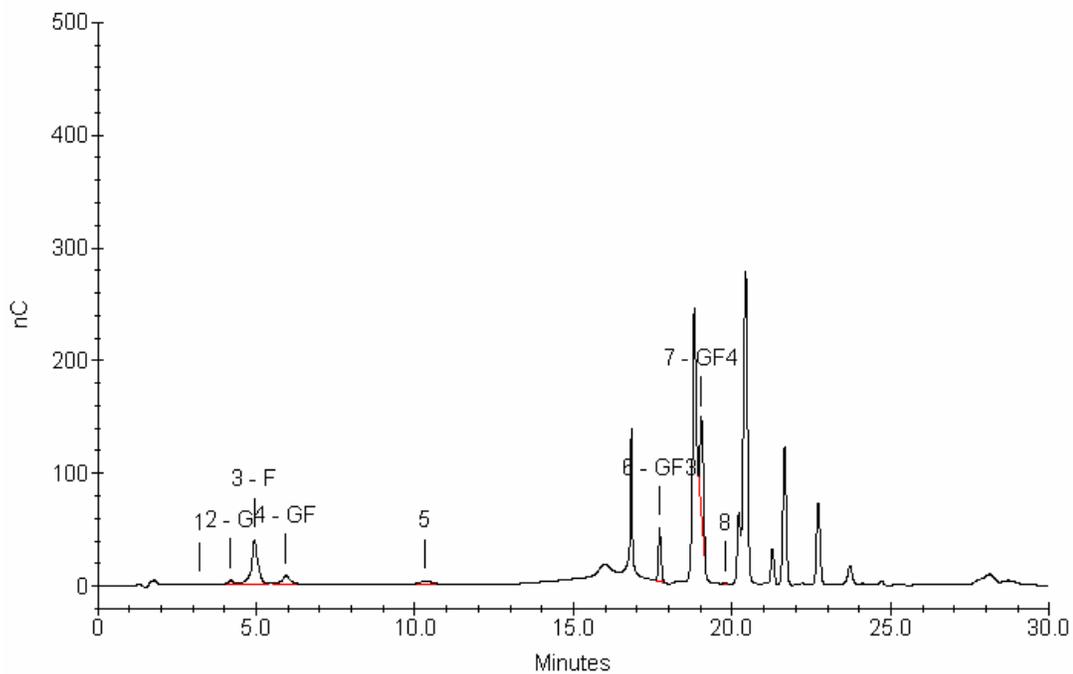


Figura 2. 1: Cromatograma de FOS 5% (m/v). G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutossilnistose).

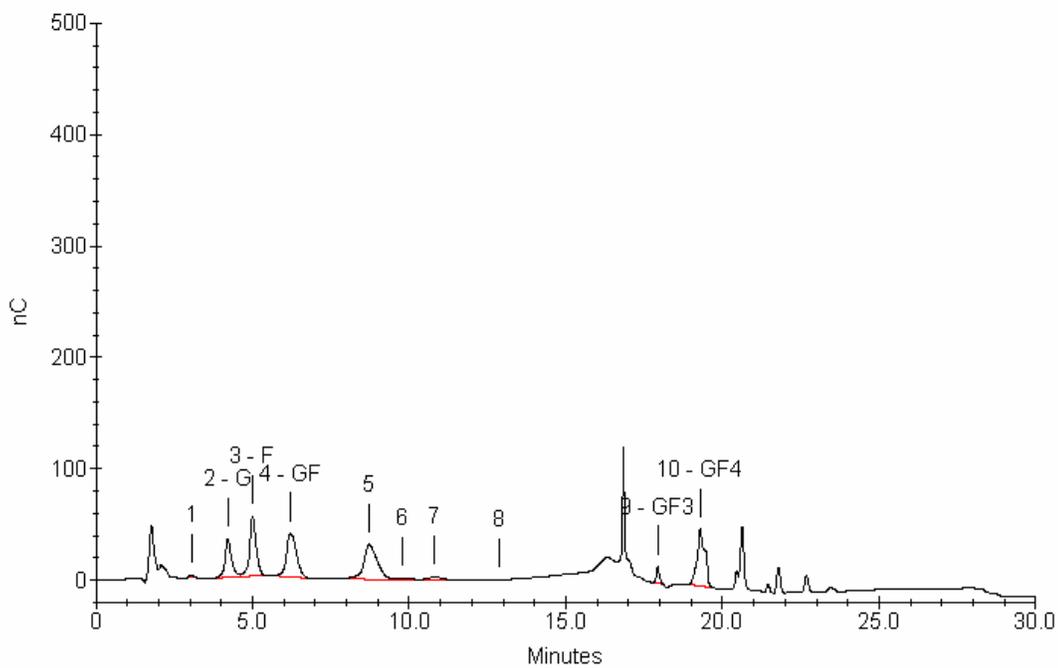


Figura 2. 2: Cromatograma da composição de açúcares do ensaio 1 da bebida simbiótica a base de soja ao final da fermentação. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutossilnistose).

A presença de sacarose (13 a 16 g/L) no início dos ensaios (1, 3, 4 e 5) nos quais não houve sua adição, se deve ao fato de a própria soja conter sacarose e outros açúcares como rafinose e estaquiose, que nos cromatogramas podem apresentar um pico no mesmo tempo de retenção da sacarose, e em grande parte são consumidos durante a fermentação. Isso é um fato positivo, pois esses dois últimos açúcares são responsáveis pelos fatores de flatulências que limitam o consumo da soja (HOU et. al, 2000). A composição da soja pode ser observada na Figura 2.3 que apresenta o cromatograma da soja pura.

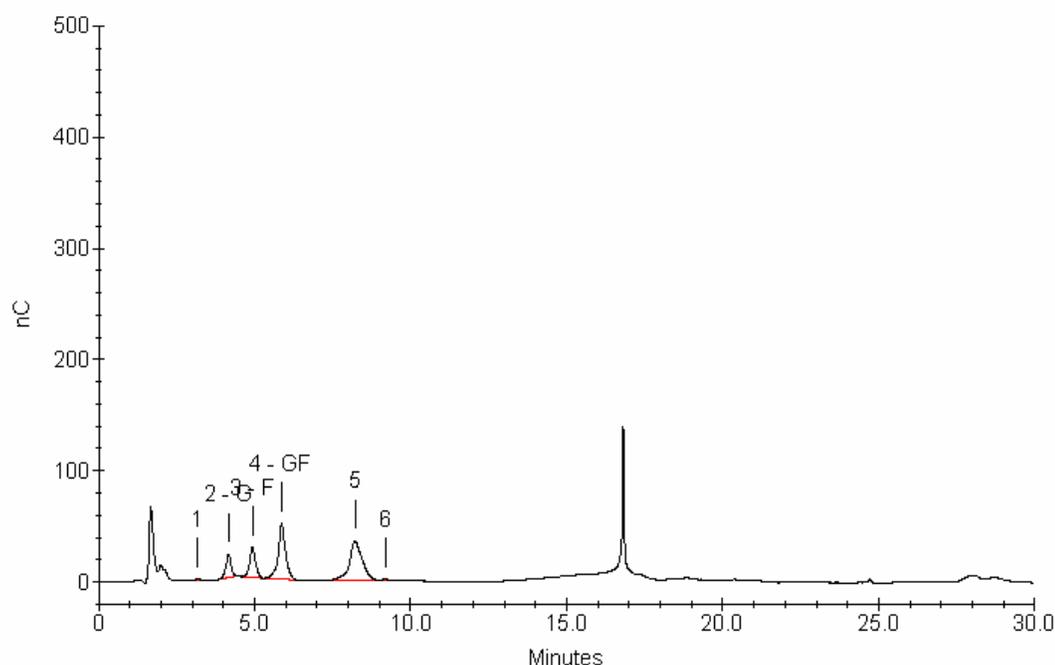


Figura 2. 3: Cromatograma do extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v). G (glicose), F (frutose), GF (sacarose).

O consumo da sacarose não corresponde ao valor real e sim aproximadamente, pois sua concentração final pode ter sido acrescentada de sacarose resultante da hidrólise dos FOS pelos micro-organismos.

O maior consumo dos FOS foi observado no ensaio 5, que foi realizado com *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, sem adição de sacarose.

As contagens finais de células apresentaram valores superiores ao mínimo exigidos pela legislação 10^6 UFC/mL (Anvisa, 2002) variando de 6,30 a 8,45 log

UFC/mL. A adição de sacarose provocou uma pequena diminuição na contagem dos *Lactobacillus spp*, que pode ter ocorrido devido ao fato da sacarose apresentar uma provável inibição no crescimento de *L. rhaminosus* de acordo com Mondragón-Bernal (2009) que avaliou individualmente seu crescimento. A contagem final de células para o ensaio cinco, com adição de *Lactobacillus bulgaricus*, e *Streptococcus thermophilus* apresentou valores próximos ao ensaio um (padrão) adicionado somente com probióticos, porém o que mais se aproximou desse resultado foi o ensaio 3 que possuía somente a adição de *Lactobacillus bulgaricus*. Alguns estudos utilizando culturas probióticas em conjunto com *Lactobacillus bulgaricus* e/ou *Streptococcus thermophilus*, tem demonstrado que é possível se obter um produto final de qualidade, e que há um crescimento tanto das culturas de probióticos como da cultura do iogurte (Donkor et. al.,2005; Farnworth et. al. 2007; Wang et. al., 2003)

Na tabela 2.9 são apresentados os resultados de ácidos produzidos durante a fermentação.

Tabela 2. 9: Concentração de ácido láctico e acético (g/L) na fermentação de extrato hidrossolúvel de soja por bactérias probióticas.

Ensaio	Ácido láctico (g/L)		Ácido acético (g/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1	4,22	7,06	0,31	0,43
2	3,99	6,06	0,29	0,50
3	4,04	6,90	0,40	0,43
4	3,91	7,33	0,34	0,33
5	4,10	7,18	0,29	0,34
6	4,01	5,76	0,34	0,51
7	3,71	4,38	0,39	0,37
8	3,85	3,90	0,35	0,36

Como pode-se observar houve uma maior produção de ácido láctico em relação ao acético, o que é uma característica ideal para esse tipo de bebida, pois quando ocorre uma relação contrária, pode causar um sabor desagradável no produto. A produção de ácidos em bebidas fermentadas a base de soja pode

variar em função das culturas utilizadas e substratos adicionados na fermentação, podendo apresentar maiores concentrações de ácido acético em relação ao láctico (Wang, 2002; Yeo & Liong, 2010; Donkor, 2007). Portanto as condições utilizadas nesse trabalho são adequadas para obtenção de um produto final com um sabor mais agradável.

Os resultados obtidos estão próximos aos observados por Mondragón-Bernal (2004), que estudando a produção de bebida simbiótica a base de soja, encontrou uma concentração de 7,09 g/L para ácido láctico ao final da fermentação com leve produção de ácido acético.

De uma forma geral as maiores concentrações de ácido láctico foram obtidas para os ensaios que apresentaram um maior crescimento dos *Lactobacillus*, e quando adicionado a cultura de *Streptococcus thermophilus* (ensaio 4), o que está de acordo com resultado obtido por Wang, (2003), que observou a produção de ácidos dessas culturas separadamente, verificando que a produção de ácido láctico foi maior para *Streptococcus thermophilus*.

2.4 – Conclusão

Diante dos resultados desse estudo conclui-se que a soja é um bom substrato para o crescimento dos probióticos, podendo ser utilizada na produção da bebida fermentada na maior concentração estudada (10%). Os fruto-oligossacarídeos são consumidos durante a fermentação, e caso o produto contenha a alegação de rico em fibra (mais que 3% de oligossacarídeos), estes deverão ser adicionados no final da fermentação, ou adicionados no início, numa quantidade tal que compense o que é consumido pelos micro-organismos. Por outro lado, deve-se ter um cuidado especial na adição destes compostos, pois os resultados mostraram que os FOS adicionados à bebida tendem a diminuir o número final de células. Os probióticos apresentaram um bom crescimento obtendo no final do processo a concentração de células acima do exigido pela legislação e não interferiram negativamente nos resultados das variáveis respostas estudadas, podendo ser adicionados na concentração de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL com exceção do *L. paracasei* que deve ser utilizado na concentração de

1×10^6 UFC/mL, por apresentar influência negativa no crescimento de *B. longum*. A temperatura do processo deve ser mantida em torno de 35°C.

A adição de sacarose ao processo provocou um declínio mais acentuado no pH e um menor consumo dos fructooligossacarídeos, podendo ser adicionado para manter os FOS em concentrações mais elevadas ao final da fermentação. O uso das culturas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* não causou grande variação no pH, e manteve as contagens finais dentro da concentração exigida, embora um pouco menores. Por não apresentarem nenhuma vantagem em relação ao produto contendo somente probióticos, nos aspectos estudados neste trabalho, devem ser excluídas deste tipo de produto.

2.5 – Referência Bibliográfica

AGUIAR-OLIVEIRA, E. Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**. v. 6, n. 3, p. 2010.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. v. 4.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde**. Resolução RDC No. 2, 7 de janeiro de 2002.

AKALIN, A. S., GONÇ, S., UNAL, G., FENDERYA S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 7, 2007.

BLEIEL, J. Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? **International Dairy Journal**. v. 20, p. 303-306, 2010.

CHAMPAGNE, C. P., GREEN-JOHNSON J., RAYMOND, Y., BARRETE J., BUCKLEY N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**. v. 42, p. 612-621, 2009.

CRUZ, A. G., WALTER, E. H. M., CADENA, R. F., FARIA, J. A. F., BOLINI H. M. A., PINHEIRO, H. P., SANT'ANA, A. S. Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. **Food Research International** v. 43, p. 1444–1448 2010.

CUNHA T. M., CASTRO F. P., BARRETO P. L. M., BENEDET, H. D., PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DONKOR, O. N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIC, T., & SHAH, N. P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt. **Journal of Food Science**, 70, M375–M381, 2005.

DONKOR O. N., NILMINI, S. L. I., STOLIC, P., VASILJEVIS, T., SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 657- 665, 2007.

FARNWORTH, E. R., MAINVILLE, I., DESJARDINS, M. P., GARDNER, N., FLISS, I., CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 174–181, 2007.

FERREIRA, C. L.L., TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. ano III –n. 16 – set./out. p. 22-25, 2000.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com fruto-oligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 18, n. 5, 2005.

HOU, J-W., YU,R-C.,CHOU,C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**. v.33. p. 393-397, 2000.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja**. Campinas, 2009. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes prebióticos e probióticos**. Campinas, 2004. Dissertação(Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-10, 2002.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2 ed. Campinas, SP: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SANDERS M. E. Overview of Functional Foods : Emphasis on Probiotic Bacteria. **Int. Dairy Journal.** v. 8, p. 341 – 347, 1998.

SIRÓ, I., KÁPOLNA, B. LUGASI, A. 2008. Funcional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite.** v. 51, p. 456-467, 2008.

VINDELORA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal.** v. 10, p. 271-275, 2000.

WANG Y.C., YU R. C., YANG H. Y., CHOU, C. C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacterias. **Food Microbiology** v. 20, p. 333–338, 2003.

YEO, SIOK-KOON, LIONG, MIN-TZE. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. **International Journal of Food Sciences and Nutrition.** v. 61, n. 2, p. 161–181, 2010.

YEO, SIOK-KOON, LIONG, MIN-TZE. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **J Sci Food Agric.**; v. 90, p. 267–275, 2010.

Capítulo 3

3. ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA

CAPÍTULO 3. ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA

RESUMO

Durante o período de estocagem podem ocorrer alterações nas características de bebida simbiótica fermentada. O presente trabalho teve como objetivo estudar a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja, avaliando a influência da adição do extrato hidrossolúvel de soja, fruto-oligossacarídeos (FOS), *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e da temperatura, observando alterações no processo pela adição de sacarose e *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As análises realizadas foram: pH, sinérese, viscosidade, contagem de colônias, determinação da velocidade específica de crescimento (μ_x) e variação da contagem de células (ΔX). Após a fermentação, realizada em condições definidas pelo planejamento Plackett & Burman, as amostras foram resfriadas e transferidas para geladeira (3-8 °C) e as análises realizadas nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias. A bebida apresentou alterações durante o período de estocagem, influenciadas pelas condições de fermentação. A concentração do extrato hidrossolúvel de soja e FOS apresentaram um aumento da sinérese. Os probióticos em sua maioria continuaram apresentando crescimento durante o período de estocagem e contribuíram para manutenção da característica simbiótica do produto. Temperaturas mais baixas durante a fermentação (em torno de 35 °C) foram melhores para a estabilidade da bebida, pois obteve-se um produto com menor sinérese e maior viscosidade. Em relação ao comportamento reológico todos os ensaios se apresentaram como fluido Herschel-Bulkley, não sendo alterado durante a vida-de-prateleira. A adição de sacarose provocou um menor consumo de FOS, a presença de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou pouca variação no produto. Portanto a melhor estabilidade durante a vida-de-prateleira foi obtida em condição de temperatura em torno de 35° C, concentração de soja 10 %, FOS 3 % e sacarose 12 %.

Palavras chaves: bebida simbiótica, soja, vida-de-prateleira, sacarose, Plackett & Burman.

3.1 – Introdução

Os consumidores desde alguns anos de uma maneira geral estão mais interessados em alimentos funcionais devido a diversos fatores: uma maior conscientização da relação entre saúde e nutrição, o interesse em prevenir ao invés de curar doenças e aumento da evidência científica para sua eficácia (Sanders, 1998).

Estudos vêm sendo realizados para a produção de alimentos adicionados de prebióticos (Haully et. al. 2005), no qual os frutooligossacarídeos são os mais utilizados, e de probióticos, sendo que as culturas mais estudadas são as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Cunha et. al., 2008; Donkor et. al., 2005; Farnworth et. al., 2007). A maioria das pesquisas tem sido desenvolvida para avaliar a adição em conjunto dos probióticos e prebióticos, obtendo-se um produto final de melhor qualidade (Akalin et. al., 2007; Yeo & Liong 2010).

Na produção de alimentos probióticos, deve-se selecionar as cepas que mantêm sua viabilidade durante sua elaboração e armazenamento, que sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal, e que confirmem propriedades tecnológicas adequadas a esse produto (Komatsu, et al., 2008).

O extrato hidrossolúvel de soja tem sido estudado para produção de bebida simbiótica e tem se apresentado como um excelente meio para o cultivo dos probióticos, porém as condições do processo devem ser otimizadas para não prejudicarem na qualidade do produto (Mondragón-Bernal, 2009).

É importante que um alimento mantenha sua qualidade no período de estocagem, pois muitas são as reações de transformação dos alimentos processados em suas vidas úteis. O alimento está sujeito ao período de vida útil, mesmo mantendo a deterioração microbiana sob controle, outras reações, tais como alterações de cor, sabor, textura, qualidade nutricional e funcional podem comprometê-lo. Os fatores que influenciam a velocidade das reações de transformação são vários: temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor

de oxigênio, estado da matriz sólida, presença de catalisadores e outros (Moura & Germer, 2004).

Mondragón-Bernal (2009) avaliou a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja e observou que a sacarose é um importante ingrediente na melhora da estabilidade do produto durante a vida-de-prateleira, e que o pH durante esse período apresenta uma queda.

Assim a partir do exposto acima o presente trabalho objetivou avaliar a vida-de-prateleira da bebida simbiótica a base de soja, acrescentada de fruto-oligossacarídeos e dos seguintes probióticos: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, e analisar o efeito da adição de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ao produto.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 – Material

3.2.1.1 – Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi a seguinte: Extrato hidrossolúvel de soja orgânico, (Provesol PSA Orgânico – Brasil), Antiespumante lecitina de soja (Doremus - Brasil) (grau alimentício), Fruto-oligossacarídeos (FOS) (Raftilose 95® da Orafiti – Bélgica) e Sacarose (Synth – Brasil).

3.2.1.2 – Culturas

Os micro-organismos utilizados (*Bifidobacterium longum* BL04, *Lactobacillus acidophilus* LAC4, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, *Lactobacillus rhamnosus* LR32, *Streptococcus thermophilus* TA40 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340), foram fornecidos pela Danisco liofilizados e em embalagens lacradas.

3.2.1.2.1 – Contagem dos micro-organismos liofilizados

Foi realizada a verificação da concentração de células dos envelopes dos micro-organismos liofilizados de acordo com metodologia proposta por Vinderola & Reinheimer (2000) e modificada por Mondragón-Bernal (2004). Os envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas e pesados 0,01 g dos micro-organismos, transferidos para tubos com água peptonada 0,1% e incubados a 37°C durante 30 minutos para ativação dos micro-organismos. Posteriormente, realizou-se diluição decimal e plaqueamento por profundidade em meio agar MRS, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, em anaerobiose e aerobiose, e posteriormente foi realizada a contagem e identificação das colônias.

3.2.1.2.2 – Avaliação da viabilidade celular dos probióticos após congelamento

Envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas, pesados e transferidos para tubos contendo extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v), incubados por 30 minutos em repouso, a 37°C, para ativação dos micro-organismos. Fez-se então diluição decimal em água peptonada e plaqueamento por profundidade em meio agar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, em anaerobiose e aerobiose e realizada a contagem das colônias. Após a diluição os tubos contendo os micro-organismos em extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v) foram congelados.

Depois de aproximadamente 24 horas de congelamento, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e realizada a diluição decimal e o plaqueamento conforme descrito anteriormente. Calculou-se a porcentagem de redução de colônias pelo congelamento através da contagem antes e depois de congelar as amostras. A redução da viabilidade de cada probiótico se encontra na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1: Perda da viabilidade dos probióticos pelo congelamento.

Micro-organismos	Contagem antes de congelar (UFC/mL)	Contagem depois de congelar (UFC/mL)	Redução da viabilidade (%)
<i>L. acidophilus</i>	$9,1 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	63,7%
<i>L. paracasei</i>	$5,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	58,8%
<i>L. rhamnosus</i>	$3,3 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	18,2%
<i>B.longum</i>	$6,9 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^{10}$	37,7%

3.2.1.3 – Meio de Cultura

Ágar MRS (Oxoid - Inglaterra) adicionado de 0,01% azul de anilina.

3.2.2 – Metodologia

3.2.2.1 – Preparo do inóculo

No preparo do inóculo, os envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas, pesados e transferidos para frascos contendo extrato hidrossolúvel de soja 6% (m/v), incubados por 30 minutos em repouso, a 37°C, e posteriormente congelados (-18 °C). Para a fermentação o inóculo foi descongelado a temperatura ambiente e transferido para o meio a ser fermentado.

3.2.2.2 – Fermentação

A fermentação foi conduzida em tubos de 50 mL fechados contendo o meio a ser fermentado pasteurizado a 116°C por 4 minutos e resfriado rapidamente (Mondragón-Bernal 2004). A fermentação foi realizada até o pH do meio atingir valores próximo a 5, amostras foram coletadas periodicamente para análise de: pH, contagem dos probióticos, determinação de ácido acético e ácido láctico.

3.2.2.3 – Vida-de-prateleira

Após a fermentação as amostras foram resfriadas e armazenadas em geladeira (3-8°C) para estudo da vida-de-prateleira do produto. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias e analisadas quanto a: pH, viscosidade, sinérese e contagem dos probióticos. As amostras foram congeladas para

posterior avaliação da concentração de ácido láctico, ácido acético e fruto-oligossacarídeos.

3.2.2.4 – Condições do processo

Primeiro foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis: concentração de inóculo, composição do meio e temperatura do processo sobre contagem dos probióticos e pH. Posteriormente, as variáveis foram fixadas, e novos ensaios realizados com adição de sacarose e diferentes micro-organismos introduzidos. O planejamento experimental adotado foi do tipo Plackett & Burman de 12 ensaios e três pontos centrais, com um total de 15 ensaios (Rodrigues & lemma, 2009), sendo 7 variáveis independentes: concentração do extrato hidrossolúvel de soja, concentração de fruto-oligossacarídeos, temperatura, contagem inicial de: *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *B.longum*. Na Tabela 3.2 estão apresentadas às condições dos ensaios com as variáveis codificadas e reais.

Tabela 3. 2: Matriz do delineamento do Plackett & Burman com valores reais entre parênteses.

Ensaio	Variáveis independentes						
	EHsoja (%)	FOS (%)	Temp. (°C)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	<i>B.longum</i> (UFC/mL)
1	1 (10)	-1 (3)	1 (40)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
2	1 (10)	1 (5)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
3	-1 (4)	1 (5)	1(40)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
4	1 (10)	-1 (3)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
5	1 (10)	1 (5)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
6	1 (10)	1 (5)	1 (40)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
7	-1 (4)	1 (5)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
8	-1 (4)	-1 (3)	1 (40)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)
9	-1 (4)	-1 (3)	-1 (34)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	-1 (1 x10 ⁶)
10	1 (10)	-1 (3)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
11	-1 (4)	1 (5)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	1 (1 x10 ⁷)	1 (1 x10 ⁷)
12	-1 (4)	-1 (3)	-1 (34)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)	-1 (1 x10 ⁶)
13	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)
14	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)
15	0 (7)	0 (4)	0 (37)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)	0 (5,5 x10 ⁶)

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental foram realizados outros ensaios variando a concentração de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Tabela 3.3), sendo realizados nas seguintes condições: temperatura 35°C, 10% (m/v) de extrato hidrossolúvel de soja, 3% (m/v) de fruto-oligossacarídeos, 5,5x10⁶ UFC/mL de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B.longum* e 1x10⁶ UFC/mL de *L. paracasei*.

Tabela 3. 3: Concentração do inóculo e de sacarose.

Ensaio	Sac. (%)	TA (UFC/mL)	LB (UFC/mL)
1	0	0	0
2	12	0	0
3	0	0	1 x10 ⁶
4	0	1 x10 ⁶	0
5	0	1 x10 ⁶	1 x10 ⁶
6	12	0	1 x10 ⁶
7	12	1 x10 ⁶	0
8	12	1 x10 ⁶	1 x10 ⁶

*Sac: sacarose, TA: *Streptococcus thermophilus*, LB: *Lactobacillus bulgaricus*,.

3.2.2.5 – Metodologia Analítica

3.2.2.5.1 – Medição do pH

O pH das amostras foi medido em potenciômetro Mettler Toledo 320 pH Meter

3.2.2.5.2 – Medida de Sinérese

Foi medido o volume de soro separado do meio fermentado, calculando-se a porcentagem correspondente ao volume total de amostra (Mondragón-Bernal, 2004).

3.2.2.5.3 – Contagem de Colônias

Para contagem de probióticos, presentes na bebida simbiótica, alíquotas de 1mL de amostra foram transferidos para tubos com 9 mL de água peptonada

(0,1%), a partir dessa diluição foram feitas diluições subseqüentes necessárias à análise do produto. Das diluições adequadas realizou-se o plaqueamento em profundidade em meio Agar MRS com 0,01% azul de anilina, incubadas por 72h a 37°C em aerobiose e anaerobiose (Mondragón-Bernal, 2009).

3.2.2.5.4 – Determinação das propriedades reológicas

As propriedades reológicas das amostras foram analisadas utilizando reômetro Physica MCR301 (Anton Paar GmbH, Alemanha), com geometria cone placa de 5 cm, ângulo 2,013°, truncamento 208 micron. A temperatura utilizada foi de 20 °C. Os parâmetros reológicos foram determinados utilizando o software STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., USA).

3.2.2.5.5 – Análise de Fruto-oligossacarídeos

Para a análise de fruto-oligossacarídeos fez-se a remoção de células e proteínas adicionando-se 0,01 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra que foram centrifugadas em centrífuga Sorval refrigerada a 9640 g por 10 min a 5 °C. O sobrenadante foi diluído em água deionizada e filtrado em filtros de 0,22 µm (Mondragón-Bernal, 2004).

As amostras foram identificadas e quantificadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD), utilizando um sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EUA), que consiste de uma bomba gradiente GP50, um detector eletroquímico ED-40 operando na forma de pulso amperométrico (eletrodo de ouro e eletrodo de referência de Ag-AgCl). Os produtos foram analisados em uma coluna de troca aniônica CarboPac PA 100 (240 x 4 mm) e pré-coluna CarboPac PA100 (50 x 4 mm). A eluição foi realizada a 1 mL.min⁻¹ em uma solução de NaOH (100 mM) e um gradiente linear de NaOH 100 mM contendo acetato de sódio (0 - 500 mM). A curva padrão foi construída utilizando-se padrões de kestose, nistose e 1-frutosilnistose (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), glicose, frutose e sacarose (Merck). A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas, respectivamente, por meio do tempo de retenção (t_R) e padronização externa com a injeção de no mínimo 7 pontos em concentrações diferentes dos açúcares padrões de grau cromatográfico. (Aguiar-Oliveira, 2010).

3.2.2.5.6 – Análise de ácidos

Para a análise de ácidos acético e láctico, as amostras foram preparadas de acordo com metodologia proposta por Donkor et al. (2005) com algumas modificações. Foram adicionados 0,2 mL de ácido nítrico 15,5 M e 2 mL de água deionizada em 6 mL de amostras. A mistura foi centrifugada em centrífuga Nova Técnica a 785 g por 20 minutos para remoção de células e proteínas. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm, diluído e analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Usou-se um cromatógrafo a líquido Varian modelo 9010 com injetor automático, forno para coluna, bomba ternária e detectores UV-Vis e índice de refração conectados em série. A fase móvel consistiu em uma solução aquosa de ácido sulfúrico pH 2,60. A eluição foi isocrática com vazão da fase móvel de 0,6 mL/min, em coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (BioRad) de 300 mm x 7,8 mm x 9 µm, e respectiva pré-coluna aquecidas a 35°C. A detecção dos compostos foi realizada por detector UV-Vis com comprimento de onda fixado em 204 nm (para a quantificação dos ácidos láctico e acético). O tempo total da análise foi de 20 minutos (Cruz et al., 2010).

3.2.2.5.7 – Cinética de crescimento microbiano

Foram determinadas a velocidade específica de crescimento e a variação do número de células. A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi calculada de acordo com a equação 1:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 1}$$

onde X= número de células. A variação do número de células (Δx) foi calculada pela diferença entre as contagens final e inicial. A velocidade específica de crescimento foi calculada para contagem total de probióticos e a variação do número de células para *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium longum*.

3.3 – Resultados e Discussão

3.3.1 – Resultado do planejamento experimental Plackett & Burman

Os resultados obtidos para as variáveis dependentes durante a vida-de-prateleira são apresentados na Tabela 3.4. Pode-se observar que o valor de pH durante o armazenamento continua diminuindo, atingindo valores finais entre 3,77 a 4,08, o que é comum ocorrer quando se trata de bebidas fermentadas, a base de soja ou leite, com adição de prebióticos e/ou probióticos, como observado por Kempka et. al. (2002), Mondragón-Bernal (2009) e Haully et. al. (2005).

Os ensaios apresentaram aumento da sinérese ao longo dos dias de armazenamento, sendo que alguns ensaios apresentaram esse aumento apenas em 10 dias (1, 3, 10, 11, 13, 14, 15) ou mantiveram constante durante todo o período analisado (7, 8, 9). A viscosidade aparente de uma forma geral apresenta um aumento ao longo da vida-de-prateleira, relacionado a um menor valor do pH e ao ponto isoelétrico da soja. A concentração de probióticos expressa pela contagem total, na maioria dos ensaios sofre uma pequena variação diminuindo ou aumentando no decorrer da vida-de-prateleira, apresentando em todos os resultados valores acima do mínimo exigidos pela legislação 10^6 UFC/mL (Anvisa, 2002), variando de $1,1 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL.

A confiabilidade desses resultados é reduzida devido à variabilidade dos bioprocessos que envolvem micro-organismos, e ao fato da metodologia utilizada, para contagem de colônias, estar sujeita a variabilidades consideráveis, apesar das repetições realizadas. Isto pode ser constatado pelos valores obtidos nos pontos centrais (ensaios 13 a 15) que apresentaram grande variação.

Tabela 3. 4: Resultados do planejamento Plackett & Burman para: pH, sinérese, viscosidade aparente e contagem total (CT) durante a vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja.

Ensaio	0 dias				10 dias				20 dias				30 dias			
	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) $150s^{-1}$	CT (logUFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) $150s^{-1}$	CT (logUFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) $150s^{-1}$	CT (logUFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) $150s^{-1}$	CT (logUFC/mL)
1	5,0	5,52	0,016	8,74	4,5	9,19	0,017	8,30	4,4	9,19	0,016	9,17	4,1	9,19	0,017	9,11
2	5,1	5,52	0,033	8,50	4,4	5,52	0,035	8,74	4,3	7,35	0,035	8,86	3,9	9,19	0,040	9,01
3	5,1	7,35	0,013	8,35	4,2	11,03	0,014	8,51	4,1	11,03	0,014	8,74	3,9	11,03	0,014	8,63
4	4,8	5,52	0,017	8,40	4,5	7,35	0,018	8,27	4,5	7,35	0,018	8,28	4,2	11,03	0,018	8,04
5	5,1	5,52	0,036	8,46	4,3	9,19	0,037	8,80	4,4	9,19	0,037	8,65	4,1	11,03	0,041	8,87
6	5,0	5,52	0,025	8,53	4,4	7,35	0,024	8,69	4,2	7,35	0,027	8,81	4,0	11,03	0,026	8,59
7	4,6	9,19	0,013	8,47	4,3	9,19	0,014	8,39	4,2	9,19	0,014	8,41	4,0	9,19	0,013	8,22
8	4,8	7,35	0,014	8,26	4,4	7,35	0,015	8,33	4,3	7,35	0,015	8,38	4,0	7,35	0,016	8,55
9	5,1	3,68	0,025	8,18	4,3	3,68	0,029	9,14	4,3	3,68	0,031	8,61	3,9	3,68	0,032	8,95
10	5,1	3,68	0,053	8,53	4,3	7,35	0,051	8,66	4,4	7,35	0,060	8,94	3,9	7,35	0,064	8,83
11	5,2	1,84	0,032	8,45	4,3	3,68	0,037	8,66	4,0	3,68	0,040	9,08	3,8	3,68	0,040	8,88
12	5,2	1,84	0,038	8,20	4,2	3,68	0,044	8,64	4,1	4,60	0,045	8,80	3,9	4,60	0,047	8,55
13	5,0	1,84	0,049	8,30	4,2	3,68	0,058	8,48	4,2	3,68	0,060	8,59	4,0	3,68	0,063	8,66
14	5,0	3,68	0,020	8,54	4,3	5,52	0,021	8,53	4,1	5,52	0,021	8,77	3,8	5,52	0,023	8,88
15	5,0	3,68	0,025	8,52	4,2	5,52	0,025	8,68	4,0	5,52	0,026	8,88	3,8	5,52	0,027	9,13

* Sin.= Sinérese, η_{ap} (Pa.s) $150s^{-1}$ = viscosidade aparente calculada a deformação $\dot{\gamma}= 150 s^{-1}$ (para mastigação de alimentos),
CT = Contagem total.

Na Tabela 3.5 são apresentados os resultados para μ_x (h^{-1}) e Δx (log UFC/mL). Pode-se observar que a velocidade específica de crescimento apresentou valores baixos, nos ensaios quatro e sete foi negativa, o que significa que houve um declínio da viabilidade dos probióticos durante a vida-de-prateleira apenas para esses ensaios. Os resultados apresentados com valores positivos variaram de 0,02 a 0,07. A variação de crescimento dos *Lactobacillus* spp foi negativa para os ensaios quatro e sete e a do *Bifidobacterium longum* apenas para o ensaio sete.

Tabela 3. 5: Resultados obtidos no planejamento Plackett & Burman para: μ_x velocidade específica de crescimento e Δx variação do número de células durante vida-de-prateleira.

Ensaio	μ_x (h^{-1})	Δx (log UFC/mL)	
	CT	LC	BL
1	0,03	0,31	0,40
2	0,04	0,48	0,34
3	0,05	0,24	1,12
4	-0,02	-0,33	0,88
5	0,03	0,27	1,31
6	0,03	0,13	1,19
7	-0,02	-0,13	-0,43
8	0,02	0,10	1,06
9	0,06	0,70	0,97
10	0,02	0,34	1,07
11	0,03	0,28	0,59
12	0,07	0,22	0,85
13	0,03	0,47	0,47
14	0,04	0,34	0,35
15	0,05	0,63	0,59

**LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*

Os resultados apresentados pelas variáveis dependentes durante a vida-de-prateleira foram analisados pelo software STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Na Tabela 3.6 são apresentados os resultados dos efeitos para sinérese e viscosidade aparente. Foi utilizado o nível de 80% de confiança para avaliar esses

resultados, para não deixar de incluir variáveis que apresentaram efeito significativo no processo podendo ser utilizado esse nível por se tratar de um processo com alta variabilidade, sendo assim as variáveis que apresentaram efeito significativo na sinérese foram o extrato hidrossolúvel de soja, FOS, temperatura, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, e como já foi dito anteriormente esses resultados apresentam uma menor confiabilidade devido à variabilidade dos bioprocessos que envolvem micro-organismos.

Tabela 3. 6: Efeitos das variáveis sobre a sinérese e viscosidade aparente (η_{ap}) durante a vida-de-prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.

Efeitos estimados para sinérese (%)				
Variáveis independentes	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias
R ²	0,8639	0,7740	0,7754	0,9074
Média	5,209	7,048	7,277	8,197
Curvatura	-4,290	-4,290	-4,749	-6,588
X1: EHsoja (%)	0,000	1,226	1,379	3,217
X2: FOS (%)	1,226	1,226	1,379	1,992
X3: Temperatura (°C)	3,064	3,064	2,605	3,217
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	1,838	0,000	0,153	0,766
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	0,613	1,226	0,766	0,766
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	-0,613	-1,226	-1,685	-1,072
X7: <i>B.longum</i> (UFC/mL)	0,613	1,226	0,766	-0,460
Efeitos estimados para viscosidade aparente (η_{ap}) (Pa.s)				
Variáveis independentes	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias
R ²	0,7067	0,6640	0,6774	0,6905
Média	0,026	0,028	0,029	0,031
Curvatura	0,010	0,014	0,012	0,014
X1: EHsoja (%)	0,007	0,005	0,005	0,007
X2: FOS (%)	-0,002	-0,002	-0,003	-0,003
X3: Temperatura (°C)	-0,020	-0,022	-0,024	-0,027
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	-0,007	-0,007	-0,008	-0,008
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	0,003	0,001	0,002	0,003
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	0,003	0,002	0,005	0,003
X7: <i>B.longum</i> (UFC/mL)	0,002	0,001	0,002	0,002

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,20$).

Como premissa, é importante que o produto apresente menor porcentagem de sinérese, pois torna seu aspecto melhor, principalmente quando comercializado em embalagens transparentes. A análise dessa resposta permite observar que soja e FOS apresentaram efeito positivo na sinérese, ou seja, quanto maior a concentração desses substratos maior será a sinérese. Mondragón-Bernal (2009) estudou a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja avaliando a influência da concentração de sacarose, lactato de cálcio, extrato hidrossolúvel de soja, FOS, povidexose e proporção de *L. rhamnosus* para diferentes variáveis dependentes entre elas a sinérese, observando que a concentração de soja e FOS apresentaram um efeito negativo sobre essa variável. Esse resultado é contrário ao encontrado neste trabalho que pode ser devido ao fato da bebida fermentada por Mondragón-Bernal (2009) ser adicionada de sacarose e povidexose, e além de ter sido utilizada uma única temperatura (37°C) para a fermentação da bebida. Nesta pesquisa a temperatura se apresentou com efeito positivo durante toda a vida-de-prateleira sobre a sinérese, tendo grande influência sobre essa resposta. Quanto menor a temperatura utilizada na fermentação menor a sinérese durante o período de estocagem.

A soja apesar de influenciar positivamente a sinérese, apresenta também essa característica no crescimento dos probióticos, sendo importante sua adição na concentração mais elevada estudada, já que ela contribui para um aumento da sinérese somente no final da estocagem.

A concentração de *L. acidophilus* apresentou efeito positivo sobre a sinérese no primeiro dia de armazenamento, o mesmo foi observado em estudo realizado por Antunes et. al. (2004), que ao adicionarem a cultura de *L. acidophilus* ao iogurte desnatado verificaram uma maior sinérese do produto.

A concentração de *L. rhamnosus* apresentou efeito negativo sobre a sinérese, que era um resultado esperado devido ao fato que sua adição na produção da bebida fermentada diminui a sinérese em até 14%, de acordo com estudo realizado por Mondragón-Bernal (2009) que avaliou a produção de bebida fermentada a base de soja com diferentes composições com e sem adição de *L. rhamnosus*.

Em relação à viscosidade aparente, como pode ser observado a 80% de confiança (Tabela 3.6), apenas a temperatura apresentou efeito significativo negativo sobre essa variável. Como a temperatura estudada é a da fermentação, esse efeito negativo pode estar relacionado ao menor crescimento dos probióticos em temperaturas mais elevadas durante a fermentação (Mondragón-Bernal, 2004), e conseqüentemente uma menor taxa de atividade metabólica, levando a uma menor alteração do meio e viscosidade aparente do produto (Haque et. al., 2001).

Os resultados obtidos para os efeitos na contagem total, velocidade específica, e variação do crescimento, são apresentados na Tabela 3.7.

A 90% de confiança as variáveis que apresentaram efeito significativo sobre a contagem total, velocidade específica de crescimento e variação do número de células, foram o extrato hidrossolúvel de soja, temperatura, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. longum* e *L. rhamnosus*.

O extrato hidrossolúvel de soja apresentou efeito positivo sobre a contagem total no primeiro dia de estocagem, ou seja, no final da fermentação. Como os probióticos apresentaram um bom crescimento em soja (Mondragón-Bernal, 2004), sua concentração inicial vai contribuir para esse crescimento durante a fermentação até o início da estocagem. Esse fato, porém, não é observado no décimo dia, pois em temperaturas baixas há pouco crescimento, não interferindo conseqüentemente no μ_x e Δx dos probióticos durante a vida-de-prateleira.

A temperatura apresentou efeito negativo na contagem total no décimo dia de estocagem, na velocidade específica de crescimento e na variação da contagem de *B. longum*. O aumento da temperatura durante a fermentação leva a um menor crescimento dos probióticos principalmente do *B. longum* (Crittenden et. al., 2001), que reflete no crescimento durante a vida-de-prateleira. Os probióticos apresentam um melhor crescimento em temperaturas mais baixas (em torno de 35°C) durante a fermentação e continuam apresentando um pequeno crescimento durante a vida-de-prateleira.

Para contagem total durante a vida-de-prateleira a concentração de *L. acidophilus* apresentou efeito negativo em vinte dias de estocagem e a

concentração de *B.longum* e *L. paracasei* apresentaram efeito positivo em zero e dez dias de estocagem respectivamente.

Tabela 3. 7: Efeito das variáveis sobre a contagem total durante a vida-de-prateleira da bebida simbiótica fermentada a base de soja do delineamento experimental Plackett & Burman.

Efeitos estimados para contagem total (log UFC/mL)				
Variáveis independentes	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias
R ²	0,8019	0,8397	0,7690	0,5362
Média	8,423	8,593	8,728	8,687
Curvatura	0,061	-0,057	0,029	0,403
X1: EHsoja (%)	0,207	-0,035	0,115	0,111
X2: FOS (%)	0,073	0,071	0,064	0,028
X3: Temperatura (°C)	0,070	-0,360	-0,188	-0,324
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	-0,088	0,033	-0,390	-0,158
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	-0,073	0,186	-0,078	0,101
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	0,007	0,083	-0,079	-0,202
X7: <i>B.longum</i> (UFC/mL)	0,128	-0,141	0,087	0,113

Efeitos estimados para μ_x (h ⁻¹) e Δx (log UFC/mL).			
Variáveis independentes	μ_x (h ⁻¹)	Δx (LC)	Δx (BL)
R ²	0,8451	0,7624	0,721
Média	0,028	0,778	0,303
Curvatura	0,019	-0,615	0,264
X1: EHsoja (%)	-0,013	0,169	-0,099
X2: FOS (%)	-0,002	-0,182	-0,049
X3: Temperatura (°C)	-0,026	-0,152	-0,399
X4: <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	-0,021	-0,180	-0,149
X5: <i>L. paracasei</i> (UFC/mL)	0,013	0,683	0,170
X6: <i>L. rhamnosus</i> (UFC/mL)	-0,022	-0,136	-0,213
X7: <i>B.longum</i> (UFC/mL)	-0,017	-0,226	-0,093

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,10$). *LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*.

A concentração de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B.longum* apresentaram efeito negativo sobre a velocidade específica de crescimento durante a vida-de-prateleira, ou seja, quanto maior a concentração utilizada desses probióticos para a fermentação, menor será a velocidade específica de crescimento durante a vida-de-prateleira.

A variação de crescimento para *Lactobacillus* spp foi afetada apenas pela concentração de *L. paracasei* que apresentou efeito significativo positivo e para *B.longum*, nenhuma das variáveis interferiram na variação do número de células.

De uma forma geral as contagens durante a vida-de-prateleira apresentaram poucas variações, sendo que somente os ensaios quatro e sete apresentaram um pequeno declínio, mas continuaram com valores acima do exigido. Em estudos realizados para bebidas fermentadas estocadas sobre refrigeração, os probióticos em grande parte mantêm a concentração no produto (Zacarchenco & Massaguer-Roig, 2004; Donkor et. al., 2007; Vinderola et. al., 2000).

Os FOS não apresentaram efeito significativo no crescimento dos probióticos durante a vida-de-prateleira.

Na Tabela 3.8 são apresentados os parâmetros reológicos da bebida, obtidos a partir dos dados de taxa de deformação e tensão de cisalhamento (curvas de escoamento). O valor da viscosidade aparente (η_{ap}) foi calculado através da equação 2, utilizando taxa de deformação de 150 s^{-1} , valor típico de processamento e para mastigação dos alimentos.

$$\eta_{ap} = (\sigma_0 / \dot{\gamma}) + k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad \text{Equação 2}$$

onde, η_{ap} = viscosidade aparente a 150 s^{-1} (Pa.s), σ_0 = tensão residual ou tensão inicial de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (1/s), k = índice de consistência ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$), n = índice comportamento de escoamento (-). Analisando-se os parâmetros encontrados pode-se observar que todos os ensaios apresentaram-se como fluido Herschel-Bulkley, caracterizado pela presença de uma tensão inicial (σ_0) e relação entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação não linear, diferentemente de bebidas fermentadas a partir do leite que apresentam geralmente característica de fluido pseudoplástico, caracterizado por não possuir tensão inicial (Penna et. al., 2001). Essa característica não foi alterada durante a vida-de-prateleira, e houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais ($R^2 > 0,9999$).

Tabela 3. 8: Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,998$) para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira do delineamento experimental Plackett & Burman.

Ensaio	Dias	σ_0 (Pa)	k (Pa.s ⁿ)	n (-)	η_{ap} (Pa.s) ($\dot{\gamma}=150$ s ⁻¹)
1	0	0,2685	0,1641	0,5145	0,0162 ^b
	10	0,2035	0,1704	0,5291	0,0174 ^a
	20	0,1745	0,1917	0,4948	0,0164 ^{ab}
	30	0,2268	0,1694	0,5208	0,0168 ^{ab}
2	0	0,3146	0,5350	0,4302	0,0328 ^c
	10	0,3731	0,6446	0,4067	0,0354 ^b
	20	0,3305	0,6123	0,4174	0,0352 ^b
	30	0,4068	0,7047	0,4113	0,0396 ^a
3	0	0,1413	0,0968	0,5786	0,0126 ^b
	10	0,1184	0,1335	0,5363	0,0138 ^a
	20	0,1057	0,1416	0,5229	0,0137 ^a
	30	0,1267	0,1406	0,5280	0,0141 ^a
4	0	0,1461	0,1860	0,5058	0,0166 ^c
	10	0,2386	0,1483	0,5562	0,0176 ^b
	20	0,1840	0,1625	0,5439	0,0178 ^{ba}
	30	0,2270	0,1550	0,5582	0,0184 ^a
5	0	0,2961	0,5270	0,4530	0,0358 ^b
	10	0,3491	0,5744	0,4407	0,0370 ^b
	20	0,1633	0,7528	0,3905	0,0366 ^b
	30	0,3251	0,8498	0,3821	0,0406 ^a
6	0	0,3655	0,2535	0,5305	0,0241 ^b
	10	0,3325	0,2630	0,5068	0,0244 ^b
	20	0,3419	0,2740	0,5168	0,0266 ^a
	30	0,3550	0,2766	0,5085	0,0259 ^{ab}
7	0	0,1885	0,1001	0,5773	0,0133 ^b
	10	0,2257	0,0950	0,5878	0,0135 ^b
	20	0,2118	0,1037	0,5860	0,0144 ^a
	30	0,2049	0,1007	0,5678	0,0129 ^b
8	0	0,1430	0,1285	0,5502	0,0144 ^b
	10	0,0922	0,1672	0,5057	0,0147 ^b
	20	0,1343	0,1574	0,5236	0,0153 ^a
	30	0,1261	0,1675	0,5157	0,0156 ^a

Continuação da tabela 3.8

Ensaio	Dias	σ_0 (Pa)	k (Pa.s ⁿ)	n (-)	η_{ap} (Pa.s) ($\dot{\gamma}=150$ s ⁻¹)
9	0	0,2454	0,3032	0,4901	0,0250 ^b
	10	0,2259	0,5038	0,4208	0,0279 ^b
	20	0,1821	0,5674	0,4146	0,0314 ^a
	30	0,3182	0,6017	0,4040	0,0325 ^a
10	0	0,5632	1,0455	0,3898	0,0529 ^c
	10	0,7350	0,8762	0,4142	0,0514 ^c
	20	0,6203	1,2117	0,3854	0,0598 ^b
	30	0,7877	1,3890	0,3677	0,0637 ^a
11	0	0,3442	0,4528	0,4585	0,0323 ^c
	10	0,3542	0,6596	0,4098	0,0366 ^b
	20	0,4894	0,7023	0,4138	0,0405 ^a
	30	0,5613	0,6681	0,4201	0,0403 ^a
12	0	0,3303	0,7461	0,3952	0,0382 ^c
	10	0,3521	0,9441	0,3762	0,0438 ^b
	20	0,4014	0,9285	0,3816	0,0446 ^{ba}
	30	0,4611	1,0281	0,3690	0,0466 ^a
13	0	0,4359	0,8656	0,4144	0,0489 ^c
	10	0,5190	1,0516	0,4079	0,0576 ^b
	20	0,4868	1,1431	0,3991	0,0596 ^{ba}
	30	0,5423	1,3050	0,3829	0,0629 ^a
14	0	0,1059	0,2972	0,4562	0,0202 ^c
	10	0,1607	0,2912	0,4693	0,0215 ^b
	20	0,2621	0,2303	0,5013	0,0207 ^c
	30	0,3320	0,2378	0,5117	0,0228 ^a
15	0	0,1950	0,3343	0,4678	0,0245 ^b
	10	0,2198	0,3530	0,4617	0,0253 ^b
	20	0,3340	0,3213	0,4841	0,0264 ^a
	30	0,3418	0,3273	0,4816	0,0266 ^a

* σ_0 =Tensão inicial de cisalhamento (Pa), k = índice de consistência, n = índice de escoamento, η_{ap} = viscosidade aparente calculada a deformação $\dot{\gamma}=150$ s⁻¹ (para mastigação de alimentos). * letras iguais na mesma amostra indicam que não há diferença significativa entre os diferentes dias de armazenamento pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultado semelhante foi obtido por Mondragón-Bernal (2009), que avaliou o comportamento de bebida simbiótica fermentada a base de soja durante seu armazenamento, e observou que a maioria dos seus ensaios apresentava

característica Herschel-Bulkley, porém alguns sofreram transformações durante a vida-de-prateleira, e passaram a se apresentar como fluido pseudoplástico. Essa mudança de comportamento não foi observada no presente estudo.

A viscosidade aparente apresentou valores variando de 0,013 a 0,064 (Pa.s), e esse resultado se encontra próximo aos obtidos por Mondragón-Bernal (2009), que avaliou a viscosidade aparente em bebida com composição semelhante e utilizou o mesmo valor de taxa de deformação (150 s^{-1}) para o cálculo obtendo valores entre 0,0028 e 0,0885 (Pa.s).

Os resultados foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), demonstrando uma variação na viscosidade aparente, apresentando um pequeno aumento durante o período de estocagem em todos os ensaios, o que era de se esperar já que os micro-organismos apresentam crescimento nessa fase, que apesar de ser menor que na fermentação ainda causam alteração no meio.

Na tabela 3.9 são apresentados os resultados da análise de FOS, que corresponde à soma das concentrações de kestose, nistose e 1-frutossilnístose.

Tabela 3. 9: Concentração de fruto-oligossacarídeos (FOS) (g/L) durante vida-de-prateleira.

Ensaio	Concentração de FOS		
	Inicial (g/L)	Final (g/L)	% Consumo
1	26,12	4,26	83,69
2	40,10	17,03	57,53
3	12,43	1,60	87,13
4	28,56	6,29	77,98
5	24,16	2,74	88,66
6	13,67	2,87	79,01
7	41,32	21,14	48,84
8	6,31	0,48	92,39
9	6,47	1,30	79,91
10	5,81	1,64	71,77
11	24,67	16,08	34,82
12	21,39	4,07	80,97
13	18,41	3,05	83,43
14	14,09	2,39	83,04
15	19,29	2,71	85,95

O produto utilizado, FOS comercial (95%), é um hidrolisado de inulina, contendo oligossacarídeos de cadeia maior do que os acima descritos, e que não puderam ser quantificados por falta dos respectivos padrões, conforme mostrado na Figura 2.1 do capítulo 2. Portanto, os valores expressos na Tabela 3.9, não correspondem ao total real de FOS, mas sim um valor aproximado. A metodologia para quantificação foi baseada em Aguiar-Oliveira (2010), e os resultados foram utilizados para verificar se houve consumo de FOS.

O valor inicial de FOS apresenta grande variação, pois além de acrescidos em diferentes concentrações nos ensaios, de acordo com o planejamento Plackett & Burman variando de 30g/L a 50g/L, durante a fermentação ele é consumido em proporções diferentes. No período de estocagem ainda continua havendo consumo de FOS, atingindo baixas concentrações após trinta dias.

A maior concentração de FOS foi de 21,14 g/L para o ensaio sete, garantindo as características prebióticas, porém não podendo conter a alegação de rico em fibra, pois para isso é necessário haver um mínimo de 3% de oligossacarídeos. Esse consumo de FOS pode ser observado nas Figuras 3.1 e 3.2, que apresentam respectivamente a concentração inicial e final dos FOS para o ensaio 15.

Diante desses resultados as variáveis estudadas para o processo de vida-de-prateleira foram fixadas. A concentração de soja apesar de causar um aumento na sinérese no final do período de estocagem, como apresentou efeito positivo sobre a contagem total dos probióticos foi mantida a 10%, e os FOS por aumentarem a sinérese em concentrações mais elevadas e não influenciarem a concentração dos probióticos durante a vida-de-prateleira, além de serem um substrato com alto valor agregado foram mantidos no menor nível de concentração de 3%.

A concentração dos probióticos foi fixada no ponto central ($5,5 \times 10^6$ UFC/mL) com exceção de *L. paracasei* que foi mantido no menor nível (1×10^6 UFC/mL) pela interferência observada em estudo anterior na variação de *B. longum*. A temperatura por apresentar um aumento na sinérese e diminuição da contagem total, e velocidade específica de crescimento, foi mantida a 35°C.

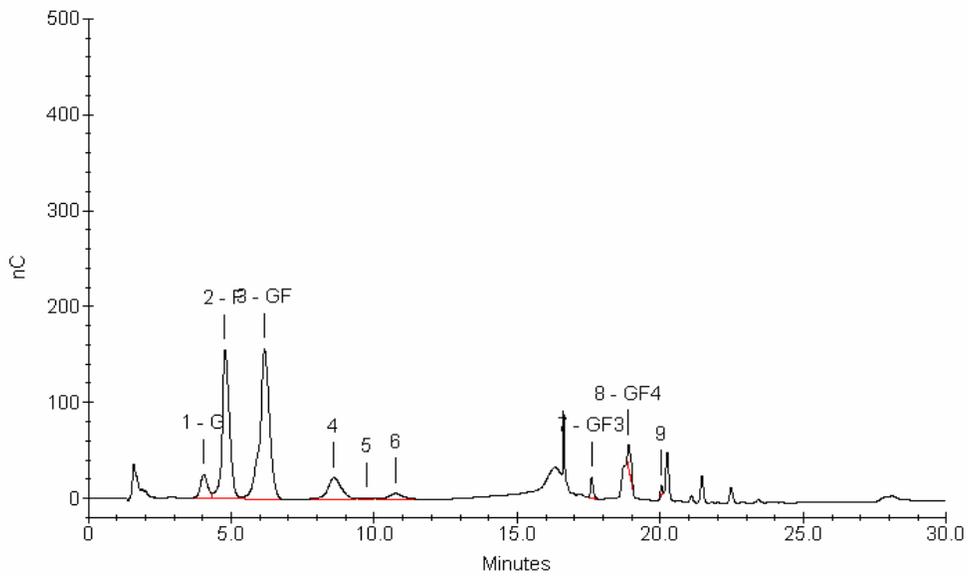


Figura 3. 1: Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 15 da bebida simbiótica a base de soja no início da vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose).

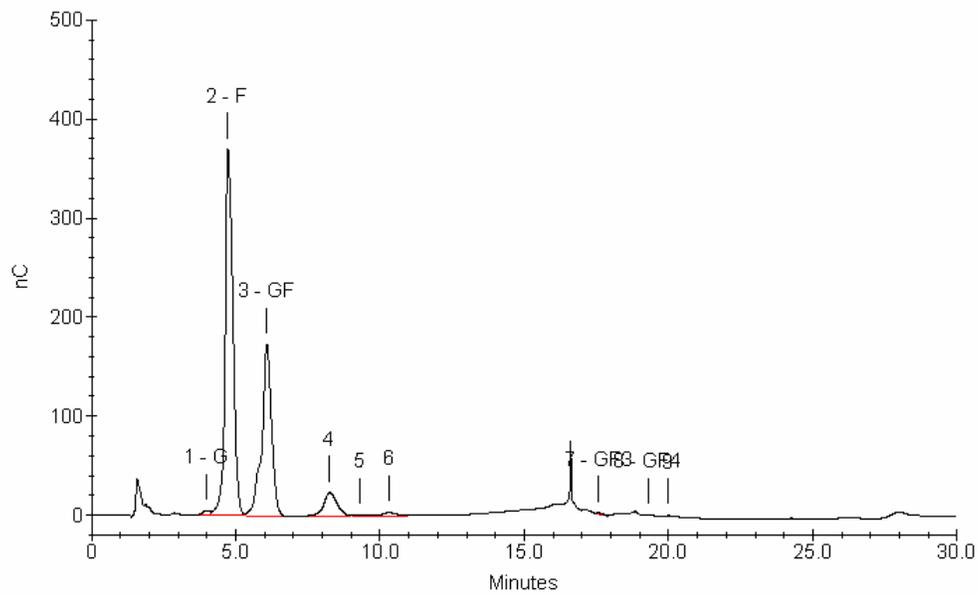


Figura 3. 2: Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 15 da bebida simbiótica a base de soja após 30 dias de vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose).

3.3.2 – Resultados de experimentos com sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Após a realização do experimento Plackett & Burman, as variáveis foram fixadas e novos ensaios realizados nas seguintes condições: soja 10%, FOS 3%, temperatura de 35°C, concentração dos probióticos: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B.longum* na concentração de $5,5 \times 10^6$ e *L. paracasei* na concentração de 1×10^6 , com adição de sacarose, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, em alguns ensaios.

Os resultados obtidos para o pH, sinérese, viscosidade aparente e contagem total durante a vida-de-prateleira são apresentados na Tabela 3.10.

Como pode ser observado os valores de pH foram diminuindo ao longo do período de estocagem, sendo o menor valor final de 4,08 para o ensaio dois (padrão adicionado de sacarose), que apresentou o maior crescimento, atingindo contagem total de 8,82 log UFC/mL, menor valor de sinérese de 12,87%, e maior valor de viscosidade aparente de 0,013 (Pa.s).

No experimento realizado somente com as culturas probióticas, foi observado um aumento da contagem total e diminuição da sinérese, ao adicionar a sacarose, o que está de acordo com resultados obtidos por Mondragón-Bernal (2009) que avaliou a influência dessa variável em bebida semelhante durante o período de estocagem e observou que a sacarose na concentração estudada (0 a 12%), apresentava um aumento na contagem total dos probiótico e diminuição da sinérese.

Na Tabela 3.11 são apresentados os resultados para velocidade específica e variação do crescimento. O maior valor de μ_x também foi obtido no ensaio dois, que apresentou um maior aumento dos *Lactobacillus* spp em relação ao experimento sem sacarose, observada pela variação de crescimento.

Tabela 3. 10: pH, viscosidade aparente (Pa.s⁻¹) e sinérese durante a vida-de-prateleira para bebidas simbióticas fermentadas a base de soja.

Ensaio	0 dias				10 dias				20 dias				30 dias			
	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) 150s ⁻¹	CT (log UFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) 150s ⁻¹	CT (log UFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) 150s ⁻¹	CT (log UFC/mL)	pH	Sin. (%)	η_{ap} (Pa.s) 150s ⁻¹	CT (log UFC/mL)
1	5,2	9,19	0,015	8,31	4,4	11,03	0,015	8,83	4,3	11,03	0,013	8,61	4,1	14,71	0,013	8,74
2	5,1	7,35	0,012	8,18	4,5	11,03	0,011	8,48	4,2	12,87	0,010	8,93	4,1	12,87	0,011	8,82
3	4,6	12,87	0,011	8,43	4,4	14,71	0,009	8,47	4,3	14,71	0,010	8,38	4,2	14,71	0,010	8,77
4	4,9	9,19	0,011	8,14	4,5	11,03	0,010	8,36	4,3	13,79	0,010	8,70	4,2	16,55	0,010	8,48
5	4,8	11,03	0,009	8,05	4,5	14,71	0,008	8,12	4,4	16,55	0,010	8,22	4,4	16,55	0,008	8,49
6	5,0	9,19	0,011	8,18	4,9	14,71	0,010	8,20	4,5	16,55	0,011	8,85	4,4	18,38	0,011	8,41
7	5,1	9,19	0,011	8,03	4,7	16,55	0,009	8,10	4,8	16,55	0,009	7,75	4,3	22,06	0,009	8,65
8	5,1	11,03	0,009	7,88	4,6	11,03	0,009	8,09	4,5	11,03	0,009	8,08	4,3	14,71	0,011	8,34

* Sin.= Sinérese, η_{ap} = viscosidade aparente calculada a deformação $\dot{\gamma} = 150 \text{ s}^{-1}$ (para mastigação de alimentos), CT = Contagem total.

Tabela 3. 11: Contagem total (log UFC/mL) μ_x (h^{-1}) e Δx (UFC/mL) para bebida fermentada a base de soja durante a vida-de-prateleira.

Ensaio	%	Concentração das culturas ($\times 10^6$ UFC/mL)						μ_x (h^{-1}) Δx (log UFC/mL)		
		TA	LB	LAC	LBC	LR	BL	CT	LC	BL
1	0	0	0	5,5	1	5,5	5,5	0,0332	0,38	0,00
2	12	0	0	5,5	1	5,5	5,5	0,0867	0,46	0,10
3	0	0	1	5,5	1	5,5	5,5	0,0269	0,30 ¹	0,45
4	0	1	0	5,5	1	5,5	5,5	0,0644	0,42	1,00 ²
5	0	1	1	5,5	1	5,5	5,5	0,033	0,05 ¹	0,77 ²
6	12	0	1	5,5	1	5,5	5,5	0,0771	0,23 ¹	0,48
7	12	1	0	5,5	1	5,5	5,5	0,0494	0,61	0,63 ²
8	12	1	1	5,5	1	5,5	5,5	0,0315	0,33 ¹	0,31 ²

Sac: sacarose, TA: *Streptococcus thermophilus*, LB: *Lactobacillus bulgaricus*, LAC: *Lactobacillus acidophilus*, LBC: *Lactobacillus paracasei*, LR: *Lactobacillus rhamnosus*, BL: *Bifidobacterium longum*. * CT: Contagem Total, LC: *Lactobacillus* spp., BL: *Bifidobacterium longum*. ¹Incluí contagem de *Lactobacillus bulgaricus*, ²Incluí contagem de *Streptococcus thermophilus*

O alto valor obtido para variação de BL (ensaios quatro, cinco e sete) se deve ao fato de *Streptococcus thermophilus* também crescer em anaerobiose e pode não estar relacionado com um incremento do crescimento de *B. longum*. Dependendo da estirpe de *Streptococcus thermophilus* utilizada o cultivo dessas culturas juntas em bebidas fermentadas a base de soja não proporciona uma maior contagem (Champagne et. al., 2009), porém pode existir um melhor crescimento em relação as culturas de *L. acidophilus* e *L. paracasei* (Donkor et. al., 2005). A presença de *L. rhamnosus*, em bebida a base de soja contendo as culturas do iogurte não influencia no seu crescimento (Farnworth, 2007).

Baseando-se na contagem total, sinérese e viscosidade aparente, verifica-se que o ensaio realizado apenas com culturas probióticas e com adição de sacarose apresentou o melhor resultado.

Na Tabela 3.12 são apresentados os parâmetros reológicos da bebida obtidos a partir das curvas de escoamento e a viscosidade aparente calculada através da equação 2 apresentada anteriormente, taxa de deformação de $150 s^{-1}$.

Tabela 3. 12: Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,998$) para bebidas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira.

Ensaio	Dias	σ_0 (Pa)	k (Pa.s ⁿ)	n (-)	η_{ap} (Pa.s) ($\dot{\gamma}=150$ s ⁻¹)
1	0	0,2288	0,1396	0,5264	0,0145 ^a
	10	0,2947	0,1114	0,5662	0,0146 ^a
	20	0,2596	0,1118	0,5494	0,0134 ^b
	30	0,2838	0,1049	0,5568	0,0133 ^b
2	0	0,2180	0,0434	0,7119	0,0117 ^a
	10	0,2311	0,0366	0,7274	0,0109 ^b
	20	0,1981	0,0347	0,7343	0,0105 ^b
	30	0,1947	0,0348	0,7387	0,0107 ^b
3	0	0,1985	0,0649	0,6131	0,0107 ^a
	10	0,1763	0,0686	0,5747	0,0093 ^c
	20	0,1727	0,0677	0,5962	0,0101 ^b
	30	0,1944	0,0620	0,6108	0,0101 ^b
4	0	0,2382	0,0425	0,7047	0,0112 ^a
	10	0,1878	0,0601	0,6074	0,0097 ^c
	20	0,1705	0,0650	0,6025	0,0100 ^b
	30	0,1891	0,0611	0,6098	0,0099 ^b
5	0	0,2738	0,0121	0,9217	0,0087 ^b
	10	0,2493	0,0117	0,8789	0,0080 ^b
	20	0,5271	0,0056	1,2617	0,0099 ^a
	30	0,2543	0,0124	0,8732	0,0082 ^b
6	0	0,1790	0,0377	0,7221	0,0106 ^a
	10	0,1630	0,0362	0,7242	0,0102 ^b
	20	0,1810	0,0349	0,7365	0,0105 ^a
	30	0,1852	0,0347	0,7402	0,0107 ^a
7	0	0,2485	0,0107	0,9690	0,0106 ^a
	10	0,1436	0,0239	0,7816	0,0089 ^{bc}
	20	0,1121	0,0319	0,7226	0,0087 ^c
	30	0,1358	0,0304	0,7393	0,0091 ^b
8	0	0,2422	0,0098	0,9508	0,0092 ^a
	10	0,2605	0,0078	0,9971	0,0092 ^a
	20	0,2524	0,0065	1,0620	0,0094 ^a
	30	0,2895	0,0056	1,1031	0,0106 ^a

* σ_0 =Tensão inicial de cisalhamento (Pa), k= índice de consistência, n= índice de escoamento, η_{ap} = viscosidade aparente calculada a deformação $\dot{\gamma}=150$ s⁻¹ (para mastigação de alimentos). * letras iguais na mesma amostra indicam que não há diferença significativa entre os diferentes dias de armazenamento pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Analisando os parâmetros encontrados pode-se observar que todas as amostras apresentaram-se como fluido Herschel-Bulkley. Essa característica não

foi alterada durante a vida-de-prateleira, e houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais ($R^2 > 0,9999$). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos para os ensaios do planejamento Plackett & Burman.

Os resultados foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), demonstrando uma variação na viscosidade aparente, em alguns ensaios, apresentando um pequeno declínio durante o período de estocagem, esse comportamento foi diferente do obtido para os ensaios do planejamento Plackett & Burman, que apresentaram um aumento. Essa diferença na variação da viscosidade durante o período de estocagem pode estar associada a uma maior velocidade específica de crescimento que variou de 0,0269 a 0,0867 (Pa.s) e sinérese de 7,35 a 22,06%, obtidos nesses novos experimentos. No planejamento Plackett & Burman a velocidade específica de crescimento apresentou valores entre -0,0244 e 0,0684 e sinérese de 1,84 a 11,03 %.

Na Tabela 3.13 são apresentados os resultados do consumo de FOS, que foi quantificado conforme descrito anteriormente.

Tabela 3. 13: Concentração de fruto-oligossacarídeos (FOS) (g/L) durante a vida-de-prateleira.

Ensaio	Concentração de FOS		
	Inicial (g/L)	Final (g/L)	Consumo (%)
1	16,61	3,53	78,75
2	21,37	5,37	74,87
3	16,50	3,53	78,58
4	17,20	4,60	73,23
5	15,59	5,72	63,31
6	23,26	10,81	53,51
7	21,33	8,85	58,49
8	24,87	10,85	56,35

O valor inicial de FOS apresenta uma variação entre os ensaios, apesar de ter sido acrescentado concentrações iguais de fruto-oligossacarídeos, durante a fermentação ele é consumido em proporções diferentes.

Observando a concentração de FOS inicial e final, pode-se verificar que durante a estocagem continua havendo consumo. Esse consumo diminui com a adição de sacarose, e quando se adiciona o *Streptococcus thermophilus*, porém de uma forma menos expressiva. A adição somente do *Lactobacillus bulgaricus* não modificou o consumo de FOS, mas quando foi adicionado com *Streptococcus thermophilus*, houve uma diminuição significativa.

Essa variação na concentração pode ser observada na Figuras 3.3 e 3.4, que correspondem respectivamente ao valor inicial e final do ensaio 8.

Mesmo com a adição de sacarose e das culturas do iogurte as concentrações finais foram baixas ao final de trinta dias de estocagem. O maior valor observado foi de 10,85%, garantido as características prebióticas, porém não podendo conter a alegação de rico em fibra, pois para isso é necessário haver um mínimo de 3% de oligossacarídeos.

No planejamento Plackett & Burman foi obtido um valor final de 21,14%, para a maior concentração, porém o menor valor apresentado foi de 0,48%, muito inferior aos encontrados nesse experimento.

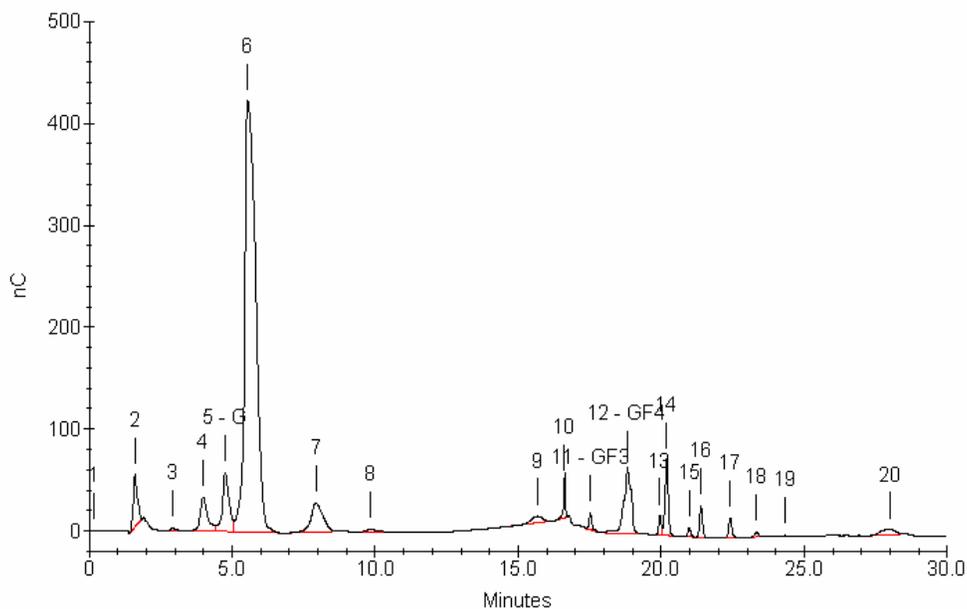


Figura 3. 3: Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 8 da bebida simbiótica a base de soja no início da vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutosilnistose).

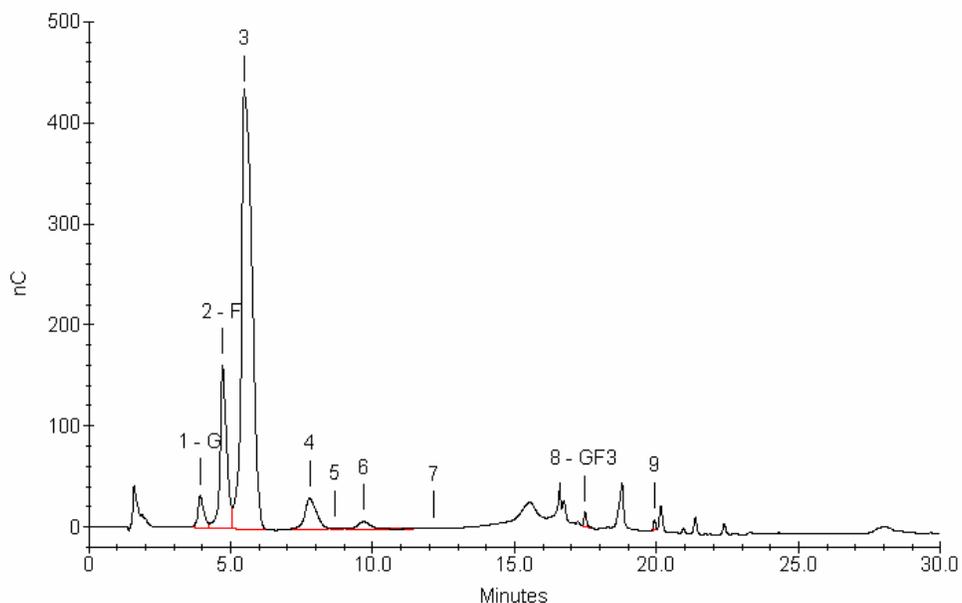


Figura 3. 4: Exemplo de cromatograma de açúcares do ensaio 8 da bebida simbiótica a base de soja após 30 dias de vida-de-prateleira. G (glicose), F (frutose), GF (sacarose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutossilnistose).

As concentrações de ácido láctico e acético produzidos durante a vida-de-prateleira são apresentadas na Tabela 3.14. Como pode-se observar, houve um aumento gradual de ambos os ácidos durante todo o período de armazenamento em todos os ensaios, o que era de se esperar já que continuou havendo um crescimento dos micro-organismos. Observações semelhantes foram relatadas por Akalin et. al. (2007).

Tabela 3. 14: Concentração de ácidos acético e láctico (g/L) em bebidas fermentadas a base de soja durante a vida-de-prateleira.

Ensaio	Ácido láctico (g/L)				Ácido acético (g/L)			
	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias
1	4,86	9,72	14,87	14,64	0,63	0,80	0,90	0,90
2	5,69	7,83	13,00	14,44	0,61	0,73	0,76	0,77
3	7,59	9,85	11,06	13,98	0,75	0,76	0,82	0,85
4	7,41	10,47	12,87	14,53	0,43	0,54	0,60	0,75
5	7,53	9,45	10,31	11,69	0,42	0,46	0,49	0,63
6	5,72	6,75	9,03	8,92	0,54	0,58	0,57	0,63
7	5,96	7,22	8,51	11,23	0,40	0,42	0,45	0,49
8	6,55	8,66	9,91	11,43	0,38	0,41	0,46	0,49

Apesar de haver um aumento dos ácidos durante a vida-de-prateleira, a concentração de ácido acético manteve-se em níveis mais baixos e menores que a do láctico, sendo uma característica ideal para esse tipo de bebida, pois não prejudica o sabor, como dito anteriormente.

De uma forma geral, as produções seguiram as mesmas tendências encontradas nas fermentações anteriores. As maiores concentrações de ácido láctico foram obtidas para os ensaios que apresentaram um maior crescimento dos lactobacilos, e quando adicionado a cultura de *Streptococcus thermophilus* (ensaio 4), o que está de acordo com resultado obtido por Wang, (2003), que observou a produção de ácidos dessas culturas separadamente, verificando que a produção de ácido láctico foi maior para *Streptococcus thermophilus*.

3.4 – Conclusão

A bebida apresentou mudanças em suas características durante o período de estocagem dependendo das condições em que foram realizadas as fermentações, sem comprometer sua qualidade.

A soja se apresentou como um bom substrato para o crescimento dos probióticos, podendo ser utilizada no processo de produção da bebida fermentada na maior concentração estudada. Os fruto-oligossacarídeos são consumidos durante a vida-de-prateleira, e caso o produto contenha a alegação de rico em fibra, estes deverão ser adicionados em uma quantidade tal que compense o que é consumido pelos micro-organismos. Por outro lado, na adição da soja e FOS deve haver um cuidado especial, pois os resultados deste trabalho mostram que a medida em se aumenta à concentração desses compostos há um aumento da sinérese.

Durante o armazenamento da bebida sob refrigeração, verificou-se que os probióticos apresentam crescimento, mantendo concentrações de células acima do exigido pela legislação, podendo ser adicionados na concentração de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL. A temperatura do processo (34 a 40 °C) deve ser mantida em valores mais baixos, pois temperaturas mais elevadas causam uma diminuição na

velocidade específica de crescimento, contagem total e um aumento da sinérese durante a vida-de-prateleira.

A adição de sacarose ao processo provocou um menor consumo dos fruto-oligossacarídeos, podendo ser adicionado para manter os FOS em concentrações mais elevadas ao final da fermentação. O uso das culturas de *Lactobacillus bulgaricus*, e *Streptococcus thermophilus*, não causou grande variação no pH, e manteve as contagens finais dentro da concentração exigida, embora um pouco menores. No entanto, não apresentaram nenhuma vantagem em relação ao produto contendo somente probióticos, nos aspectos estudados neste trabalho, devendo ser excluídas deste tipo de produto.

Em relação às características reológicas os ensaios apresentaram-se como fluído Herschel-Bulkley, caracterizado pela presença de uma tensão inicial, e relação entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação não linear. Essa característica manteve-se constante durante a vida-de-prateleira.

As condições que apresentaram melhor estabilidade durante a vida-de-prateleira foram em concentrações de soja 10 %, FOS 3 %, sacarose 12 %, probióticos $5,5 \times 10^6$ UFC/mL e temperatura em torno de 35°C.

3.5 – Referência Bibliográfica

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde**. Resolução RDC No. 2, 7 de janeiro de 2002.

AGUIAR-OLIVEIRA, E. Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**. v. 6, n. 3, p. 2010.

AKALIN, A. S., GONÇ, S., UNAL, G., FENDERYA S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 7, 2007.

ANTUNES, A. E. C., CAZZETO, T. F., BOLINO H. M. A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2004.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. v. 4.

CHAMPAGNE, C. P., GREEN-JOHNSON J., RAYMOND, Y., BARRETE J., BUCKLEYN. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**. v. 42, p. 612-621, 2009.

CRITTENDEN, R.G., MORRIS, L.F., HARVEY, M.L., TRAN, L.T., MITCHELL H.L., PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yogurt. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 268-278, 2001.

CRUZ, A. G., WALTER, E. H. M., CADENA, R. F., FARIA, J. A. F., BOLINI H. M. A., PINHEIRO, H. P., SANT'ANA, A. S. Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. **Food Research International** v. 43, p. 1444–1448 2010.

CUNHA T. M., CASTRO F. P., BARRETO P. L. M., BENEDET, H. D., PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DONKOR, O. N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIC, T., & SHAH, N. P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt. **Journal of Food Science**, 70, M375–M381, 2005.

DONKOR O. N., NILMINI, S. L. I., STOLIC, P., VASILJEVIS, T., SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 657- 665, 2007.

FARNWORTH, E. R., MAINVILLE, I., DESJARDINS, M. P., GARDNER, N., FLISS, I., CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 174–181, 2007.

GOMES R. G., PENNA, B. A. L. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 30, n. 3, p. 629-646, 2009.

HAQUE, A., RICHARDSON, R. K., MORRIS, E. R. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. **Food Hydrocolloids**. v. 15 p 593-602, 2001.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com fruto-oligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 18, n. 5, 2005.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja**. Campinas, 2009. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes prebióticos e probióticos**. Campinas, 2004. Dissertação(Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MOURA, S. C. S. R., GERMER, S. P. M. **Reações de Transformação e Vida-de-Prateleira de Alimentos processados** - Manual Técnico No. 6. Terceira edição. Campinas: ITAL, 2004, 92 p.

PENNA, A. L. B., SIVIERI, K., OLIVEIRA, M. N., Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**. v. 49, p. 7-13, 2001.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2 ed. Campinas, SP: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SANDERS M. E. Overview of Functional Foods : Emphasis on Probiotic Bacteria. **Int. Dairy Journal**. v. 8, p. 341 – 347, 1998.

VINDELORA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of Lactobacillus casei in the presence of L. acidophilus, bifidobacteria and starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**. v. 10, p. 271-275, 2000.

VINDEROLA, C.G., BAILO, N., REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**. v. 33 p. 97-102, 2000.

WANG Y.C., YU R. C., YANG H. Y., CHOU, C. C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobactérias. **Food Microbiology** v. 20, p. 333–338, 2003.

YEO, SIOK-KOON, LIONG, MIN-TZE. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 61, n. 2, p. 161–181, 2010.

ZACARCHENCO, P. B., MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.

Conclusões Gerais e sugestões para trabalhos futuros

O processo de fermentação de bebida simbiótica a base de soja, é influenciado pelas concentrações do extrato hidrossolúvel de soja, de frutoolígosacarídeos, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e pela temperatura. Esses fatores influenciam também a vida-de-prateleira da bebida que mesmo estando estocada sob refrigeração apresenta variações em suas características.

A soja apresentou um bom substrato para o crescimento dos probióticos, podendo ser utilizada no processo de produção da bebida fermentada na maior concentração estudada. Os fruto-oligosacarídeos são consumidos durante a fermentação, e caso o produto contenha a alegação de rico em fibra, estes deverão ser adicionados no final do processo, ou em concentração mais elevada. Os probióticos apresentaram um bom crescimento obtendo no final a concentração de células acima do exigido pela legislação e contribuíram para manutenção das características simbiótica do produto.

A adição de sacarose ao processo provocou um declínio mais acentuado no pH e um menor consumo de fruto-oligosacarídeos, podendo ser adicionado para manter os FOS em concentrações mais elevadas ao final da fermentação. O uso das culturas de *Lactobacillus bulgaricus*, e *Streptococcus thermophilus*, não causou mudanças notáveis no pH, e manteve as contagens finais dentro da concentração exigida, embora um pouco menores. No entanto, não apresentaram nenhuma vantagem em relação ao produto contendo somente probióticos, nos aspectos estudados neste trabalho, podendo ser excluídos.

Diante dos resultados obtidos no estudo da fermentação e vida-de-prateleira da bebida simbiótica a base de soja, pode-se concluir que para obtenção de um produto com maior qualidade ao final da fermentação e que mantenha suas características durante a vida-de-prateleira deve-se utilizar, de acordo com a faixa estudada, as seguintes condições de processo: temperatura mais baixa (em torno de 35°C), fruto-oligosacarídeos 3% e sacarose 12%, que devem ser acrescentados ao final da fermentação, extrato hidrossolúvel de soja a 10%, e

concentração dos probióticos de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL, exceto para *L. paracasei* que deve ser de 1×10^6 UFC/mL.

Como proposta para trabalhos futuros sugere-se: a realização de testes sensoriais da bebida com as formulações estudadas neste trabalho adicionadas de saborizantes, e com a adição das culturas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* para observar se ocorre alguma melhora nas características sensoriais do produto. Realização de um planejamento experimental estatístico, Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com base nos resultados obtidos neste trabalho, para otimização do processo. Desenvolvimento de estudos *in vivo*, particularmente com humanos voluntários, para verificar as alegações funcionais e terapêuticas.