



DISSERTAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA FERMENTADA
A PARTIR DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA, CONTENDO AGENTES
PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS.

OLGA LUCÍA MONDRAGÓN BERNAL
Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

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

CAMPINAS, ABRIL DE 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Orientador

Dr^a. ALDA LUIZA LERAYER
Membro

Prof^a. Dr^a. HÉLIA HARUMI SATO
Membro

Prof^a. Dr^a. MARIA ISABEL RODRIGUES
Suplente

*...Vibración: fuego y luz, Verbo del Padre,
Materia densa de la Madre Tierra,
Aire y agua con dones proteíformes;
La espiral de la vida allí comienza...*

Yamile Alberd
(El cuaternario de la creación)

*...Y al coronar
Una empinada cumbre de tu vida
Que escalaste con fuerza e hidalguía,
Con valor, con tezón, con humildad,
Vislumbras el darear de un nuevo día,
Y un horizonte de luz e inmensidad.*

*Hoy como ayer los faros ancestrales:
La Fé, la Esperanza y el Amor.
Que nuestra infancia feliz, iluminaron
Bajo el alero del techo paternal;
Seguirán siendo tu guía y derrotero
La suave brisa que impulsa tu velero
Y que enriquece la miel de tu panal.*

Yamile Alberd

*Dedico este trabalho aos
meus pais Eduardo e Alicia.
Agradeço a Deus por existirem
e por seu grande e infinito amor.*

*Aos meus irmãos
Nohora, Nelson, Javier e Ivan.
À minha tia Stella.
À Natália Isabel.
Obrigada pelo amor, orientação,
vivências, compreensão e apoio permanente
em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMIENTOS

Ao professor Dr. Francisco Maugeri e à professora Dra. Maria Isabel Rodrigues, por sua orientação, constante incentivo, compreensão, e agradeço por todas as facilidades que me foram concedidas para a realização deste trabalho. Pela generosidade, solidariedade e altruísmo que possuem, por isso os respeito grandemente.

À Dra. Fátima Costa, Fifa, por suas excelentes e oportunas orientações, colaboração, dedicação, paciência e amizade; admiro seu dom de gente, no sentido de ser uma pessoa boa, gentil e querida.

À banca examinadora: Dra. Alda Lerayer, Dra. Hélia Harumi, Dra. Maria Isabel, pelas excelentes sugestões e oportunas correções para este trabalho. Igualmente ao prof. Dr. Marcelo Cristianini, pelas suas orientações e colaboração durante a qualificação e execução do projeto.

À Rodhia e Olvebra Industrial, respectivamente, pelo fornecimento das culturas liofilizadas dos probióticos e extrato de soja em pó, empregados neste estudo.

À Capes e CNPq pelo financiamento parcial do projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp: Saartje, Fernanda, Yemiko, Lia e Bernardo, especial agradecimento pelo apoio, companheirismo e boas dicas; Luciano, Helen, Eliana, Daniel, Eduardo, Rodrigo, Rafael, Thyane, Ligia, Fernanda, pela acolhida no LEB, e por compartilhar seus conhecimentos e experiências. À aluna Carla pelo trabalho realizado na sua temporada pelo LEB.

Aos professores do mestrado Florência Menegalli, Fernanda Murr, Antonio José Meirelles, Maria Ângela Meirelles, Rosiane López da Cunha, Satoshi Tobinaga, Enrique Ortega, Fernando Cabral, por seus valiosos conhecimentos, apoio e amizade. Igualmente aos funcionários do departamento e à faculdade de Engenharia de Alimentos.

Aos meus queridos cunhados Rafael, Eliana, Swinda, e a Juanito. Um agradecimento muito especial a todos pelo seu carinho e apoio.

A Zé Guilherme: você sabe o quanto significa para mim...obrigada sempre, pelos momentos tão felizes, por estar ao meu lado, me dar força, e também grandes motivos e razões para continuar; por sua orientação, companhia e amor. Obrigada por fazer do Brasil um país tão amado quanto o meu. Admiro-o e amo-o profundamente.

A Dona Zélia, por quem sinto um grande carinho e admiração. Ao Marcelo, Vânia, Marcos, Patrícia, Luiza, Otávio, e todos os Lembi e agregados, considero vocês minha família aqui no Brasil. Sou muito agradecida pelo carinho, acolhimento e tão prezados momentos compartilhados.

Às minhas grandes e queridas amigas: Cinthia, Kassandra, Maria, Severina, Ana, pelo grande apoio, amizade, pelos valiosos e importantes momentos compartilhados, pela ajuda e paciência com meu 'portuñol', pelas ótimas conversas, confidências, risos e lágrimas, pelos lanches, almoços e cafezinhos gostosos. Todas ocupam um lugar muito especial no meu coração. À Eliana e Genésio, por sua amizade, apoio, ajuda e o tempo compartilhado.

Aos meus amigos, colegas do mestrado e patricios: Jaqui, Paulo, César, Delia, Harold, Elias, Raggi, Maria Inês, Aléxis, Eliza, Ulisses, Eliana Janet, Jairo, Alfredo, David, Nadra, Alejandra, Rossana, Honorato, Mary, às gurias e gurus Lucielen, Tati, Beatriz, Camila, Márcia, Eliane, Otávio e Machadinho. Tem sido muito bom conhecer vocês e compartilhar momentos de amizade, estudo, festas, risos, alegrias e tristezas. Um agradecimento especial a Dora e Alfredo, por sua amizade, pela ajuda com o meu trabalho e pelos bons momentos compartilhados em festas caribenhas, churrascos e baralho. A Alfonso, Pilar e Laurinha por seu desinteressado apoio, por abrir as portas da sua casa e me acolherem; obrigada pela guia e o tempo dedicado durante minha chegada ao Brasil.

A todos meus amigos na Colômbia, da Tadeo, UN, UPTC, UNAD e Colboy: Elizabeth G., Leonardo e à memória das minhas queridas amigas Gineth e Lilianas. À Elizabeth M., Julita, Lili, Pacho; à Sonia, Hernán, Stellita, Claudia; à Nelly, Germán, Omar, Julian, Fabio, Raules, Ricardo, Fernando; à Pilar, Nancy, Marisol, Juan Carlos; à Jacky, Lina, Laura e Angélica. Aos meus tios da casta Mondragón Castañeda, 'abuelitos' Barbarita e Elias (qepd), a Néstor e Cecília, aos meus 'primazos' e 'primitos', amigos, colegas e vizinhos em Tunja, Bogotá, Campinas, Belo Horizonte e arredores, por suas ligações, cartas, e mensagens de força e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XXVII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 PROBIÓTICOS.....	7
3.1.1 Definições.....	7
3.1.2 Ecologia do trato gastrointestinal humano.....	8
3.1.3 Importância dos probióticos.....	10
3.1.4 Características.....	10
3.1.5 Fatores que afetam a viabilidade dos probióticos.....	15
3.1.6 Quantificação simples, confiável e seletiva de <i>Bifidobacterium</i> e de <i>Lactobacillus</i>	16
3.1.7 Potencialidade de contagem seletiva dos meios.....	17
3.2. PREBIÓTICOS.....	18
3.2.1 Definição.....	18
3.2.2 Características dos prebióticos.....	18
3.2.3 Frutooligosacarídeos – FOS.....	19
3.3 PRODUTOS SIMBIÓTICOS.....	22
3.4 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA.....	24
3.5 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO.....	26
3.5.1 Fermentação láctica.....	26
3.5.2 Tecnologia das culturas starter.....	28
3.5.3 Procedimentos para formulação de produtos com probióticos.....	29
3.5.4 Produtos do mercado mundial com probióticos e prebióticos.....	31
3.5.5 Patentes.....	35
3.5.6 Regulamento para produtos a base de leite fermentado.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.1.1 Matéria prima.....	37
4.1.2 Culturas probióticas.....	37
4.1.3 Meios de cultura.....	37
4.2 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO.....	38
4.2.1 Determinação da concentração de células dos microrganismos liofilizados.....	38
4.2.2 Avaliação da potencialidade de contagem e seleção dos meios.....	38
4.2.3 Preparação do inóculo.....	39
4.2.4 Preparação das bebidas fermentadas de extrato hidrossolúvel de soja.....	39
4.2.5 Planejamento experimental para obtenção da bebida fermentada de soja contendo probióticos e prebióticos.....	42
4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	42
4.3.1 Quantificação de probióticos totais e específicos.....	42
4.3.2 PH.....	43
4.3.3 Determinação de Açúcares Redutores e Totais (ART).....	43
4.3.4 Determinação de Brix.....	44
4.3.5 % Acidez total titulável (expressa como % de Ácido láctico):.....	44
4.3.6 Determinação da atividade enzimática.....	44
4.3.7 Determinação de carboidratos por cromatografia de íons (HPLC-PAD).....	44
4.3.8 Determinação de ácidos orgânicos e carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS NAS CULTURAS LIOFILIZADAS DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	47

5.2 SELETIVIDADE DOS MEIOS PARA CONTAGEM DIFERENCIADA DE PROBIÓTICOS	50
5.2.1 Agar <i>MRS-LP</i>	50
5.2.2 Agar <i>MRS-CDAC</i>	51
5.3 TESTE PRELIMINAR DO CRESCIMENTO DE PROBIÓTICOS EM EXTRATO DE SOJA	53
5.4 DESENVOLVIMENTO DE PROBIÓTICOS EM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA EM PRESENÇA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRE BIÓTICOS.	59
5.4.1 Contagem de células do inóculo.....	59
5.4.2 Quantificação de carboidratos em xaropes de açúcares contendo <i>FOS</i> preparado como substrato de enriquecimento do extrato hidrossolúvel de soja.....	59
5.4.3 Caracterização do extrato hidrossolúvel de soja	60
5.4.4 Cinéticas de crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja.....	62
5.4.5 Crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja, com adição de frutooligossacarídeos, <i>FOS</i>	67
5.4.6 Análise qualitativa dos açúcares, oligossacarídeos e frutooligossacarídeos durante o crescimento de probióticos em extrato de soja.	72
5.4.7 Análise qualitativa dos ácidos láctico e acético durante o crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja.....	75
5.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE SOJA QUE CONTENHA AGENTES PROBIÓTICOS E PROBIÓTICOS.....	76
6. CONCLUSÕES	83
FUTUROS DESENVOLVIMENTOS E PESQUISAS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

	PAG.
Figura 1. (A) Microfotografia de bifidobactérias e microflora aderidos ao epitélio intestinal (B) Esquema da localização de espécies de probióticas no sistema digestivo humano	9
Figura 2. Correlações entre bactérias intestinais e saúde humana. Esquema proposto por Mitsouka	11
Figura 3 . (A) <i>Lactobacillus</i> spp. (B) Morfologia celular da espécie <i>Lactobacillus rhamnosus</i> de Danisco.	13
Figura 4. (A)Morfologia celular da espécie <i>Bifidobacterium lactis</i> da Danisco (B) <i>Bifidobacterium longum</i> BB 536 Morinaga Milk Industry Co.	14
Figura 5. Estrutura química de varios frutooligosacarídeos.	20
Figura 6 - Composição centesimal na produção de xarope com FOS, glicose sacarose e frutose em função do tempo de retenção na coluna de leito fixo	22
Figura 7. Vías metabólicas na produção de ácido láctico por bactérias	27
Figura 8. Fotografias de placas para contagem dos probióticos.	48
Figura 9. Fotografias de diferentes perfis das colônias	48
Figura 10. Fotografias das colônias de misturas de microrganismos	49
Figura 11. Representação do crescimento individual e em mistura de <i>B. longum</i> BL04 (BL), <i>L. acidophilus</i> LAC4 (LAC), <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 (LBC) em extrato hidrossolúvel de soja a 37°C em Agar MRS.	55
Figura 12. Representação da variação dos açúcares redutores e °Brix durante a fermentação individual e em mistura de <i>B. longum</i> BL04 (BL), <i>L. acidophilus</i> LAC4 (LAC), <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 (LAC), em extrato hidrossolúvel de soja a 37°C.	58
Figura 13. Representação da variação do pH e acidez titulável durante a fermentação individual e em mistura de <i>B. longum</i> BL04(BL), <i>L. acidophilus</i> LAC4 (LAC), <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 (LBC) em extrato hidrossolúvel de soja a 37°C.	58
Figura 14. Crescimento das linhagens de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. acidophilus</i> LAC4, <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 em cultura pura e em mistura, em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37°C.	65
Figura 15. Crescimento dos microrganismos em extratos hidrossolúveis de soja 7,5% fermentados a 37 °C com misturas de <i>B. longum</i> BL04 com <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81(A) e mistura de <i>B. longum</i> BL04 com <i>L. acidophilus</i> LAC4(B).	65
Figura 16. Crescimento dos microrganismos em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% fermentados a 37 °C com misturas de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81.	65
Figura 17. Alteração do pH (A), açúcares redutores (B) e açúcares redutores totais, ART (C) durante a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37°C utilizando culturas puras e misturas de <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81, <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>B. longum</i> BL04.	66

Figura 18. (A) crescimento dos microrganismos nos extratos hidrossolúveis de soja contendo FOS usando mistura de <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 e <i>B. longum</i> BL04; de <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>B. longum</i> BL04 e de <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81, <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>B. longum</i> BL04. (B), (C) e (D) crescimento diferenciado dos microrganismos presentes nos extratos hidrossolúveis de soja contendo FOS descritos em (A), respectivamente.	69
Figura 19. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 e <i>B. longum</i> BL04.	70
Figura 20. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>B. longum</i> BL04.	71
Figura 21. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81, <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>B. longum</i> BL04.	71
Figura 22. Carboidratos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % durante fermentação com <i>B. longum</i> BL04. Os cromatogramas das amostras de 0 a 24 horas de fermentação foram sobrepostos.	72
Figura 23. Carboidratos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % (A) sem, (B) com adição de FOS, durante fermentação com mistura de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 e <i>L. acidophilus</i> LAC4. Os cromatogramas das amostras de 0 a 24 horas de fermentação foram sobrepostos.	72
Figura 24. Cromatograma dos carboidratos e ácidos orgânicos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5% fermentado com <i>B. longum</i> BL04 após 24 horas de fermentação.	76
Figura 25. Diagrama de pareto para a resposta contagem total de probióticos a 90 % de confiança pela análise do erro puro.	79
Figura 26. Diagrama de pareto para a resposta contagem de <i>B. longum</i> BL04 a 85 % de confiança pelo análise do erro puro.	80

LISTA DE TABELAS

	PAG.
Tabela 1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídas às bactérias probióticas em humanos.	12
Tabela 2. Exemplos de bactérias ácidoláticas para consumo humano.	12
Tabela 3. Composição Química de 'leite de soja' e leite de vaca (g/100g). Aminoácidos g/16 g de N. Açúcares em mg/L. Vitaminas (mg/100mL)	25
Tabela 4. Contagem experimental e calculada dos envelopes de probióticos liofilizados em agar MRS + 0,01% de azul de anilina por 72 horas a 37°C.	47
Tabela 5. Contagem de células em extratos hidrossolúveis de soja, fermentado com as culturas puras ou misturas de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. acidophilus</i> LAC4 e <i>L. paracasei</i> LBC81, utilizando placas Agar MRS-LP e Agar MRS em condições aeróbias ou anaeróbias.	51
Tabela 6. Contagem de células de <i>L. paracasei</i> LBC81 e misturas <i>L. acidophilus</i> LAC4/ <i>B. longum</i> BL04 e <i>L. paracasei</i> LBC81 / <i>B. longum</i> BL04 em extratos hidrossolúveis de soja fermentado a 37 °C em placas de Agar MRS-CDAC e Agar MRS em condições aeróbicas e anaeróbicas.	52
Tabela 7. Desenvolvimento das linhagens de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. paracasei</i> LBC81 e <i>L. acidophilus</i> LAC4, em cultura pura e em mistura durante a fermentação em extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v) a 37 °C.	54
Tabela 8. Consumo de açúcares e produção de ácidos por células de <i>B. longum</i> BL04, <i>L. paracasei</i> LBC81 e <i>L. acidophilus</i> LAC4 em cultura pura e em mistura durante fermentação do extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v) a 37 °C.	57
Tabela 9. Contagem de células em UFC/mL dos inóculos padronizados em diluições decimais, obtidos a partir dos probióticos liofilizados concentrados, em Agar MRS + 0,1% de azul de anilina a 37 °C	59
Tabela 10. Composição centesimal dos xaropes de açúcares e FOS sintetizados a partir de enzima inulinase imobilizada de <i>K. marxianus</i> a partir de uma solução com 50 % sacarose a pH 5,0 a 50 °C por 5 horas.	60
Tabela 11. Valores de pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) em g/L de extrato de soja com e sem adição de xarope de açúcares.	60
Tabela 12. Crescimento de probióticos das culturas puras <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (LBC 81), <i>L. acidophilus</i> (LAC 4) e <i>B. longum</i> (BL 04) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.	62
Tabela 13. Crescimento da mistura de probióticos <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>B. longum</i> BL 04 e <i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04 em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.	64
Tabela 14. Crescimento da mistura de probióticos <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04 em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.	64

Tabela 15. Crescimento dos microrganismos, alteração no pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% contendo 25 g/L de Xarope com FOS fermentados a 37°C com misturas de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>B. longum</i> BL 04 e <i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04.	67
Tabela 16. Crescimento de probióticos <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (LBC 81) / <i>L. acidophilus</i> (LAC 4) / <i>B. longum</i> (BL 04) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% + 25 g/L de Xarope com FOS a 37 °C, e mudanças no pH e açúcares redutores e ART.	68
Tabela 17. Valores dos níveis codificados utilizados no Plackett & Burman.	77
Tabela 18. Planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios	77
Tabela 19. Resultados dos ensaios do planejamento Plackett & Burman	78
Tabela 20. Estimativa dos efeitos para a contagem total de probióticos.	79
Tabela 21. Estimativa dos efeitos para a contagem de <i>B. longum</i> BL04	80
Tabela 22. Estimativa dos efeitos para a contagem de <i>L. acidophilus</i> LAC4	81
Tabela 23. Estimativa dos efeitos para a contagem de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC4.	81
Tabela 24. Estimativa dos efeitos para a resposta tempo de fermentação.	82

APÊNDICE

	PAG.
Apêndice 1. Meios seletivos para numeração de probióticos	93
Apêndice 2 Composição do meio de cultura MRS (Man,Ragosa,Shape)	94
Apêndice 3.	95
3.1 Exemplos de alimentos fermentados de soja.	
3.2 Estrutura química dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes na soja.	
3.3 Ficha técnica do extrato de soja em pó da Olvebra Industria S/A	96
Apêndice 4. Alguns exemplos de produtos lácteos probióticos disponíveis no mercado mundial	97
Apêndice 5. Resumo de algumas patentes de produtos relacionados com probióticos e prebióticos.	98
Apêndice 6. Cromatogramas dos padrões, cinéticas das fermentações dos probióticos em extrato de soja e alguns ensaios do planejamento experimental P&B.	99

RESUMO

Probióticos e prebióticos são produtos funcionais e nutracêuticos, que beneficiam a saúde mantendo o balanço da flora intestinal, reduzindo a má absorção da lactose, aumentando a proteção contra infecções intestinais, entre outros. Os primeiros são microrganismos vivos adicionados na dieta e os prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis e que seletivamente favorecem o crescimento de bactérias benéficas. Alimentos que contêm pró e prebióticos são denominados simbióticos. O extrato hidrossolúvel de soja contém os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, considerados como prebióticos ao estimular o crescimento de probióticos, sendo uma alternativa de consumo para pessoas que apresentam alergias e/ou distúrbios pela ingestão de leite. Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um alimento à base de extrato de soja contendo bifidobactérias, lactobacilos e prebióticos em simbiose. Para obter um efeito terapêutico ótimo, estima-se que o alimento deva conter um número maior de 10^7 UFC/mL de probióticos.

Neste trabalho, foram realizados os seguintes estudos: i) determinação da metodologia para a contagem diferenciada de probióticos, ii) desenvolvimento de algumas espécies de probióticos (*Bifidobacterium longum* BL04, *Lactobacillus acidophilus* LAC4 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC81) em cultura pura e em mistura, em extrato hidrossolúvel desengordurado de soja, com e sem adição de frutooligossacarídeos e, iii) avaliação do processo e formulação da bebida de soja contendo pró e prebióticos através de um planejamento experimental Plackett & Burman. No primeiro item os meios MRS, MRS-LP e MRS-CDAC foram testados. Verificou-se que os meios não foram seletivos para os microrganismos neste estudo. Elegeram-se a metodologia de contagem por diferença de crescimento do número de colônias em condições de aerobiose e anaerobiose, e as colônias misturadas por diferencia morfológica em Agar MRS+ 0,1 % de azul de anilina. No segundo item verificou-se que as culturas puras de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04 têm ótimo crescimento em extrato hidrossolúvel de soja, atingindo contagem de células de 10^{12} - 10^{13} UFC/mL entre 16 e 20 horas de fermentação. Evidenciou-se que *L. acidophilus* LAC4 na presença de *B. longum* BL04, teve incremento na sua contagem de células atingindo entre 10^{10} - 10^{13} UFC/mL entre 20 e 24 horas de fermentação. Concluiu-se que o extrato hidrossolúvel de soja é um excelente meio para cultivo de probióticos através da fermentação láctica e de bifidobactérias. Os probióticos e misturas consomem os açúcares e oligossacarídeos provenientes tanto da soja como do xarope adicionado como fonte de carbono, produzindo ácido láctico com leve produção do acético, o que sensorialmente é benéfico. No terceiro item, o número mais elevado de células de microrganismos probióticos em extrato hidrossolúvel de soja foi obtido nas condições de 37 °C, na proporção de 40/60 de *L. acidophilus* + *L. paracasei* / *B. bifidum*, inóculo de 5×10^5 UFC/mL, 20 g/L de Xarope com 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato de soja desengordurado, para um total de 17,75 horas de fermentação, atingindo um pH de 5,03 e uma população final maior que 10^9 UFC/mL.

Palavras chaves: probióticos, prebióticos, extrato hidrossolúvel de soja, bifidobactérias, lactobacilos, frutooligossacarídeos.

SUMMARY

Probiotics and prebiotics are functional and nutraceuticals foods, that contribute to the health and balance of the intestinal tract, reducing the bad absorption of the lactose, increasing the protection against intestinal diseases and so on. Probiotics are live microbial additions to the diet; prebiotics are foodstuffs that have a selective metabolism in the hindgut, whilst symbiotic foods are combinations of the two approaches. Soymilk is the water extract of soybeans and contains natural oligosaccharides, such as raffinose and stachyose, considered as prebiotics when stimulating the growth of probiotics. Soymilk is an alternative base for a variety of beverages for people who present allergies and/or illnesses for the milk ingestion. The goal of this work was to develop a soy base beverage containing bifidobacteria, lactic acid bacteria and prebiotics in symbiosis. Therefore, in order to produce an excellent therapeutical effect, the goal of a probiotic population higher than 10^7 CFU/mL is important, as it has been reported.

In this work, the following studies had been carried through: *i*) tests of culture media for counting of the different probiotics, *ii*) the behaviour of *Bifidum longum* BL04, *Lactobacillus acidophilus* LAC4 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 probiotic species, supplied by Rhodia, were studied as pures or in co-culture, in fat-free water extract of soybeans (Olivebra Industrial/Brazil), with and without the supplementation of other prebiotics (such as fructooligosaccharides), with the goal to obtain probiotics in high and viable numbers in soymilk, and, *iii*) evaluation of fermentative process and the formularization of the soymilk beverage containing probiotics and prebiotics using a Plackett & Burman experimental design. In the first study MRS, MRS-LP and MRS-CDAC media were tested under aerobic and anaerobic conditions. It was observed that the media were not selective for the tested bacteria. A counting methodology based on both the difference between the number of colonies in aerobic and anaerobic conditions and the aerobic colony morphological aspects was developed using the MRS - blue aniline 0,1% medium. In the second study, it was shown that both *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 and *B. longum* BL 04 presented excellent growth in fat-free water extract of soybeans, reaching levels of 10^{12} - 10^{13} CFU/g, after 16 and 20 hours of fermentation. Also, the *L. acidophilus* LAC4 population increased in presence of *B. longum* BL 04, reaching levels between 10^{10} and 10^{13} UFC/mL in 20 to 24 hours of fermentation. Fat-free water extract of soybeans was shown to be an excellent medium for the probiotics tested. In the third study, the highest probiotic population was obtained at 37 °C, with a ratio of 40/60 (percentage) of *L. acidophilus* + *L. paracasei*/*B. bifidum*, with a inoculum of 5×10^5 CFU/g, 20 g/L of syrup with 8,45% of FOS and 7,5 % of fat-free water extract of soybeans in a total of 17,75 hours of fermentation, reaching a final pH of 5,03 and a final count of 10^9 CFU/g.

Keywords: probiotics, prebiotics, water extract of soybeans, soymilk, bifidobacteria, lactic acid bacteria, fructooligosaccharides.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que fornecem benefícios adicionais - extras - à saúde, além dos nutrientes tradicionais que geralmente contém. Os pró-bióticos e prebióticos, são alimentos funcionais, já que oferecem benefícios ao melhorar a digestão.

Sabe-se que cerca de 100 trilhões de bactérias pertencentes a mais de 400 espécies diferentes, de natureza saprofítica e patogênica, vivem harmoniosamente num delicado balanço no trato gastrointestinal, até que este seja desequilibrado pela dieta, consumo de drogas, situações de estresse, tratamentos quimioterápicos, idade, tempo de trânsito intestinal, pH intestinal, disponibilidade de material fermentável e outras situações, provocando diferentes tipos de problemas gastrointestinais como a disbiose intestinal, definido como desordem no trato gastrointestinal, devido ao desequilíbrio das bactérias intestinais (Carvalho, 2001). Sabe-se também que, em diferentes regiões do trato intestinal, estão presentes grupos específicos de microrganismos, como bactérias lácticas e bífidas, que modulam a microbiota nestes espaços, principalmente devido aos seus produtos de metabolismo (Ferreira e Teshima, 2000). Essa microbiota desejável protege o hospedeiro antagonizando o crescimento de microrganismos patogênicos, além de manter a sua saúde, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, decompondo ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio, ferro e outros nutrientes, diminuindo a incidência de doenças coronárias, ajudando a digestão, efeitos nutricionais, estimulação do sistema imunológico, apresentando atividades antitumorogênica e antimutagênica (Ouwehand, 1998), e, por meio de suas enzimas, favorecendo o metabolismo de algumas substâncias como a lactose, em indivíduos lactase não persistentes (Salminen, 1999).

(Tamime, 1995) Desde os tempos de Metchnikoff, o primeiro que relacionou saúde com o consumo regular de leites fermentados, no século XIX, sabe-se que uma flora intestinal balanceada é importante para a saúde e bem-estar do homem. Recentemente, tem havido um grande avanço no desenvolvimento dos produtos chamados **probióticos**

Bactérias do gênero *Lactobacillus* atuam no intestino delgado, ao passo que o grupo bífidogênico atua no intestino grosso, notadamente na região do cólon. A reintrodução destes grupos microbianos no hospedeiro é feita por meio de administração de espécies

selecionadas, que deverão estar em números elevados e viáveis no momento do consumo (Roberfroid, 2000).

Segundo Ferreira *et al.* (2000), bifidobactérias constituem um problema na preparação de alimentos probióticos, pois são difíceis de serem isoladas e manipuladas por serem anaeróbias. Quando isoladas, não toleram bem o ambiente ácido, sendo, portanto, difíceis de sobreviverem em produtos lácteos fermentados, considerados os carregadores universais de bactérias lácticas. Uma alternativa para o aumento de bifidobactérias no trato gastro-intestinal é o emprego de **prebióticos**.

Os prebióticos são definidos como substâncias não metabolizáveis no intestino delgado, e que, chegando ao intestino grosso, são seletivamente utilizadas como fonte de carbono pelas bifidobactérias ali presentes. O principal objetivo de administrar prebióticos é favorecer o desenvolvimento do gênero *Bifidobacterium*. (U.S.Pat:5.314.810)

Os ingredientes alimentares que atendem a esses requerimentos, até o presente momento, são os oligossacarídeos, tais como frutooligossacarídeos (FOS) e inulina. Os FOS são açúcares não digeridos pelo organismo humano e seletivamente favorecem o crescimento de bactérias benéficas. (U.S.Pat:5.314.810)

Por muitos anos, o leite de vaca ou de outra origem animal, foi considerado o alimento com maior valor nutricional. No entanto, para a maioria da população adulta do mundo, o leite integral pode provocar diarreia e outros sintomas desagradáveis pela intolerância à lactose.

Segundo Peltó *et al.* (2000), há pessoas hipersensitivas ao consumo do leite com reações alérgicas e distúrbios abdominais e pessoas não tolerantes à lactose.

A estrutura química particular do açúcar, lactose, dá o nome à enzima presente no intestino delgado humano, lactase, capaz de hidrolisá-la nos seus açúcares mais simples, glicose e galactose. A lactase está presente normalmente no trato digestivo de crianças, mas diminui ou desaparece em adultos, particularmente se eles não estão acostumados a beber leite. Pessoas com esta deficiência desenvolvem diarreia e outros sintomas ao beber leite. (Pyke, 1975, Fooks, 1999).

Outros distúrbios relacionados à ingestão de leite são:

- Alergia ao leite de vaca manifesta-se em quase 2,5 % das crianças menores de dois anos (Jakobsson, 1979; Host, 1990). A alergia às proteínas varia de leve (rinite, leve eczema atópico, otites) à severa (enteropatias, bronquites, anafilaxia). As doenças alérgicas afetam quase 33 % da população. Acredita-se que a presença de disbiose intestinal pode relacionar-se com o aumento das manifestações alérgicas.
- Leites aquecidos estão sujeitos à reação de Maillard: a lactose e resíduos de lisina em proteínas de leite (principalmente caseína) são os reagentes. Uma das conseqüências mais importantes é a perda do valor nutritivo devido à indisponibilidade dos resíduos da lisina, o que reduz a digestibilidade e causa inibição de enzimas (Friendman, 1996, Boekel, 1998).
- Alergia a suplementos de lactase, como no caso de ingestão de tabletes com lactase proveniente de *Aspergillus oryzae* para o tratamento de intolerância à lactose (Binkley, 1996).
- Leites não homogeneizados comparados com leites homogeneizados podem ser mais bem tolerados por sujeitos hipersensíveis ao leite devido à distribuição modificada das partículas de proteína e glóbulos de gordura (Pelto, 2000).

De acordo com a FAO-WHO (Zangelmi e Tagliolatto, 1982), uma das vantagens do extrato de soja é poder ser consumido por pessoas alérgicas ao leite materno ou leite de vaca (principalmente lactantes).

Entre as propriedades do leite de soja pode-se citar: não contém lactose, é altamente digestível, tem um preço mais baixo, não possui colesterol, tem só 1/3 do conteúdo de gordura do leite de vaca, é indicado para diabéticos, porque não contém amido e somente 2,8 % de carboidratos, contém ferro, evitando a anemia, é ótimo para tratamentos pós-operatórios, pois não causa problemas com gases (Zangelmi E Tagliolatto, 1982).

O extrato hidrossolúvel de soja tem qualidades que permitem selecioná-lo como alternativa para obter bebidas fermentadas com probiótico pela sua semelhança com leite de vaca na composição e comportamento físico-químico, e, é uma alternativa de consumo para pessoas que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela ingestão de leite, além de

conter oligossacarídeos naturais (rafinose e estaquiose) considerados como prebióticos ao estimular o crescimento de probióticos (Hou *et al.* 2000).

Assim, a partir do exposto acima, direcionaram-se os objetivos desta pesquisa para a obtenção de bebida de extrato hidrossolúvel de soja contendo alta concentração de probióticos enriquecido o não com prebióticos. Em particular, este trabalho considera: *i*) a contagem diferenciada de probióticos *ii*) o desenvolvimento de algumas espécies de probióticos (*Bifidobacterium longum* BL04, *Lactobacillus acidophilus* LAC4 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 em cultura pura ou em mistura) em extrato hidrossolúvel desengordurado de soja (Olivebra Industrial), com e sem adição dos prebióticos frutooligossacarídeos. Analisou-se a cinética de crescimento das células, consumo de substratos e a acidificação do meio, e, *iii*) o estudo das condições do processo de fermentação para a bebida de soja contendo a mistura das espécies de probióticos estudados através do planejamento experimental Plackett & Burman.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento no crescimento de algumas espécies de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja em presença de oligossacarídeos prebióticos, para a obtenção de uma bebida fermentada, que contenha agentes prebióticos e probióticos, como alternativa de consumo para indivíduos com problemas digestivos ou alérgicos devido a ingestão de leites processados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer a técnica mais apropriada para a contagem seletiva de lactobacilos e bifidobactérias utilizadas neste estudo.
2. Estudar as cinéticas de crescimento e consumo de algumas espécies de bifidobactérias e lactobacilos, envolvidas no processo de fermentação de extrato hidrossolúvel de soja com e sem adição de frutooligossacarídeos prebióticos.
4. Estudar as variáveis de crescimento e formulação da bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja para os probióticos dos gêneros *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROBIÓTICOS

3.1.1 Definições

Alimentos funcionais e nutracêuticos

Segundo a Agriculture and Agri-Food Canadá (AAFC), um alimento funcional e nutracêutico é aquele que têm o potencial de trazer benefícios fisiológicos demonstrados à saúde humana ou de reduzir o risco de doenças crônicas, acima e além das suas funções nutritivas básicas. Um alimento funcional é similar em aparência a um alimento convencional, no entanto, tem sido modificado com a adição de ingredientes que fornecem efeitos adicionais à saúde, em quanto que o nutracêutico é isolado do alimento e comercializado para dosagem. Como exemplo está o emprego de probióticos e prebióticos. (<http://www.agr.gc.ca/food/nff/enutrace.html>, 2003)

Probióticos

Segundo Fooks *et al.* (1999), a palavra **probiótico** se deriva de duas palavras gregas que significam 'por vida'. O termo foi usado para significar a substância que estimula o crescimento de outro microrganismo (Lilley & Stillwell, 1965 apud Fooks, 1999) ou extratos de tecido com os quais se promove o crescimento microbiano (Sperry, 1971 apud Fooks, 1999), mas não tiveram aceitação geral. Parker (1974 apud Fooks, 1999) foi o primeiro a usar a palavra probiótico no contexto de suplementação animal e foi definida como organismos e substâncias que contribuem para o balanço da flora intestinal.

Fuller (1989 apud Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001 e Salminen, *et al.* 1999) redefiniu probióticos excluindo o termo 'substâncias' que poderiam incluir antibióticos e estimulantes microbianos. Este autor definiu os pró-bióticos como um suplemento alimentício de microrganismos vivos que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro pelo seu incremento no balanço da flora intestinal.

Recentemente, Guarner (1998) (apud Gimenez, 2002) definiu os probióticos como: “Microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos na saúde do indivíduo”.

3.1.2 Ecologia do trato gastrointestinal humano

O intestino humano constitui um complexo ecossistema de microrganismos. Mais de 400 espécies têm sido identificadas em fezes humanas. A população de bactérias no intestino grosso é muito alta, a contagem de bactérias é de 10^8 - 10^{12} UFC/mL. No intestino delgado é consideravelmente mais baixa, 10^4 – 10^8 UFC/mL, 10^6 – 10^7 no fim do íleo, enquanto que no estômago somente encontra-se de 10^1 – 10^2 UFC/mL, devido ao pH baixo (Fooks *et al.*, 1999).

Na microflora intestinal ocorrem importantes mudanças desde o nascimento de uma criança até a idade adulta. O intestino de um recém nascido está livre de flora intestinal, mas logo após o nascimento, começa a colonização de muitas bactérias (Fuller, 1989). Com um a dois dias, são detectados nas fezes coliformes, enterococos, clostrídios e lactobacilos; com três a quatro dias começam a aparecer as bifidobactérias e no quinto dia já predominam estas últimas. As coliformes e outras bactérias são restritas e decrescem em resposta ao incremento das bifidobactérias. A contagem de 10^{10} – 10^{11} UFC/mL de bifidobactérias é comum em fezes de crianças alimentadas com leite materno, representando 80 % das bactérias intestinais (Gimenez, 2000). Crianças alimentadas com mamadeira, normalmente apresentam contagem de 1 log a menos de bifidobactérias (10^9 – 10^{10} UFC/mL) nas amostras de fezes em comparação a aquelas amamentadas pela mãe, e existe uma tendência para terem níveis mais altos de enterobactérias, estreptococos e outras bactérias putrefativas. Isto sugere que as crianças amamentadas são mais resistentes à infecções que as crianças alimentadas com mamadeira, devido à substâncias antibacterianas produzidas pelas bifidobactérias.

Com o final do período de lactação e a idade iniciam-se mudanças graduais no perfil da flora intestinal. A proporção de bifidobactéria declina para dar lugar aos *Bacteroides*, o terceiro gênero mais comum no trato intestinal; constituindo 86 % da flora total do intestino de adultos seguida pelos organismos do gênero *Eubacterium*. Adicionalmente, a espécie de bifidobactérias *B. bifidum*, comumente encontrada em crianças é substituída em adultos por

B. longum e *B. adolescentis*. Estas mudanças no perfil microbiológico podem estar facilitadas pelos fatores bifidogênicos. O tipo de flora em adultos é mais estável, mas a partir de uma idade média até a velhice pode sofrer mudanças novamente. As bifidobactérias decrescem e, por isso, alguns tipos patogênicos de bactérias podem aumentar, como no caso do aumento de *Clostridium perfringens*, agente de diarreias em idosos (Laurens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Alguns dos fatores que afetam a composição da microflora humana, enumerados por Fooks *et al.* (1999), são: tipo de alimentação, quantidade, composição química e disponibilidade de substâncias de crescimento, disponibilidade de sítios de colonização, interações imunológicas, estratégias de fermentação individual por cada bactéria, tempo de trânsito intestinal, pH intestinal, potencial de óxido-redução, disponibilidade de receptores de elétrons inorgânicos, produção de metabólitos bacterianos, presença de compostos antimicrobianos, idade do hospedeiro, movimentos peristálticos, entre outros. Como observa-se na figura 1.

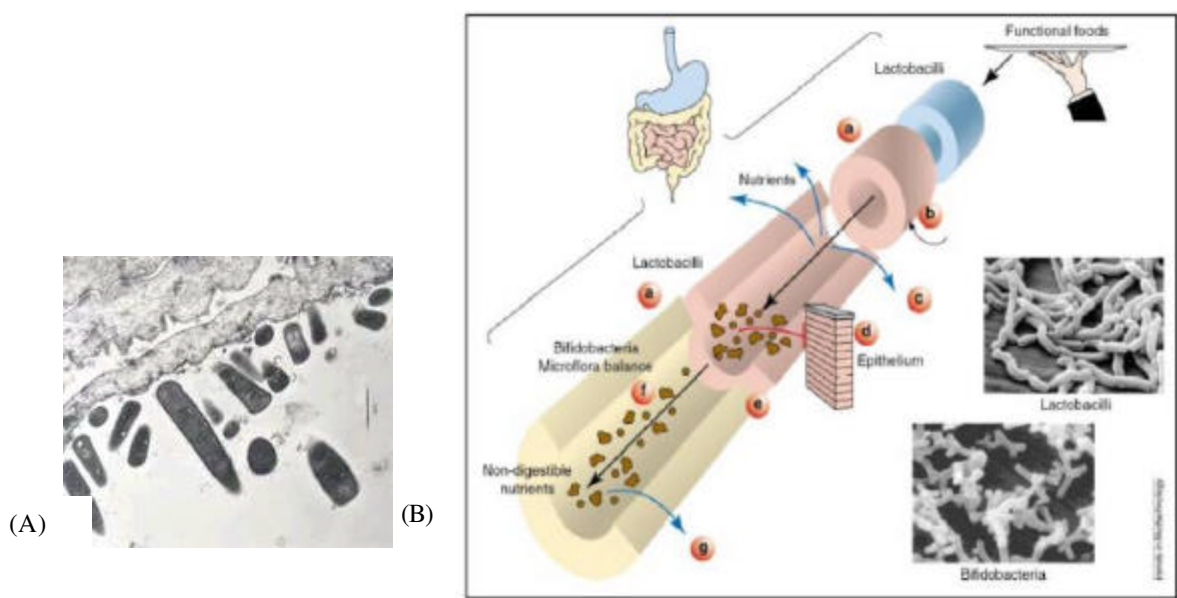


Figura 1. (A) Microfotografia de bifidobactérias e microflora aderidos ao epitélio intestinal (www.positivehealth.com/.../Colon%20Health/fuller32.jpg) **(B) Esquema da localização de espécies de probióticas no sistema digestivo humano, a) pré e probióticos inibem bactérias patogênicas em diferentes sítios da mucosa gástrica e do intestino, b) múltiplos ingredientes alteram o fluxo e estendem a digestão de nutrientes, c) a absorção de nutrientes e os fatores antinutricionais através do estômago e intestino são afetados pela presença, forma e atividade dos componentes dos alimentos funcionais, d) pré e probióticos modificam a função de barreira do epitélio intestinal, e) nutrientes e probióticos interagem com células do sistema imunológico, f) pré e probióticos modificam toda a ecologia da flora intestinal, g) os produtos da fermentação das fibras e oligossacarídeos não digeríveis pela microflora, além de limpar o intestino, favorecem a diferenciação, maturação e saúde geral das células do colon.**(German *et al.*, 1999)

3.1.3 Importância dos probióticos

Segundo Ferreira *et al.* (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 microrganismos benéficos, causando distúrbio da microbiota intestinal do hospedeiro. Como resultado, microrganismos 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.

Em 1987, Mitsuoka propôs um esquema hipotético, no qual ilustra as interações entre as bactérias intestinais e a saúde humana (Figura 2). Entre as bactérias classificadas como benéficas estão as bifidobactérias e os lactobacilos. As maléficas são *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Proteus* e alguns tipos de *Bacteroides*.

Um dos principais usos de probióticos pela espécie humana tem sido 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*. Linhagens de *Enterococcus* e *Bacillus* têm também sido utilizados na composição de alguns probióticos, além de *Bifidobacterium*. (Ferreira *et al.* 2000)

A Tabela 1 ilustra os principais efeitos benéficos e terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos.

3.1.4 Características

Para serem efetivos, os microrganismos probióticos devem ser rigorosamente selecionados, pois existirão várias barreiras a ultrapassar até o lugar em que deverão atuar. Para uma bactéria ser probiótica, ela deve cumprir certos requisitos como os enumerados na Tabela 1. Um probiótico de amplo espectro deve conter microrganismos que vão atuar em toda a extensão do trato gastrointestinal. Para exercerem efeitos probióticos, essas bactérias devem ser capazes de se aderir à superfície da mucosa intestinal.

Lactobacillus ssp (Figura 3.): São bastonetes, gram positivos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que se dispõem em forma de cadeias diferentes

tamanhos. O lactato (DL) é o principal componente do aroma característico durante a fermentação por *L. acidophilus* (Saarela *et al.*, 2000).

Segundo Donnet-Hughes *et al.*, 1999 (apud Saarela *et al.* 2000), *Lactobacillus johnsonii* (*acidophilus*) LJ-1(La1), regula a flora intestinal, intensifica atividade imunológica. Segundo Aso & Akazan (1995); Tanaka & Ohwaki (1994); Spanhaak (1998) (apud Saarela *et al.* 2000), *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

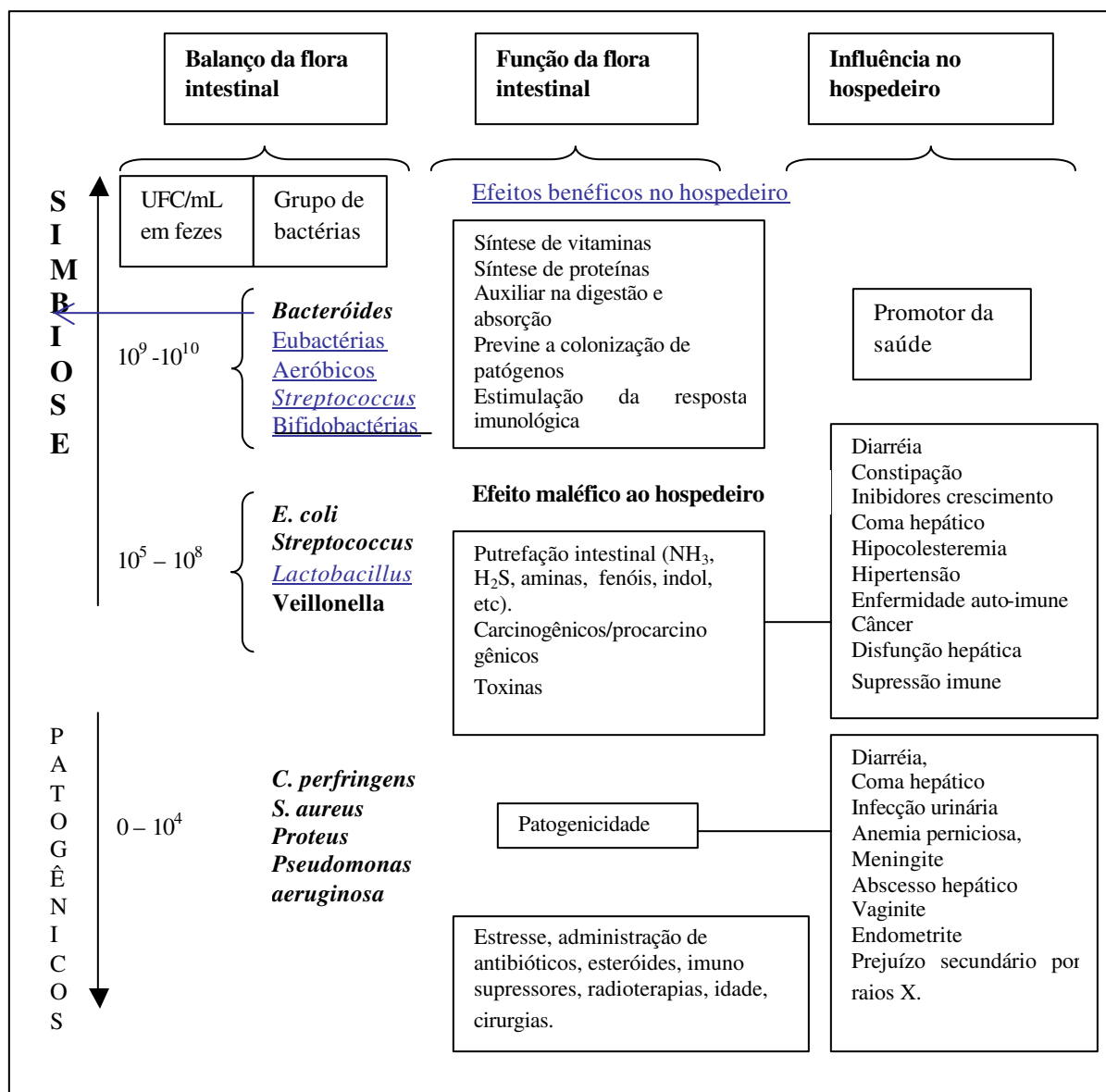


Figura 2. Correlações entre bactérias intestinais e saúde humana. Esquema proposto por Mitsouka (Laurens-Hattingh *et al.* 2001)

Tabela 1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídas às bactérias probióticas em humanos¹. Alguns critérios de seleção de microrganismos pró-bióticos².

<i>Efeitos benéficos</i>	<i>Alguns critérios para a seleção de microrganismos probióticos</i>
Manutenção da microflora intestinal normal	I) origem humana,
Antagonista de crescimento de patogênicos	II) resistência aos sucos gástricos,
Estimulação do sistema imunológico	III) capacidade de aderência à mucosa intestinal,
Redução da intolerância à lactose	IV) resistência à bÍlis
Redução dos níveis de colesterol	V) resistência à lisozima,
Impedimento da reabsorção de compostos aminados indesejáveis	VI) *persistência no trato intestinal humano
Desconjugação de ácidos biliares	VII) *produção de substâncias antimicrobianas,
Diminuição de doenças coronárias	VIII) *Antagonistas de bactérias patogênicas e carcinogênicas,
Atividade antimutagênica	IX) *seguros para uso clínico e alimentÍcio,
Atividade anticarcinogênica	X) números elevados de microrganismos probióticos, no momento de seu consumo, devendo para isto, resistir às condições de processamentos (desidratação, congelamento, liofilização),
Atividade antitumorogênica	XI) * validade clínica e com documentação dos efeitos à saúde.
Melhora o valor nutricional dos alimentos	
Efeitos nutricionais	
<i>Aplicações terapêuticas</i>	
Prevenção de infecção urogenital	
Alívio da constipação	
Proteção contra a diarreia dos viajantes	
Prevenção de diarreia infantil	
Redução de diarreia induzida por antibióticos	
Prevenção de hipocolesterímia	
Prevenção contra câncer de colo e bexiga	
Prevenção da osteoporose.	

¹Fuller, 1989, apud, Lourens-Hattingh *et al.* 2001. ²Fooks *et al.*, 1999 e Martin, 1996. *Saarela *et al.*, 2000.

A Tabela 2 mostra bactérias lácticas que têm sido usadas em preparações de probióticos sozinhos ou em combinação.

Tabela 2. Exemplos de bactérias acidolácticas para consumo humano¹. ***Probióticos***⁴

<i>Lactobacilli</i> ²	<i>Bifidobacteria</i> ²	<i>Streptococci</i>	<i>Enterococci</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	<i>Bif. bifudum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>Ent. faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bif. longum</i>		<i>Ent. faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Bif. breve</i>		
<i>L. salivarius</i>	<i>Bif. infantis</i>		<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>Bif. adolescentis</i> ³		
<i>L. crispatus</i>	<i>Bif. lactis</i> ³		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. paracasei</i> subsp <i>casei</i> ³			
<i>L. paracasei</i> biovar <i>Shirota</i> ³			

¹Fooks (1999), ²Mc. Cartney, Wenzhi e Tannock (1996), ³Tamime (1997). ⁴Saxelin(1999), os probióticos estão escritos em negrito.

(ATCC 53103), diminui a atividade enzimática fecal, reduz a diarreia associada a antibióticos em crianças, serve no tratamento e prevenção de rotavírus 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 (Saarela *et al.*, 2000). *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 rotavírus em crianças, protege e dá boa tolerância em adultos HIV-positivos (Wolf, 1998, apud Saarela *et al.* 2000).



Figura 3 . (A) *Lactobacillus* spp. - Gram-positivos regular, não esporulados. Nome de arquivo: 96536F. Aumento x 2,925 (Dennis Kunkel Microscopy (cortesia de D. Kunkel, 2001)) (B) Morfologia celular da espécie *Lactobacillus rhamnosus* de Danisco. (www.howaru.com/latestnews.html)

Bifidobacterium spp: As bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal. O trato digestivo de um recém nascido é rapidamente colonizado por bactérias oriundas da vagina durante o parto. Após um mês, a microflora no intestino do bebê será ocupada por 80 % de bifidobactérias e essa população parece ser relativamente estável até idade adulta, quando começa seu declínio. Sua população é influenciada pela dieta, antibióticos, estresse e etc.

As bifidobactérias (Figura 4) são bastonetes, gram-positivos, anaeróbios, no entanto, algumas são tolerantes ao oxigênio, possuem formato de Y e requerem nutrientes especiais, o que dificulta seu isolamento e crescimento em laboratórios. Segundo Tamime *et al.* (1995) 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; as células apresentam epitélio específico: em *B. breve* é mais fino e curto; muito alongado,

relativamente fino, com irregularidades pequenas no contorno e algumas pintas em *B. longum*; e, *B. adolescentis* e *infantis* apresentam morfologia muito semelhante à maioria das espécies de bifidobactérias. Algumas das espécies de bifidobactérias fermentam a lactose e crescem bem em leite. Lactato (L+) e acetato são os principais componentes do flavor durante a fermentação por *Bifidobacterium* ssp (Saarela *et al.*, 2000). Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20 °C a 46 °C e morrem a 60 °C. O pH ótimo é 6,5-7,0, não havendo crescimento em pH<5,1 ou pH>8,0 (Gimenez, 2002).

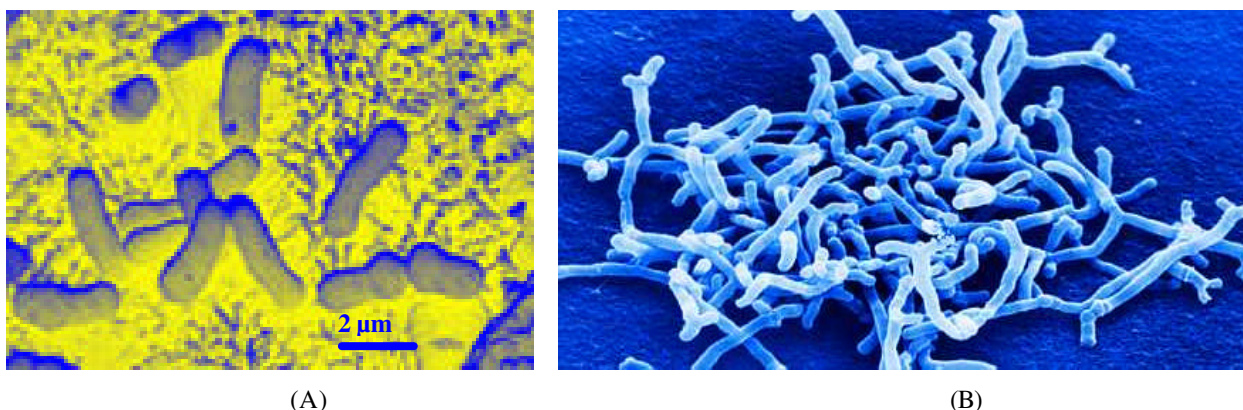


Figura 4. (A) Morfologia celular da espécie *Bifidobacterium lactis* da Danisco (www.howaru.com/latestnews.html) (B) *Bifidobacterium longum* BB 536 (Photo wurde freundlicherweise durch Morinaga Milk Industry Co. LTD. zur Verfügung gestellt de www.toepfer-gmbh.de/de/probiotik/)

A incorporação de bifidobactéria dentro da cadeia de alimentos pode ser difícil, porque, usualmente, exibe um crescimento fraco em leite e requer um ambiente anaeróbio (Rasic, 1990), baixo potencial de oxido-redução e a adição de fatores bifidogênicos para obter os níveis de crescimento desejados (Klaver *et al.*, 1990).

É reportado por Lourens-Hauttingh *et al.* (2001) que pH menor que 3,6 inibe o crescimento de bifidobactérias, mas seu crescimento se retarda desde pH 5,0, sendo que em pH entre 5,5 e 5,6 situa-se a faixa ótima de sobrevivência de espécies de bifidobactérias. Em condições extremas de pH, entre 1,5 e 3,0, espécies de *B. longum* e *B. pseudolongum* sobrevivem melhor que *B. bifidus*.

A sobrevivência da bactéria probiótica no meio de fermentação, depende das cepas usadas, interação entre espécies presentes, condições de cultivo, composição química do meio (p.e. fonte de carbono), acidez final, conteúdo de sólidos, promotores e inibidores do crescimento, concentração de açúcares (pressão osmótica), oxigênio dissolvido

(especialmente para bifidobactérias), nível de inoculação, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de estocagem.

Dave & Shah (1998) pesquisaram os efeitos da cisteína, hidrolisados ácidos, triptona e proteína concentrada de soro. A adição de cada um destes suplementos, exceto a proteína de soro, proporcionou viabilidade à bifidobactéria e também aos iogurtes feitos com culturas ABT (*L. acidophilus*, bifidobactéria e *S. thermophilus*). A adição de vitaminas, dextrina e maltodextrina, estimula o crescimento de espécies de bifidobactéria em leite, enquanto os sais de sacarose e ferro têm pouco efeito. *B. longum* em leite pode sobreviver melhor com adição de 0,01 % de levedura. (Lourens-Hattingh *et.al.* 2001)

3.1.5 Fatores que afetam a viabilidade dos probióticos

A sobrevivência das bactérias probióticas no meio de fermentação, depende das linhagens usadas, da interação entre espécies presentes, das condições de cultivo, da composição química do meio (p.e. fonte de carbono), da acidez final, conteúdo de sólidos, promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcares (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente para bifidobactérias), quantidade de inóculo, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de armazenamento (Lourens-Hattingh *et.al.*, 2000).

Fatores de crescimento

Como argumenta Tamime *et al.* (1995), inúmeros estudos com bifidobactérias *in vitro* para seu desenvolvimento no leite e obtenção de altos números de células, têm encontrado muitos fatores promotores de crescimento, como a fração de metanol extraído de células de *Propionibacterium freudenreichii* 7025 para cultivo de *B. adolescentis*, ou, os ácidos graxos de cadeia curta (formato, acetato, propionato e butirato), que também estimulam o crescimento de bifidobactérias.

Fator Bifidus 1: é um componente do leite e do colostro, que consiste em glicoproteínas, como N-acetilglucosamina. A k-caseína humana ou seus derivados de tripsina são promotores de *B. bifidum*, a hidrólise da tripsina resulta em um glicomacropéptido que contém açúcares como a glucosamina e galactosamina, os quais

têm atividade de fator bífidus. Um fator similar foi achado no muco secretado pelas glândulas salivares. O intestino delgado e o colo contêm glicoproteínas com N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina e ácido salicílico, que também estimulam o crescimento de bifidobactérias.

Fator Bifidus 2: As glicoproteínas do leite e do soro parecem ser efetivas, e parecem ser peptídeos não glicosilados de caseína, depois de serem hidrolisados com proteinases.

Oligossacarídeos: Têm sido amplamente estudados por sua habilidade promotora de crescimento. O leite humano contém uma variedade complexa de oligossacarídeos que podem ser os responsáveis pelo crescimento de *B. bifidum*, a espécie predominante nas fezes de crianças alimentadas com leite materno. A soja contém prebióticos como rafinose e estaquiose que são promotores naturais do crescimento de bifidobactérias.(TAMIME, *et al.*,1995)

3.1.6 Quantificação simples, confiável e seletiva de *Bifidobacterium* e de *Lactobacillus*.

Diante da necessidade de quantificação simples e confiável tanto de *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, para determinar o número inicial de bactéria probiótica depois da manufatura do produto, e também a determinação da viabilidade das células durante a estocagem em refrigeração bem como sua distribuição em cadeia, muitos meios de cultivos têm sido propostos (ver Apêndice 1.), mas a maioria é insatisfatória na diferenciação das espécies.

Os meios para bifidobactéria, usualmente, contêm substâncias redutoras do potencial redox (como cisteína, cistina ou ácido ascórbico), ou agentes seletivos (antibióticos, fontes simples de carbono, ácido propiônico e cloreto de lítio) para inibir o crescimento de bactérias ácido lácticas, e, freqüentemente, são fortificados com sangue de cavalo ou ovelha (Rasic, 1990 apud Lourens-Hattingh *et.al.* 2001).

Os meios propostos para a enumeração diferencial das espécies de *Bifidobacterium* na água e fezes de animais e humanos são: TPPY (triptose-proteose-peptona-extrato de

levedura (Bracquart, 1981, apud Lourens-Hattingh *et.al.*, 2001), modificado para TPPYPB (agar triptona-proteose-peptona-extrato de levedura com azul de prússia) por Teraguchi *et al.* (1978) para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* em produtos lácteos. O agar TOS (oligossacarídeos transgalactosidados como única fonte de carbono) é usado para enumeração seletiva de bifidobactéria em misturas com populações de espécies de lactobacilos e estreptococos.

MRS-maltosa (MRS =Man, Ragosa e Sharpe) e NNLP agar composto de sulfato de neomicina, ácido nalidixico, cloreto de lítio e sulfato de paramomicina (Vinderola, 1999), são os meios de seleção dos laboratórios da *Christian Hansen* para a enumeração diferencial de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, respectivamente, usados também por Dave & Sha (1997). Recentemente, o Agar Bif (Pacher & Kneifel, 1996) tem sido relatado: é um meio MRS com L-cisteína e antibióticos seletivos, junto com os meios de cultivo MRS, XGlu e M17 em que se consegue a análise completa da bactéria probiótica da bebida fermentada. Vinderola e Reinheimer (1999), estudaram a enumeração seletiva de colônias de *B. bifidum* em meio LP-MRS, em presença de *L. acidophilus* e *S. thermophilus*. O Apêndice 2 mostra a composição base do agar MRS.

3.1.7 Potencialidade de contagem seletiva dos meios

Embora o meio de cultura BL-OG (sangue-glicose-fígado + *oxgall* + gentamicina) possa ser considerado seletivo para bifidobactérias (Lourens-Hattingh *et.al.* 2001), assim como muitos outros descritos na literatura, no momento em que se pretende aplicar uma metodologia que sugere um meio seletivo em um estudo com probióticos, é necessário verificar sua seletividade. Hernalsteens (1999) estudou a eficiência do meio BL-OG em presença de *S. termophilus* e *L. bulgaricus*, reativando os microrganismos em leite desnatado 10 %, fazendo três repiques de 0.1% (cada 24 horas) e incubando a 37°C. O plaqueamento foi realizado em profundidade, incubando a 37°C por 72 horas em jaras de anaerobiose para realizar a contagem de células. A porcentagem de recuperação foi calculada relacionando o número de células contadas no meio BL-OG em relação às contadas em meio MRS, como descrito a seguir:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Contagem (UFC/mL) no meio em estudo}}{\text{Contagem (UFC/mL) em agar MRS}} \times 100$$

Os experimentos realizados não confirmaram a eficiência do meio BL-OG, pois tanto *S. thermophilus* quanto *L. bulgaricus* também se desenvolveram neste meio, o que indica que este meio não é seletivo, além de inibir o crescimento de bifidobactérias, com porcentagens de recuperação menores que 0,000001%.

3.2. PREBIÓTICOS

3.2.1 Definição

Um prebiótico é um ingrediente alimentar não digerível que atua estimulando seletivamente o crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon que podem melhorar a saúde do hospedeiro, segundo Gibson & Roberfroid, 1965 (apud Fooks *et al.* 1999, e Knorr, 1998).

2.2.2 Características dos prebióticos

Conforme descrito por Fooks *et al.* (1999), o critério para classificação dos prebióticos como ingredientes alimentares, inclui:

- (1) Não deve ser nem hidrolisado, nem absorvido, na parte superior do trato gastrointestinal.
- (2) Fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no colon, quer dizer, deve promover seletivamente o crescimento e/ou estimular a atividade metabólica de bactérias promotoras da saúde e não a de outras bactérias.
- (3) Alteração na composição da microflora do colon a favor de uma composição mais saudável.
- (4) Preferencialmente, induzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro.

Os ingredientes alimentares que cumprem com as condições dos prebióticos, até o momento, são os **oligossacarídeos**, tais como os frutooligosacarídeos (FOS), β -D-frutanos, Gluco-oligossacarídeos (GOS), Transgalacto-oligossacarídeos (TOS), Iso-maltooligosacarídeos (IMO) e inulina. (Wang & Gibson, 1993; Djouzi & Andrieux, 1997; Kohmoto, *et al.*, 1988 *apud* Fooks, 1999). Os oligossacarídeos são açúcares de três a dez unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas $\alpha(1-2)$ entre frutose terminal e glicose (Tamime *et al.* 1995), outros oligossacarídeos presentes em alguns vegetais como as leguminosas são a rafinose e estaquiose que se caracterizam por serem indigeríveis pelo intestino humano, sendo a causa de problemas digestivos tais como as flatulências (Scalabrini *et al.*, 1998). A síntese de oligossacarídeos sintéticos é muito estudada e existem patentes japonesas, brasileiras e européias. A inulina é um polissacarídeo para a qual as bifidobactérias têm demonstrado ter atividade de hidrolíticas.

3.2.3 Frutooligosacarídeos – FOS.

Os FOS 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. O grau de polimerização varia de 2 a 10 unidades, abreviados como GF₂ (1-kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (frutossilnistose) (Yun, 1996; Pinheiro, 2002) (Figura 5). Estes oligossacarídeos derivados da sacarose são encontrados naturalmente em vegetais e plantas como alcachofra, raiz de chicória, dália, dente de leão, cebola, alho e banana. Mas, as concentrações presentes são baixas, exigindo um consumo muito elevado para a obtenção dos efeitos fisiológicos desejados (Ferreira *et al.* 2000).

Os FOS apresentam propriedades físicas e fisiológicas que tornam um composto de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano, passando através do intestino delgado sem serem absorvidos e indo direto ao intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microflora intestinal (U.S. Pat.:5.314.810)

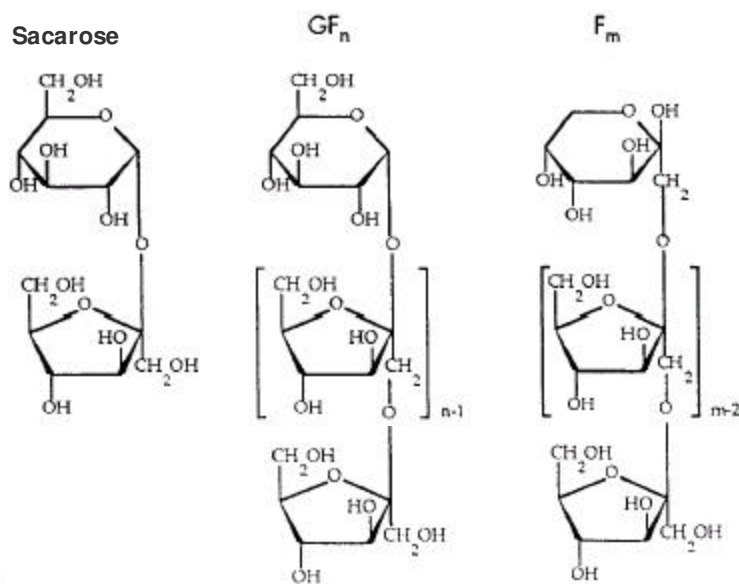


Figura 5. Estrutura química de varios frutooligosacarídeos G, *glicose*, F, *frutose*, n ou m indica o número de frutoses ligadas nas moléculas (ROBERFROID, 1998). n=1, kestose, n=2, nistose, n=3, 1^F – fructofuranosilnistose (YUN, 1996)

3.2.3.1 Produção dos Frutooligosacarídeos (FOS)

No Laboratório de Engenharia Bioquímica, LEB, da Faculdade de Engenharia de Alimentos-FEA, da UNICAMP, desenvolveu-se e patentou-se um xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido com frutooligosacarídeos, FOS, a partir de sacarose com enzima imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* ; o xarope fornece 50 g/L de FOS, 150 g/L de glicose, frutose e sacarose (Figura 6) (Maugeri & Pinheiro, 2002).

O procedimento segundo Maugeri & Pinheiro (2002), é:

- 1) Produção da Inulinase: O microrganismo *Kluyveromyces* sp., é inoculado no meio apropriado constituído por 30 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 5 g/L de K₂HPO₄, ajustando o pH em 3,5 e incubando a 30°C num fermentador a 150 rpm por 72 h. A enzima extracelular é obtida por centrifugação do caldo fermentado a (11.000 g x 10 min) a 4-6 °C.
- 2) Recuperação da enzima com etanol: O sobrenadante obtido é utilizado para recuperar a enzima. A precipitação da enzima é realizada pela adição de etanol ao

sobrenadante a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantendo a temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até atingir uma saturação de 70 % de etanol. Em seguida, centrifuga-se a $11.000\text{ g} \times 15\text{ min.}$ a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante é destilado para a recuperação do etanol e o precipitado é ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 5,0.

- 3) Purificação da Inulinase: A enzima recuperada pela precipitação com etanol é purificada por cromatografia iônica. A solução enzimática ressuspenso em tampão é filtrada em filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, a coluna de Q-Sepharose é previamente lavada com tampão fosfato 0,1 M a pH 6,0, temperatura entre $15\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e seguido de um gradiente salino ascendente de 0-90%. A eluição das proteínas é acompanhada a 280 nm. As frações são coletadas e determina-se a atividade enzimática. As frações que contêm a enzima, são reunidas numa só.
- 4) Imobilização da inulinase: pode ser realizada em meios diferentes como o carvão ativado junto com alginato de sódio como agente gelificante, sílica e glutaraldeído ou alginato de cálcio. A mistura é aquecida até $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a dissolução total do alginato. Depois esfria-se até $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, adiciona-se 2% da solução enzimática com uma concentração de 50 UI/mL. Para a formação das esferas, a solução é bombeada sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M sob agitação.
- 5) Produção do Xarope de açúcar contendo glicose, frutose e FOS a partir de sacarose: Uma coluna encamisada é empacotada com o biocatalizador (esferas de alginato de cálcio com a enzima imobilizada) e a temperatura mantida entre $35\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$. A coluna é alimentada com solução de sacarose entre 40 e 70 % e pH de 5,0-6,0. O produto obtido é apropriado para aplicação em indústria de alimentos como produtos funcionais, prebióticos e ricos em fibra alimentar solúvel.

Atualmente estão sendo realizados outros estudos para a obtenção de frutooligosacarídeos em meio orgânico (Alves, 2002).

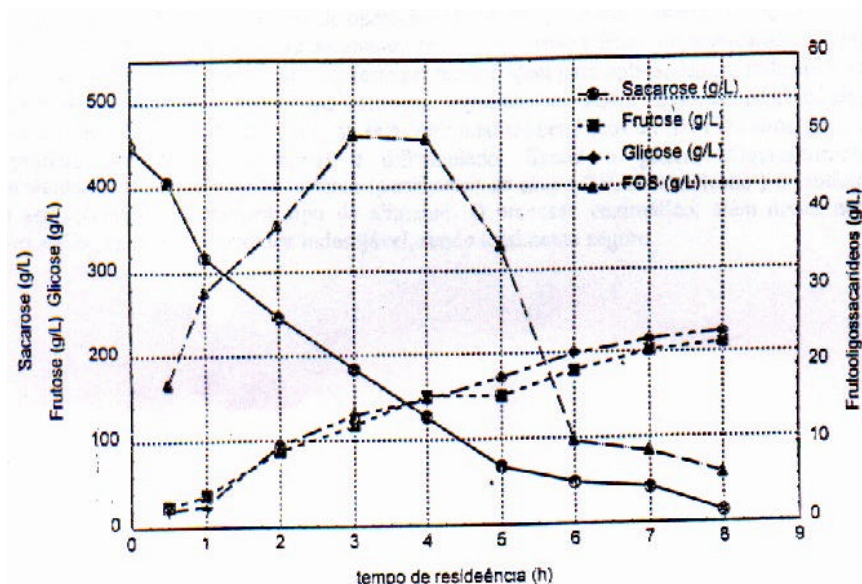


Figura 6 - Composição centesimal na produção de xarope com FOS, glicose, sacarose e frutose em função do tempo de retenção na coluna de leito fixo (Maugeri *et al.*, 2002).

3.3 PRODUTOS SIMBIÓTICOS

Os produtos que contêm uma bactéria probiótica (lactobacilo e/ou bifidobactéria) e prebióticos são chamados simbióticos (Roberfroid *et al.*, 1998). No desenvolvimento de simbióticos é necessária a seleção de linhagens de microrganismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (Ferreira *et al.*, 2000).

Como o conceito de simbióticos é novo, não existem muitos estudos específicos da interação entre pro e prebióticos (Saarela *et al.* 2000). Em geral, as propriedades dos prebióticos podem influenciar o crescimento e sobrevivência dos probióticos, afetando o crescimento tanto de probióticos como de culturas *starter* em conjunto. Isto leva a considerar as interações entre probióticos e *starters*. A interação *in vivo* pode ser favorecida para uma adaptação do probiótico ao prebiótico, condicionando seu metabolismo simultaneamente com um dado substrato, resultando numa vantagem competitiva para o probiótico. Porém, alguns estudos têm mostrado que os probióticos podem crescer sem este tipo de adaptação.

A simbiose apresenta-se também entre microrganismos de diferentes espécies ou gêneros como é o caso de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*: estes microrganismos têm uma boa associação, na qual o segundo produz ácido butírico e ácido láctico que acidificam o meio, e *L. paracasei* consome estes metabólicos, mantendo o pH entre 6 e 7 compatível para a sobrevivência de ambas as espécies (USPat.6,033,691).

Co-culturas e interação entre espécies

A sobrevivência de *L. acidophilus* e espécies do gênero *Bifidobacterium* é afetada pelas espécies que participam na fermentação, por causa dos metabólicos secretados por outros microrganismos. Dave e Shah (1997) reportaram que a inibição das bifidobactérias em iogurte não foi devida aos ácidos orgânicos produzidos ou à presença de peróxido de hidrogênio, e sim aos efeitos antagônicos entre os cultivos *starter*. Gilliland e Speck (1977, apud Laurens-Hauttingh *et al.*, 2001), mostraram que substâncias produzidas por *L. bulgaricus* causavam o decréscimo de *L. acidophilus* durante o armazenamento em refrigeração de iogurte; o peróxido de hidrogênio produzido durante a manufatura é a principal substância que causa este antagonismo, comprovado pela diminuição do efeito ao adicionar catalase, que alguns autores descrevem como uma dramática perda da viabilidade de *L. acidophilus*. A superacidificação causada por *L. bulgaricus* durante o armazenamento também afeta a viabilidade de *L. acidophilus*. Segundo Rybka & Kailasapathy (1995), a presença de *L. bulgaricus* é a principal causa da mortalidade de *L. acidophilus* e de *Bifidobacterium* ssp.

L. acidophilus e *B. bifidum* apresentam um efeito sinérgico promotor de crescimento, o segundo depende de outra bactéria ácido láctica para assegurar seu crescimento. Cerca de 17 espécies de bifidobactérias crescem no leite puro e 15 têm problemas para sobreviver, pelo fato de terem pouca atividade proteolítica, precisando da adição de caseína hidrolisada ou de co-culturas com espécies proteolíticas, como os lactobacilos, para crescer. Espécies de *L. acidophilus* vivem em excelente simbiose com bifidobactérias provendo estas com estimulantes de crescimento. (Laurens-Hauttingh *et al.*, 2001) A mistura de cepas vivas de *L. acidophilus* e espécies do gênero *Bifidobacterium* usadas em produção de bio-bebidas, são conhecidas recentemente como cultivos-AB. A

mistura de AB culturas com *S. thermophilus* produz os chamados produtos fermentados ABT. (Vinderola *et al*, 2000).

3.4 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA.

Segundo Zangelmi (1982), é de conhecimento geral que as proteínas de origem animal são de melhor qualidade pelo balanço de aminoácidos essenciais. Mas a proteína de soja é muito parecida à proteína de origem animal e supera as outras do reino vegetal. Tem 90,5 % de digestibilidade (segundo a FAO).

Segundo Tamime & Robinson (1991), devido à atual escassez mundial de alimentos, se procuram continuamente fontes alternativas de proteínas, especialmente destinadas a os países em desenvolvimento, nos que a malnutrição representa um problema. Dado que a soja é um produto relativamente abundante, barato e uma apreciável fonte de proteínas e calorias para o consumo humano, têm-se feito importantes esforços para o seu aproveitamento na fabricação de produtos mais aceitáveis e apetecíveis.

O extrato hidrossolúvel de soja, mais conhecido (mas mal nomeado) como 'leite' de soja, tem como limitante o gosto adstringente devido a compostos voláteis de baixo peso molecular produto da ação das lipoxigenases, que por tratamento térmico são inativadas. Os fatores antitripsina e hemaglutinina indesejáveis são termosensíveis, sendo facilmente eliminados com tratamento térmico. O problema de possuir pseudo-açúcares indigeríveis pelo organismo humano causando flatulências, pode ser solucionado através de diversas técnicas de processamento e/ou fermentação.

Como argumentam Hou *et al.* (2000), o extrato de soja apresenta um *flavor* desfavorável de leguminosa e um alto teor de α -D galactosil oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose, fatores de flatulência que limitam o consumo da soja. A fermentação têm sido extensivamente empregada para desenvolver vários produtos e superar as limitações da soja, por exemplo, o emprego do extrato de soja como meio de crescimento e atividade bioquímica de varias bactérias lácticas na produção de queijo de soja e tipos de iogurte (Chou & Hou, 2000)

Composição do extrato hidrossolúvel de soja

Em termos do valor nutritivo o extrato de soja compara-se ao leite de vaca, contendo entre 3-4 % de proteínas, com uma deficiência nos aminoácidos sulfurados metionina e cistina, é boa fonte de vitamina B, exceto B12, o conteúdo de cálcio é somente 0,76 % (que é 18,5% do cálcio contido no leite de vaca), e é fonte dos oligossacarídeos: rafinose e estaquiose, como pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição Química de 'leite de soja' e leite de vaca (g/100g). Aminoácidos g/16 g de N. Açúcares em mg/L. Vitaminas (mg/100mL)

Componente	'Leite'	
	Soja	Vaca
Proteína	3,6	3,3
<i>Aminoácidos¹</i>		
Isoleucina	5,1	7,5
Leucina	8,3	11,0
Lisina	6,2	8,7
Metionina	1,4	3,2
Cistina	1,7	1,0
AA sulfurados totais	3,1	4,2
Fenilalanina	-	-
Tirosina	-	-
AA aromáticos Totais	9	11,5
Treonina	3,8	4,7
Triptófano	1,3	1,5
Valina	4,9	7,0
Gordura	1,9	3,9
Carboidratos	2,8	4,7
<i>Açúcares²</i>		
Sacarose	4928,2	
Frutose	133,0	
Glicosa+galactose	189,0	
Rafinose*	695,5	
Estaquiose*	391,1	
Vitaminas: complexo B ²		
Niamina	7,45	
Riboflavina	7,36	
Tiamina	0,33	
Cinzas	0,4	0,7
Água	91,3	87,4

Dados compilados por Angeles and Marth (1971, apud Tamime & Robinson, 2001),

¹Zangelmi *et al.* (1982).

²Hou *et al.*, (2000). *Ver estrutura química no Apêndice 3.2.

Desenvolvimento de produtos com soja

Existem no mundo múltiplos desenvolvimentos de produtos fermentados de soja que empregam diferentes espécies microbianas, alguns com bactérias lácticas. No Apêndice 3 se apresentam alguns produtos relacionados.

3.5 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO

A tecnologia e a bioquímica das fermentações, incluindo as mudanças físico-químicas que podem ocorrer no leite durante a manufatura de iogurte e outros produtos fermentados, têm sido extensivamente pesquisadas e revisadas por muitos grupos de estudo (Rasic & Kurmman, 1983, 1992 ; Tamime & Robinson, 1995, 2001, Dave & Shah, 1997, Vinderola & Reinheimer, 1999, 2000, entre outros). Periodicamente, a *International Dairy Federation* publica monografias atualizadas dos aspectos científicos e tecnológicos no campo dos alimentos lácteos e revisões recentes do desenvolvimento tecnológico para leites fermentados, projeto higiênico de equipamentos de processamento de lácteos e manutenção de plantas de produção.

Contudo, os principais tópicos de produção de qualquer tipo de leite fermentado (p.e. standardização do conteúdo de gordura, fortificação dos sólidos lácteos, homogeneização, desaeração (opcional) e altos tratamentos térmicos) são comuns. Aspectos técnicos que devem ser considerados em detalhe incluem: (i) organismos que constituem as culturas *starter*, (ii) temperatura e período de incubação, (iii) proporção do inóculo, e (iv) produção do *starter*. O uso de equipamentos de desaeração do leite é altamente requerido para fermentação por bifidobactérias. A presença de oxigênio no leite pode prolongar o período de incubação.

3.5.1 Fermentação láctica

Associado ao crescimento celular se encontra o consumo de substratos que no caso dos probióticos podem ser as diferentes fontes de açúcares como mono, di e oligossacarídeos, e, a liberação de produtos finais do seu metabolismo no meio (Chou &

Hou, 2000). Os lactobacilos liberam ácido láctico e alguns aldeídos (Tamime *et al.*, 1995); as bifidobacterias produzem tanto acetato como lactato (Garcia *et al.* 1993).

Como explica García *et al.* (1993), todas as bactérias lácticas são sacarolíticas e deficientes em muitas rotas biossintéticas. Em consequência, apresentam requerimentos nutricionais complexos que as forçam a se restringirem a meios ambientes ricos em nutrientes, como o trato intestinal e o leite. Estas variedades são anaeróbias, mas essencialmente aerotolerantes. Existem 3 vias metabólicas de degradação de carboidratos a ácido láctico, como ilustra a Figura 7. A rota homofermentativa gera lactato como único produto com um rendimento de 2 moles para cada mol de glicose e é, por conseguinte, a de interesse na produção. A rota heterofermentativa resulta na produção de etanol e CO₂ (em alguns casos também acético) em quantidades equimolares a láctico. Esta transformação acontece através do esquema metabólico das pentoses. Finalmente, *Bifidobacterium bifidum* produz 1,5 mols de acetato e um de lactato por mol de glicose pela via do bifidum (García *et al.*, 1993).

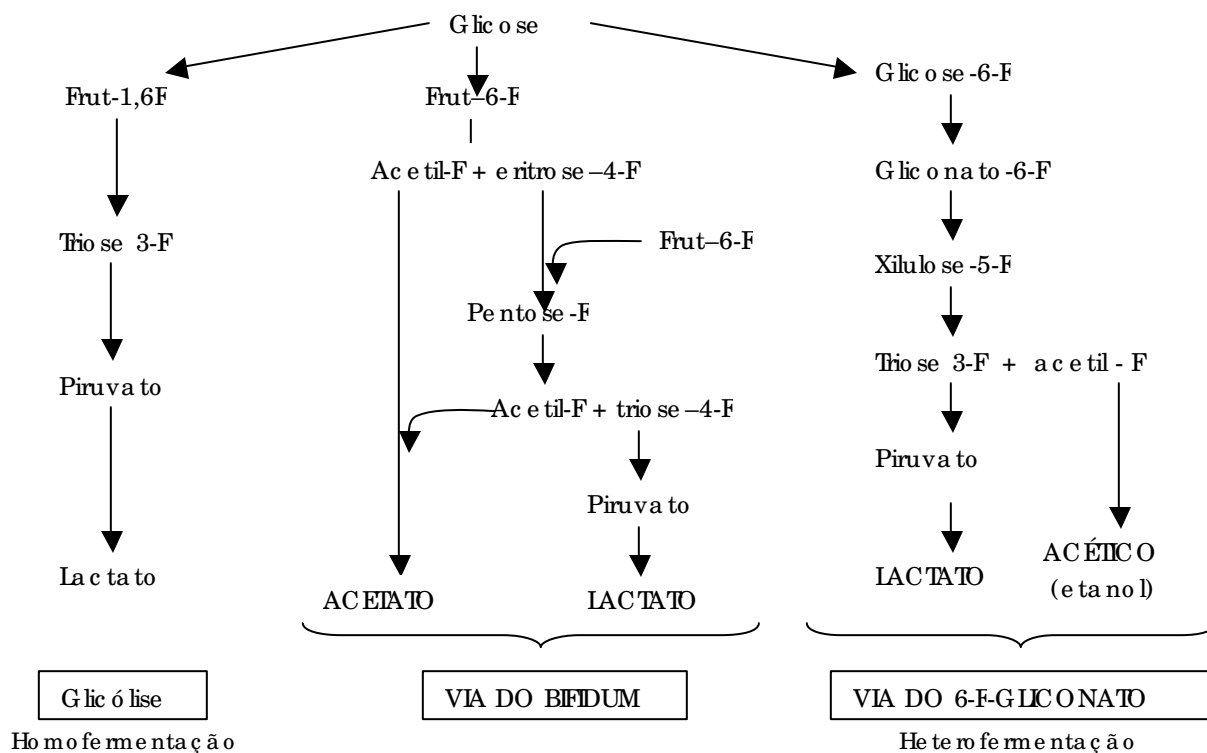


Figura 7. Vias metabólicas na produção de ácido láctico por bactérias (García *et al.* 1993)

3.5.2 Tecnologia das culturas *starter*

O tradicional sistema de repicagem para propagação de culturas *starter* na manufatura de leites fermentados, começou a ser substituído pelo sistema DVS (Direc Vat Set).

As culturas comerciais DVS são adquiridas em forma de liofilizado concentrado ou como culturas concentradas mantidas congeladas a -196°C . Podem ser armazenadas entre -40 e -80°C . Este tipo de cultura pode ser conservada a temperaturas de 5°C até -20°C , e quanto mais baixa a temperatura, maior será a vida útil. A atividade das culturas depende da taxa de sobrevivência, a contagem em média é maior ou igual a 10^{11}UFC/mL . Para conseguir estas altas contagens, as células bacterianas são concentradas antes da preservação e armazenamento. Estas culturas de bactérias probióticas altamente concentradas podem ser usadas como adjuntos dietéticos para consumo direto, por exemplo como comprimidos farmacêuticos.

Existem diferentes métodos a serem usados na concentração de biomassa de bactérias lácticas, no caso de bifidobactérias utiliza-se a técnica de separadores mecânicos (tipo *Sharples*), neutralização do meio de crescimento até pH 6,0 usando NH_4OH 10M ou NaOH 2M e ultrafiltração (UF) ou microfiltração. As culturas podem ser muito bem conservadas por liofilização ou congelamento a baixas temperaturas desde -10 a -196°C . O congelamento e/ou secagem podem causar danos às células bacterianas, mas o uso de compostos criogênicos (como leite desnatado estéril, sacarose, lactose, gelatina, pectina, caseinato de sódio, alginato de sódio, glicerol e sorbitol) têm ajudado a manter a atividade das bifidobactérias. Fatores como a contagem microbiana inicial antes da conservação, o conteúdo de umidade na cultura liofilizada, o uso de compostos de proteção, o empacotamento sob atmosferas controladas de N_2 , o uso de embalagens impermeáveis ao oxigênio e a temperatura de armazenamento, influem na taxa de sobrevivência dos probióticos. Alguns autores verificaram que a melhor taxa de sobrevivência para espécies de bifidobactérias foi com a concentração por membrana das culturas e a adição do leite desnatado (100 g/L) e sacarose (120 g/L) como material criogênico.

Outros estudos acharam que um meio com base em soro de leite de baixo custo, foi efetivo para o crescimento de *B. bifidum* num processo contínuo de um reator acoplado a

uma unidade de ultrafiltração. A viabilidade foi boa para a cultura armazenada a 4, -20 ou -80 °C e liofilizado (Tamime *et al.*, 1995).

3.5.3 Procedimentos para formulação de produtos com probióticos

No desenvolvimento de produtos com probióticos deve-se ter em conta os seguintes procedimentos:

3.5.3.1 Preparação do inóculo

As cepas de *Lactobacillus* ssp e *Bifidobacterium* ssp são cultivadas em meio a base de leite, previamente esterilizado, por exemplo, a 90 °C por 5-6 minutos. O produto esterilizado e resfriado a 37 °C e adicionado de oligoelementos como ferro, cobalto, e molibdênio e aditivos como biotina e aminoácidos, ajustando o pH entre 6,50 e 7,75. As cepas dos lactobacilos são suspensas numa solução fisiológica estéril e inoculadas. A incubação é iniciada e continuada a 37 °C até atingir contagem de 10^5 e 10^9 UFC/ml. Durante o período de cultura é importante manter o pH entre 6,30 e 6,60 através de uso de soluções tampão ou ácidos e bases biocompatíveis (USPat. 6,033,691).

3.5.3.3 Tamanho do inóculo

Vários autores comentam acerca do quanto deve ser o tamanho do inóculo:

- 1) As culturas liofilizadas de probióticos são aplicadas através da técnica DVS (Direct Vat Set), quer dizer, diretamente do sachê no meio de fermentação (Saarela *et al.* 2000).
- 2) Racic & Kurmam (1983) comentam que os sachês com microrganismos probióticos liofilizados que se comercializam atualmente são altamente concentrados.
Culturas concentradas: devem conter no mínimo 5×10^9 UFC g⁻¹
Culturas não concentradas: até um máximo de 1×10^8 UFC g⁻¹
- 3) Usar alta quantidade de inóculo: 10-20% (Varman, 1994)
- 4) Dave & Shah (1997): dizem que o aumento do nível de inóculo não melhora a viabilidade dos probióticos.

- 5) Hansen (1985), baseado nos seus estudos sugere usar 700-800 milhões ($7-8 \times 10^8$) de *L. acidophilus* /mL e 400-500 milhões de *B. bifidum*/mL. Relata que inóculos inferiores com $10^4:10^3$ UFC/ mL de *B. bifidum*: *L. acidophilus*, o crescimento é suprimido.

3.5.3.4 *Formulação do produto ou meio de fermentação*

Ao pretender formular um produto ou otimizar um processo, há geralmente um número elevado de variáveis a controlar como pH do processo, pH final, temperatura, percentagens de nutrientes, tipo de inóculo, porcentagem de inóculo, oxigênio dissolvido, contagem final de biomassa, vida de prateleira, entre outros. Por tratar-se de ensaios com múltiplas variáveis e processos que implicam tempos prolongados de fermentação e o emprego de material caro, a aplicação da metodologia de planejamento experimental através da técnica de Plackett & Burman (P-B) de 12, 16, 24, 48 ensaios, dependendo dos graus de liberdade, é uma ferramenta muito útil para desenvolver formulações e otimizar processos.

O desenvolvimento de novos produtos deve ir acompanhado não só da caracterização físico-química e microbiológica do produto, mas também de um estudo sensorial (Mahecha, 1985).

“Screening Design” - Plackett & Burman.

Os planejamentos propostos em 1946 por Plackett & Burman (P-B), baseados na metodologia do planejamento fatorial, são uma ferramenta estatística muito útil na avaliação prévia de um processo quando temos um grande número de variáveis. P-B é utilizado para que o pesquisador não exclua de forma arbitrária as variáveis que possam ser importantes no processo. Como vantagens tem-se a redução do número de ensaios a serem realizados, permite estimar os efeitos principais e identificar as variáveis mais relevantes que devem ser escolhidas para a realização do planejamento completo, porém é necessário fazer um número de ensaios um pouco maior que o número de variáveis estudadas; tem a desvantagem de não permitir a otimização do processo. Na otimização do processo deve-se usar uma estratégia sequencial de planejamentos conforme o número de variáveis em questão: um ou mais P-B, um ou mais planejamento(s) completo(s) e análise de Superfície

de Resposta. (Rodriguez *et al.* 1996). São também, planejamentos saturados, que permitem estudar todos os efeitos principais ($k=n-1$, onde n representa o número de ensaios) com variância mínima. Todas as colunas são ortogonais, e essa simetria permite que os efeitos principais de cada fator sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis. (Barros *et al.* 2001)

3.5.4 Produtos do mercado mundial com probióticos e prebióticos

Desde a década passada assistiu-se na Europa, Estados Unidos e em muitos outros países a um grande aumento nas marcas de produtos lácteos (fermentados ou doces) que contem bifidobactérias de origem humana. Os produtos fermentados têm sido feitos usando um só gênero, ou em combinação com outras bactérias lácticas em forma de misturas de cultivos *starter* (Tamime *et al.* 1995)

Os leites fermentados são definidos como o produto de leite fermentado pela ação de microrganismos específicos, resultando em uma redução do pH e coagulação. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes (não inferior a 10^7 UFC/mL) no produto na data de mínima durabilidade (Ouwehand *et al.*, 1998, Kurman *et al.* 1992), mas não todos são probióticos.

Muitos produtos contem bifidobactérias, como se observa no Anexo 4. É evidente que *B. bifidum* e *B. longum* são altamente empregados como mistura de culturas *starter* em combinação com *L. acidophilus* e culturas de iogurte (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e/ou *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Em alguns casos *Lactococcus* ssp. e *Pediococcus acidilactici* também são usados.

Bebidas como Yakult®, Biogurt®, Biokys®, Mil-Mil®, AKTIFIT plus®, entre outros contêm probióticos (*Lactobacillus* ssp e *Bifidobacterium* ssp) e são comercializados no mundo (Apêndice 4). O processo de elaboração de alguns destes produtos é descrita em seguida.

Yakult®: Segundo García *et al.*(1993), é um leite fermentado originário de Japão, cujo consumo fundamenta-se nas quantidades benéficas de *Lactobacillus* para a saúde. O produto tem uma consistência muito líquida e contem açúcar e aromatizantes, o qual junto

com os metabólicos da fermentação lhe conferem um sabor característico agradável. Segundo Kurman et al. (1992) o processo de manufaturação foi desenvolvido pelo Dr. Shirota em 1930; é produzido comercialmente no Japão, Hong-kong, Taiwan, Brasil, Korea do Sul e Tailândia; elabora-se a partir de leite desnatado reconstituído, com o qual, depois da esterilização a 140 °C/3-4 segundos, é fermentado com *Lactobacillus casei* subsp. *casei* Shirota a 37 °C por 4 dias. O produto concentrado é transportado para plantas de engarrafamento, diluído com água esterilizada até a concentração desejada e depois engarrafado em garrafas de poliestireno e distribuído sob refrigeração. Valor alimentício: O produto final contém mais de 10^8 / ml de células viáveis de *L. casei*; a composição aproximada é de 1,2 % de proteína, 0,1 % de gordura, 0,3 % de cinza, 16,5 % de carboidratos e 81,9 % de água. O valor calórico por cada 100 g é de 70 Kcal e obtém-se uma acidez de 2,7 % de ácido láctico.

Leite acidófilo: Obtém-se por fermentação de leite estéril, integral ou desnatado com *Lactobacillus acipophilus*. Trata-se de um produto ácido sem aroma característico já que este microrganismo não produz metabólitos em forma importante além do ácido láctico. *L. acidophilus* cresce lentamente em leite, pelo qual deve ser estéril para evitar que outras bactérias dominem a fermentação. Inocula-se o leite com um volume de 2 – 5 % de inóculo e incuba-se a 37-38 °C por 18-24 horas, com isto alcança-se acidez de 0,6 a 1 % de ácido láctico, sendo recomendável um máximo de 0.65 % para manter uma alta população viável. Depois da fermentação esfria-se de 5 – 10 °C e quebra-se o coágulo por agitação mecânica, logo envasa-se e conserva-se em refrigeração, para manter uma boa viabilidade das bactérias, de pelo menos duas semanas. Existe um produto denominado leite acidófilo doce, o qual se prepara adicionando biomassa concentrada de *L. acidophilus* ao leite pasteurizado frio; neste produto não se faz fermentação e, portanto, o sabor do leite praticamente não se altera (García, 1993).

Iogurte AB: Produto de leite bovino fermentado. É manufaturado em muitos países e é similar ao Iogurte Bifidus. O leite é homogeneizado e aquecido (85 °C por 30 min ou 90 °C por 5 minutos), esfriado a 40-42 °C e inoculado com culturas separadas (*L. acidophilus* e *B. bifidum* ou *longum*), incubado a 40-42°C por 3-5 h, seguido de resfriamento e

armazenamento (Rasic & Kurmann, 1992). Os microrganismos terapêuticos devem ser de origem humana e a contagem de células viáveis em produtos frescos em média $1-3 \times 10^7$ UFC/mL tanto para lactobacilos quanto para bifidobactérias. A contagem de bactérias é influenciada pelo (i) quantidade de inóculo, (ii) pH de tolerância da cepa terapêutica e (iii) o tipo de manufatura (Tamime *et al.*, 1995)

Leite Bífido: Leite bovino padronizado e fortificado (150-200 g/kg de sólidos totais) é homogeneizado, aquecido a 80-120 °C por 15 min, resfriado a 37 °C e inoculado com a cultura liofilizada (100 g/L de *B. bifidum* ou *longum*). O pH aproximado do produto é 4.5. O coágulo é resfriado, embalado e armazenado. O leite bífido tem as seguintes características: (i) suave, ácido e gosto levemente picante, (ii) a relação molar de ácido láctico e acético é de 2:3, (iii) tipos batidos e não batidos podem ser produzidos com o sem adição de sabores de frutas, e, (iv) a contagem de *B. bifidum* viável é de $10^8 - 10^9$ UFC/mL com diminuição de dois ciclos log durante o período de armazenamento. Para melhorar o desenvolvimento do microrganismo no meio ácido, uma certa quantidade do starter se prepara em leite desnatado esterilizado e fortificado com extrato de levedura, hidrolisado de leite preparado com pepsina, extrato de milho, ou proteína de soro. A seleção das espécies mais ácido-tolerantes é altamente recomendada por Klaver *et al.* (1990). Alternativamente, a inoculação dos cultivos liofilizados concentrados por DVI (*direct to vat inoculation*) pode ser utilizada para eliminar os repiques no laboratório (Tamime *et al.*, 1995)

Biokys ®: Este é um produto da antiga Tchecoslováquia, fermentado de leite bovino com 150 g/kg de sólidos totais e 35 g/kg de gordura, com propriedades terapêuticas similares ao produto farmacêutico Femilat®. O leite é homogeneizado, tratado termicamente, resfriado a 30-31 °C e inoculado com cultura mixta (20-50 g/L, *B. bifidum* e/ou *longum*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e/ou *L. acidophilus* e *P. acidilactici* em proporção de 1:0,1:1 ou 45:10:45) (Tamime *et al.*, 1995).

Ofidus®: Este leite fermentado francês (tipo coágulo) é feito de leite de vaca. Existem dois tipos de produtos Ofilus®: Ofilus 'nature' (36 g de gordura/kg) feito com uma

mistura de culturas de *S.thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*, e Ofilus 'double douceur' (100 g de gordura/kg). (Tamime et al., 1995)

Iogurte tipo Grego: É um iogurte natural concentrado, não adoçado, obtido a partir de leite integral, com remoção parcial de soro. Produz-se em muitos países e se conhece com diferentes nomes: *labneh*, *lebneh* ou *labnich* (em países do mediterrâneo oriental), *laban zeer* (no Egito e Sudán), *tan* ou *than* (na Armênia), *stragisto* ou *sakuolas* (na Grécia), *kis*, *kurut*, *torba* ou *tulum* (na Turquia), *mastou* ou *mast* (no Iraque e Iram), *basa*, *zimme*, *kiselo* ou *mleko-slano* (em países Balcânicos) e Greek-style (no Reino Unido) (Tamime et al., 1988, Kurmann et al., 1992, apud Tamime et al., 1995). É feito usando leite de vaca, ovelha e cabra, fermentados com *B. bifidum* Bb12 (da Chr. Hansen's laboratory em Dinamarca). O produto contém entre $4,6 \times 10^5$ e $4,1 \times 10^7$ UFC/mL, dependendo do tipo de leite. A pontuação sensorial para o produto bífido, dado por panelistas (quanto a sabor e aroma) foi baixo comparado com outros produtos similares elaborados com *L. acidophilus* ou culturas de iogurte, devido à apreciável presença de ácido acético no produto.

Sorvetes de creme cultivados: O produto congelado lembra a combinação entre o frio do sorvete de creme em seu estado físico e o gosto ácido do leite fermentado. Antes do congelamento, o produto é fortificado com açúcares, estabilizantes e emulsificantes requeridos para manter a estrutura e o overum durante o processo de congelamento (Tamime et al., 1995).

Biogarde®: É uma marca alemã que contém acima de 10^8 UFC/mL de células viáveis de *L. acidophilus*, 10^7 UFC/mL de *B. bifidum* e quantidade abundante de unidades de *S. thermophilus*. Nos EUA, os laboratórios usam estes microrganismos para elaborar sorvetes de creme duros e suaves.

Iogurte de soja: Existem duas formas de obtenção de produtos alimentares fermentados: o emprego de extrato hidrossolúvel de soja em produtos similares a iogurte, e o enriquecimento do leite de mamíferos com extratos de soja para a elaboração de iogurte. Pode-se obter produtos de qualidade aceitável similar ao iogurte com culturas starter

tradicionais. O produto fermentado exibe sua máxima qualidade para uma concentração de ácido láctico de 1,15 %, que permite a formação de um coágulo homogêneo e firme, sem separação do soro e com um *flavor* muito superior ao de 'leite' de soja. O *flavor* do extrato de soja depende diretamente das concentrações de α -pentanal e α -hexanal; *S. thermophilus* é o responsável pela formação do primeiro, enquanto que o segundo se encontra normalmente presente no leite de soja; a diminuição dos oligossacarídeos não é significativa. (Tamime, 1991)

O processo para elaborar iogurte de soja é o seguinte:

- Dispersar farinha de soja em água a 25 °C e pH 4,2-4,6. Com este tratamento se eliminam por lixiviação a maioria dos açúcares, minerais, certas enzimas e os compostos responsáveis pelo sabor da soja.
- Filtrar e tratar o resíduo sólido com uma solução aquosa a 55°C e pH 9,0
- Separar os sólidos por sedimentação e separar a fase líquida.
- Ajustar o pH a 6,7 com ácido orgânico comestível. Adicionar açúcares, óleo vegetais, estabilizantes e lecitina.
- Homogeneizar mediante uma vigorosa agitação para obter o 'leite' de soja.
- Esterilizar em autoclave a 116 °C por 4 minutos, resfriar a 40 °C e inocular com cultura *starter* de iogurte.
- Incubar durante 16 horas a 40 °C e resfriar. O iogurte de soja tem pH de 4,2-4,4

Um refresco de soja se elaboraria da seguinte forma:

Preparar uma mistura base a partir dos seguintes ingredientes: leite evaporado, proteína de soja, sacarose, água e aminoácidos (por exemplo, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, glicina, L-lisina, L-metionina e ácido L-glutâmico). Pasteurizar a 60-65 °C durante 30 minutos. Resfriar a 37 °C e adicionar a cultura *starter* e as essências de fruta. Incubar a 31 °C durante 6 horas e resfriar; o refresco de iogurte de soja tem uma acidez de 1,27 % de ácido láctico.

3.5.5 Patentes

Nas patentes de produtos relacionados com leite fermentado, soja e produtos probióticos e prebióticos, foram encontrados alguns desenvolvimentos de bebidas com leite

de vaca, produtos desidratados para uso farmacêutico ou alimentação animal ou humana, assim como as misturas dos probióticos para adição em diferentes tipos de alimentos de origem vegetal ou animal (Apêndice 5).

3.5.6 Regulamento para produtos a base de leite fermentado

Rybka & Kailasapathy (1995), estipula um número $> 10^7$ UFC/ml para alcançar um efeito terapêutico ótimo. Uma pessoa pode chegar a consumir 10^8 células de probióticos por dia, o consumo regular de 400-500 g/semana da bebida fermentada, contendo 10^6 células viáveis por mililitro, pode fornecer esse número. O critério da NYA (Nacional Yogurt Association - Estados Unidos) é de 10^8 UFC/mL de bactéria acidoláctica no tempo da manufatura e depois de embalado. O regulamento da Australian Food Standards Code, diz que os produtos fermentados requerem pH 4,5 ou menor para prever o crescimento de contaminantes patogênicos. (Lourens-Hattingh *et al.* 2001).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa No. 36, de 31 de outubro de 2000, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) um ou mais cultivos(s) láctico(s) específico(s), estes devem atender a esses requisitos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000). No caso dos probióticos, o produto deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto (Resolução RDC No.2, de 7 de janeiro de 2002, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002). Para a bebida fermentada ser considerada um produto probiótico é necessário que as bactérias probióticas sobrevivam no produto durante sua vida de prateleira. (Saxelin *et al.*, 1999).

No Japão se estabeleceu uma quantidade de oligossacarídeos que suplemente o requerimento de 0,8 g/kg de peso corporal por dia (Yun, 1996). Spiegel *et al.* (1994) indica que a dose diária mínima que induziu diarreia quando FOS foram adicionados em alimentos foi de 44 g para homens e de 49 g para mulheres em testes com humanos voluntários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria prima

Extrato hidrossolúvel de soja desengordurado em pó PROVESOL PS60, fornecido por OLVEBRA INDUSTRIAL S/A (Brasil). (No Apêndice 3.3 encontra-se a ficha técnica do produto).

Antiespumante DC*FG10 da D'Altomare Química, grau alimentício.

Xarope de açúcar contendo sacarose, frutose e glicose, enriquecido com FOS, produzido segundo a metodologia de Maugeri e Pinheiro (2002), no LEB/DEA/FEA/UNICAMP

4.1.2 Culturas probióticas

As culturas liofilizadas de microrganismos pró-bióticos, embaladas em envelopes lacrados, foram obtidas da Rhodia.

Foram utilizadas as linhagens *Lactobacillus acidophilus* LAC 4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81-82 e *Bifidobacterium longum* BL04-300B denominados neste trabalho como LAC 4, LBC 81 e BL 04 respectivamente.

4.1.3 Meios de cultura

- 1) Agar MRS (Man, Ragosa & Sharpe) da Synth e MRS + 0,01% azul de anilina: este meio pode ser preparado no laboratório com a formulação que aparece no Anexo 1.
- 2) Agar MRS-LP (0,2 %w/v de cloreto de lítio + 0.3 % w/v de propionato de cálcio) (Vinderola & Reinheimer, 2000)
- 3) Agar MRS-CDAC constituído por Agar MRS + 0,5 % L-cisteína (10%) + 0,5% dicloxacilina (0,1%) + 1% cloreto de lítio (10%) + 0,01% azul de anilina.(Fávaro-Trindade, 2001, apud Gimenez, 2002).

4.2 Metodologia de Produção

4.2.1 Determinação da concentração de células dos microrganismos liofilizados.

A metodologia adaptada de Vinderola (2000), foi:

- 1) Amostras de 0,01 g da cultura liofilizada e congelada.
- 2) Diluição decimal em água peptonada 0.1%. Incubação durante 30 minutos a 37°C na primeira diluição, para ativar o cultivo.
- 3) Alíquota de 1 ml para contagem em placa de profundidade e adição do meio MRS, em duplicata (Gimenez, 2002).
- 4) Incubação por 72 horas a 37°C (aeróbica para lactobacilos e anaeróbica em câmara com gerador de anaerobiose PROBAC)
- 5) Contagem e identificação de colônias.

4.2.2 Avaliação da potencialidade de contagem e seleção dos meios

Foram avaliados os meios **MRS-LP** (0,5% w/v de cloreto de lítio + 0,3% de propionato de sódio) (Vinderola & Reinheimer, 2000) e **MRS-CDAC** (composto por MRS + 0,5% de dicloxacilina (0,1%) + 1% de Cloreto de Lítio (10%) + 0,5% de L-cisteína (10%) + 0,01% azul de anilina) para bifidobactérias e/ou lactobacilos. (Fávaro-Trindade, 2001, apud Gimenez, 2002)..

- 1) Com pipeta estéril, retirou-se assepticamente 1 ml da amostra fermentada.
- 2) Fizeram-se diluições decimais em água peptonada 0.1%
- 3) Transferiu-se 1 ml de alíquota para plaqueamento em profundidade no meio a estudar, em duplicata (Gimenez, 2002), previamente preparado e esterilizado.
- 4) Foi incubado por 72 horas a 37 °C (aeróbica agar MRS e/ou anaeróbica em câmara de anaerobiose agar MRS, MRS-LP e CDAC-MRS)
- 5) Contaram-se e identificaram-se as colônias.
- 6) Foi determinada a porcentagem de recuperação, segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Contagem (UFC/mL) no meio em estudo}}{\text{Contagem (UFC/mL) em agar MRS}} \times 100\%$$

4.2.3 Preparação do inóculo

As culturas foram reativadas da seguinte forma:

- 1) Preparou-se o meio de ativação de extrato hidrossolúvel de soja para adaptação das culturas, usando-se 10% de extrato desengordurado de soja em pó para estudos preliminares, 7,5% para o estudo de cinética de crescimento e 6% para o planejamento experimental, em água destilada e agitando moderadamente. Para evitar a formação elevada de espuma, adicionou-se 40 ppm de antiespumante grau alimentício. O extrato, em frascos com tampa rosca de 500 mL, foi esterilizado a 121°C por 5 minutos em autoclave.
- 2) Os envelopes com as culturas liofilizadas foram abertos em condições assépticas para evitar a contaminação das culturas.
- 3) Um grama da cultura foi diluída em 9 mL de extrato de soja estéril.
- 4) Os microrganismos foram reativados com incubação durante 30 minutos a 37°C.
- 5) A cultura ativada foi diluída em 90 mL do mesmo extrato obtendo-se uma quantidade de 10^{-3} da população inicial.
- 6) A cultura diluída foi dividida em volumes de inóculo fixos em frascos estéreis e foram congelados a -18°C, para aplicação posterior direta no meio a fermentar.
- 7) Contagem por plaqueamento dos inóculos após descongelamento.

4.2.4 Preparação das bebidas fermentadas de extrato hidrossolúvel de soja

Os seguintes ensaios foram realizados para o estudo das cinéticas de crescimento em extrato hidrossolúvel desengordurado de soja:

- 1) Fermentado de soja com *B. longum* BL04.

- 2) Fermentado de soja com *L. acidophilus* LAC 4.
- 3) Fermentado de soja com *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81.
- 4) Fermentado de soja com mistura de *L. acidophilus* LAC 4 e *B. longum* BL04, com e sem adição de xarope com FOS (25 g/L).
- 5) Fermentado de soja com mistura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04, com e sem adição de xarope com FOS (25 g/L).
- 6) Fermentado de soja com mistura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC 4 e *B. longum* BL04 com e sem adição de xarope com FOS (25 g/L).

4.2.4.1 Etapas de processamento das bebidas fermentadas com probióticos

Ensaio preliminares

- 1) Extrato hidrossolúvel desengordurado de soja 10 % esterilizado a 121°C por 2 minutos e esfriado a 4-10°C
- 2) Inóculo de 4% do (os) probiótico(s) reativado(s)
- 3) Fermentação (sem agitação) em frasco com tampa rosqueada a 37°C por 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas.
- 4) Retirada de amostras em diferentes intervalos de tempo e congelamento a -18°C.
Descongelamento das amostras em refrigeração (8-10 °C) por 12-24 horas, enumeração de probióticos por plaqueamento em duplicata e identificação das colônias por estereoscópio nos diferentes tempos de fermentação.
- 5) Análise de açúcares redutores, °Brix, pH e acidez titulável.
- 6) Análise de dados.

Crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja, em presença de oligossacarídeos prebióticos e planejamento experimental.

Extrato de soja reconstituído a 4,5 -7,5% esterilizado e resfriado, em q.s.p.(quantidade suficiente para 1000mL)+ 40 ppm de antiespumante + Xarope FOS (10-25 g/L opcional)

↓
Inóculo do (s) probiótico(s) padronizado(s) como no item 4.2.3
Entre 5×10^5 - 5×10^7 UFC/mL



Fermentação (sem agitação) em frascos estéreis de 100 mL, com tampa e rosca, a 37 °C por 24 horas para cinéticas, e entre 37-43°C até atingir pH 4,5-5,0 para o planejamento experimental

Retirada de amostras em intervalos de 4 horas durante 24 horas (para cinéticas).

Congelamento a -18°C.

Contagem por plaqueamento e identificação de colônias em meio MRS + 0,1 % azul de anilina.

Precipitação das proteínas solúveis com 0,01 mL de ácido cítrico 1M por mL de amostra

Centrifugação a 9639 x g ou entre 0-5°C por 15 min (centrífuga Sorval RC 26 Plus Dupont).

Medidas físico-químicas: pH, açúcares redutores e ART, determinação cromatográfica de açúcares mono, di e oligossacarídeos e ácidos orgânicos láctico e acético.

4.2.4.2 Etapas da produção do xarope de açúcares contendo FOS.

O procedimento segundo Maugeri & Pinheiro (2002), é:

- 1) Produção da Inulinase: O microrganismo *Kluyveromyces* sp, é inoculado no meio apropriado a pH 3,5 e incubado a 30°C em fermentador a 150 rpm por 72 h. A enzima extracelular é obtida por centrifugação.
- 2) Recuperação da enzima livre com etanol 99° INMP e centrifugação. Dissolução do precipitado em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 5,5
- 3) Determinação da atividade enzimática.
- 4) Imobilização da inulinase em alginato de cálcio. Manutenção da enzima imobilizada em cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M, pH 3,6-5,6.
- 5) Determinação da atividade enzimática.
- 6) Produção do xarope de açúcar contendo glicose, frutose e FOS a partir de sacarose: Uma coluna encamisada é empacotada com o biocatalisador (6 UI/mL de enzima) a temperatura entre 40-60 °C, e alimentada com solução de sacarose entre 40 e 70 % em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0

4.2.5 Planejamento experimental para obtenção da bebida fermentada de soja contendo probióticos e prebióticos

No estudo do processo e formulação para obtenção de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos, realizou-se um planejamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios e 3 pontos centrais para um total de 15 ensaios (Rodrigues, 2000), sendo 5 variáveis independentes: X_1 = temperatura de fermentação, **T** (37-43°C); X_2 = proporção da mistura de pró-bióticos, **L₁+L₂/B** (40:60 – 60:40), sendo as misturas das linhagens de *Lactobacillus* **L** e *Bifidobacterias* **B**, em relação **L/B** assim composta: *L.paracasei* subsp *paracasei* **LBC81**, **L₁**, *L. acidophilus* **LAC4**, **L₂**, e *B. longum* **BL04**, **B**; X_3 = quantidade de inóculo, **INO** em UFC/g (5×10^5 - 5×10^7); X_4 = Xarope de açúcares contendo FOS , **XAR+FOS** (0-20 g/L); e, X_5 = porcentagem de extrato de soja, **ES** (4,5-7,5 %). As variáveis dependentes foram: a contagem total e individual dos pró-bióticos, **CP** (UFC/g) total e específica para **L₁**, **L₂** e **B**, favorecendo o crescimento de B, e o tempo de fermentação **t** (horas). As condições dos ensaios realizados e suas respectivas respostas encontram-se nas Tabela 17 a 19.

Os resultados foram analisados usando-se as técnicas de planejamento experimental com ajuda do software STATISTICA (Statsoft, v.5.0 for Windows).

4.3 Metodologia Analítica

4.3.1 Quantificação de probióticos totais e específicos

Os lactobacilos e as bifidobactérias foram quantificados por plaqueamento em profundidade (Vinderola *et al.*, 2000) por diferença de crescimento em anaerobiose e aerobiose, e identificação morfológica das colônias em misturas com o uso de esteroscópico Citoval 2 – Carl Zeiss. Incubação aeróbica ou anaeróbica (em jarras de anaerobiose Merck e Permution e geradores de anaerobiose Probac) a 37°C por 72 horas (Saxelin *et al.*, 1999).

4.3.2 pH

O pH do meio de fermentação foi medido com potenciômetro, segundo procedimento de Cecchi.(1999).

4.3.3 Determinação de Açúcares Redutores e Totais (ART)

Para a determinação de açúcares redutores utilizou-se o Método Espectrofotométrico – 3,5-DNS, que compreende os seguintes passos (Miller, 1959):

- Uma amostra de 0,5 ml previamente centrifugada foi retirada e colocada em tubo de ensaio.
- Foi adicionado 0,5 ml do reativo 3,5-DNS, e o tubo foi aquecido em banho maria a 100°C por 5 minutos;
- Todos os tubos de ensaio foram colocados em banho de gelo e em seguida adicionou-se 8 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado (15,1 g/L), para estabilizar a cor em cada tubo.
- A leitura foi realizada a 540 nm;
- Calculou-se a concentração de açúcares redutores através de uma curva padrão de glicose.

Para a determinação de açúcares redutores totais, ART, diluiu-se amostra até uma faixa de 0,5 a 3,0 g/L de concentração e a amostra foi hidrolisada com ácido como descrito a seguir.

Uma amostra de 1 mL foi adicionada de 1 mL de HCl 2N, e aquecida em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Os tubos de ensaio foram colocados em banho de gelo e adicionou-se de 1 mL de NaOH 2N. Os açúcares redutores foram determinados como descrito anteriormente.

A curva padrão de ART foi feita com sacarose hidrolisada em concentrações que variavam de 0,5 a 3 g/L, nas mesmas condições da amostra.

4.3.4 Determinação de Brix:

Por método refratométrico (Cecchi, 1997)

4.3.5 % Acidez total titulável (expressa como % de Ácido láctico):

Segundo método oficial da AOAC 945.26 (1997)

4.3.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima inulinase foi determinada segundo o método descrito por Treichel (2001), a reação foi realizada em frasco sob agitação e controle de temperatura 50°C, com auxílio de um banho recíproco. No frasco adicionou-se 9,0 mL de solução de sacarose 2% em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e 1 mL de amostra convenientemente diluída. Retirou-se 1,0 mL de amostra em intervalos de tempo pré-determinados e analisou-se os açúcares redutores. Construiu-se uma curva de absorbância em função do tempo e, com auxílio da curva de calibração dos açúcares redutores determinou-se a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como sendo a capacidade da enzima liberar 1 $\mu\text{mol/mL}$ de frutose por minuto sob as condições de análise.

4.3.7 Determinação de carboidratos por cromatografia de íons (HPLC-PAD)

Os carboidratos foram determinados em cromatógrafo Dionex com detector eletroquímico ED40, sistema de bombas com gradiente GP50, detector de pulso amperométrico com eletrodo de ouro, software PEAKNET para aquisição, processamento de dados e geração de relatórios, pré-colunas e colunas Carbo PA100 e Carbo PA10. As pré-colunas e as colunas foram conectadas em série seguindo as condições padrão de uso.

Preparo da fase móvel.

A fase móvel utilizada foi NaOH 100mM, acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM e água ultrapura Milli- Q Plus (18,2 Ω). A fase móvel foi desgascificada por 15 minutos em ultra-som e 5 minutos com nitrogênio. O fluxo do eluente foi de 1,0 mL/min

Curva de calibração

Foram utilizados os padrões kestose, nistose e frutossilnistose (Wako Dako Industries, Ltd.), glicose, frutose e sacarose (Merck), galactose e rafinose (Aldrich) e estaquiose (ICN Biomedicals, Inc). As soluções foram preparadas numa faixa de 0,5-80 mg/L. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada com base no coeficiente de regressão, utilizando-se o software PEAKNET do DIONEX.

Preparo das amostras

As amostras foram diluídas convenientemente na faixa de concentração de 10-100 mg/L com ajuda do diluidor automático Diluitor Dispenser 402, Gilson

Injeção das amostras no sistema HPLC-PAD

Realizada utilizando um injetor automático Specto SERIES AS 100, nas seguintes condições: Temperatura ambiente 22-24 °C, volume de injeção 25 µL, fluxo do eluente: 1,0 mL/min, e fase móvel NaOH 100mM, acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM e água ultra pura Milli-Q.

4.3.8 Determinação de ácidos orgânicos e carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As concentrações de ácidos orgânicos foram determinadas através de análises em HPLC modelo Varian 9010.

Utilizaram-se colunas da marca Bio Rad HPX 87H na temperatura de 30°C e como eluente, solução de ácido sulfúrico pH 1,4 com um fluxo de 0,70 mL/min, e detetor de índice de refração.

Foram usados como padrões soluções coquetel de ácido láctico da Vetec e ácido acético da Ecibra, sacarose, glicose, frutose da Merck, galactose, rafinose da Aldrich e estaquiose da ICN Biomedicals Inc, nas concentrações de 0,1% a 1%, sendo o software Millennium® v.2.1 usado para integrar e quantificar os dados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de células viáveis nas culturas liofilizadas de microrganismos probióticos.

Com este experimento foi verificada a capacidade de crescimento das linhagens liofilizadas de *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobacterium* ssp. em agar MRS para contagem de células viáveis.

Os resultados experimentais da concentração de células viáveis nos envelopes contendo microrganismos liofilizados, da Rhodia, são apresentados na Tabela 4. Foram obtidos níveis superiores aos reportados pelo fornecedor, o que é razoável pois as empresas produtoras trabalham com algumas margens de segurança, já que as contagens estão sujeitas a mudança por variações na temperatura de armazenamento, a manipulação, entre outros fatores. Neste caso, obteve-se entre 1,5 e dois ciclos logarítmicos a mais para *B. longum* BL 04, *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e *L. acidophilus* LAC 4. Os resultados obtidos neste ensaio foram utilizados como base de cálculo para os inóculos das bebidas fermentadas.

Tabela 4. Contagem experimental e calculada dos envelopes de probióticos liofilizados em agar MRS + 0,01% de azul de anilina por 72 horas a 37°C.

Espécie	Contagem experimental UFC/g	Contagem teórica UFC/g	Características*
<i>B. longum</i> BL 04	$1,8 \times 10^{13}$	3×10^{11}	Colônias brancas, creme ou azul muito claro com bordas bem definidas. Forma de disco. Tamanho ⁺ das colônias de 0,1-3 mm
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC81	$2,8 \times 10^{13}$	3×10^{11}	Colônias pigmentadas de azul intenso, bem contornadas, elas contem uma gema de azul intenso e homogêneo, forma de disco com diâmetro de 1-5 mm.
<i>L. acidophilus</i> LAC 4	$8,4 \times 10^{12}$	2×10^{11}	Colônias com coloração azul escuro no centro, e azul claro ou branco no halo, bordas pouco definidas, têm forma de disco e um halo com bordas e superfície levemente difusos, tamanho menor que outras colônias. Tamanho ⁺ de 0,1-2 mm

Análises em triplicata. *As características das colônias podem ser observadas nas Figuras 8, 9 e 10. ⁺ O tamanho das colônias pode alterar com a diluição e a densidade de colônias por placa.

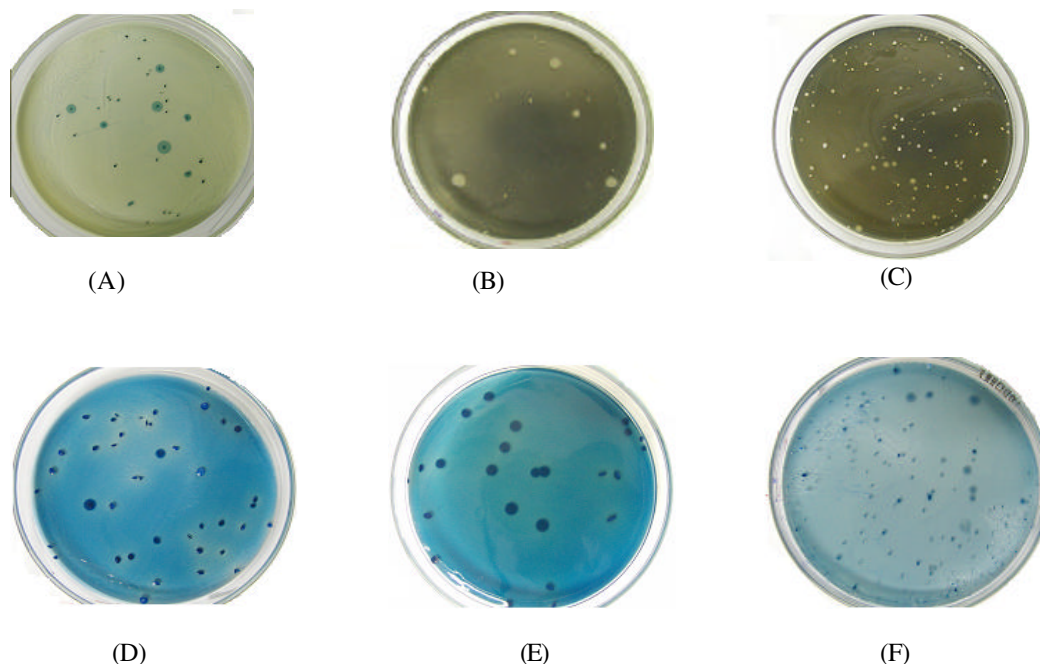


Figura 8. Fotografias de placas para contagem dos probióticos. As colônias em azul foram cultivadas em agar MRS (Man, Ragose e Shape) + azul de anilina 0,01 %; as placas com fundo preto foram cultivadas em agar MRS. (A) *L. acidophilus* LAC4, (B) *L. acidophilus* LAC4, (C) *B. longum* BL04 (D) Mistura de *B. longum* BL04 com *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, (E) *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, (F) Mistura de *B. longum* BL04 com *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *L. acidophilus* LAC4.

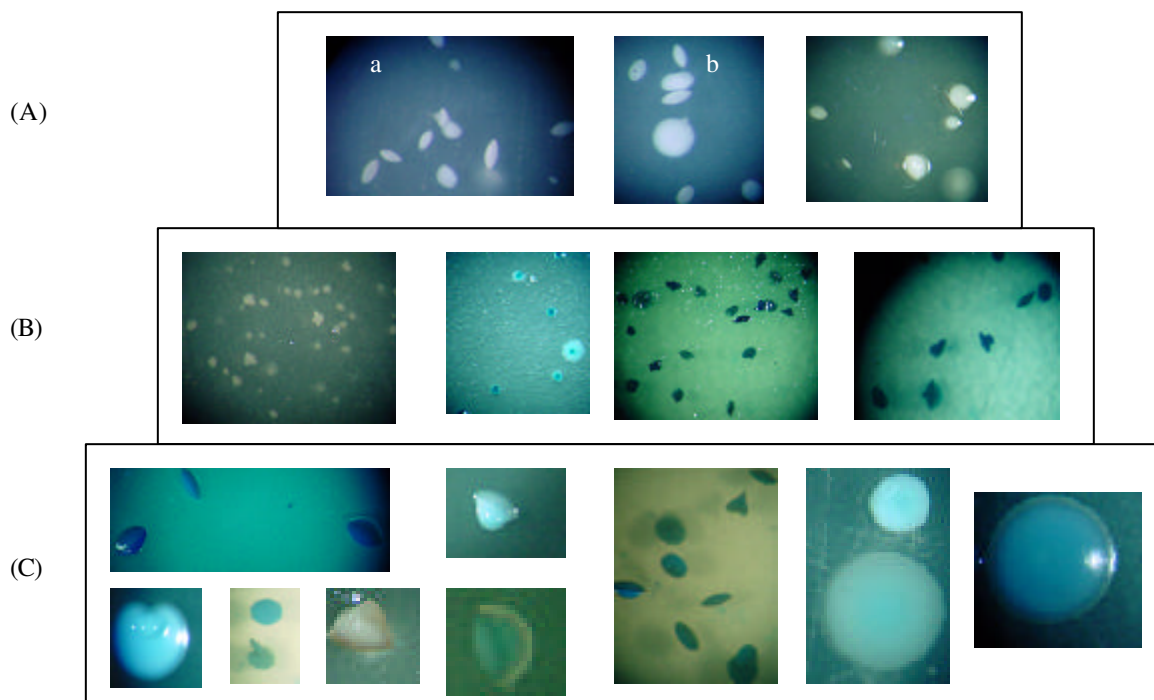


Figura 9. Fotografias de diferentes perfis das colônias de (A) *B. longum* BL04, (B) *L. acidophilus* LAC4 (colônias brancas em Agar MRS) e (C) *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 (colônias brancas em Agar MRS), em placas com Agar MRS + 0,01 % de azul de anilina vistas através do esteroscópico Citoval 2 – Carl Zeiss com amplificação da imagem de 10 vezes (a,b aumentada 30 vezes)

As diferenças morfológicas das colônias de biofidobactérias e lactobacilos como: o tamanho, bordas, e pigmentação com azul de metileno, permitem realizar a contagem diferenciada quando encontram-se misturadas no mesmo meio, tal como pode ser observado nas Figuras 8, 9 e 10.

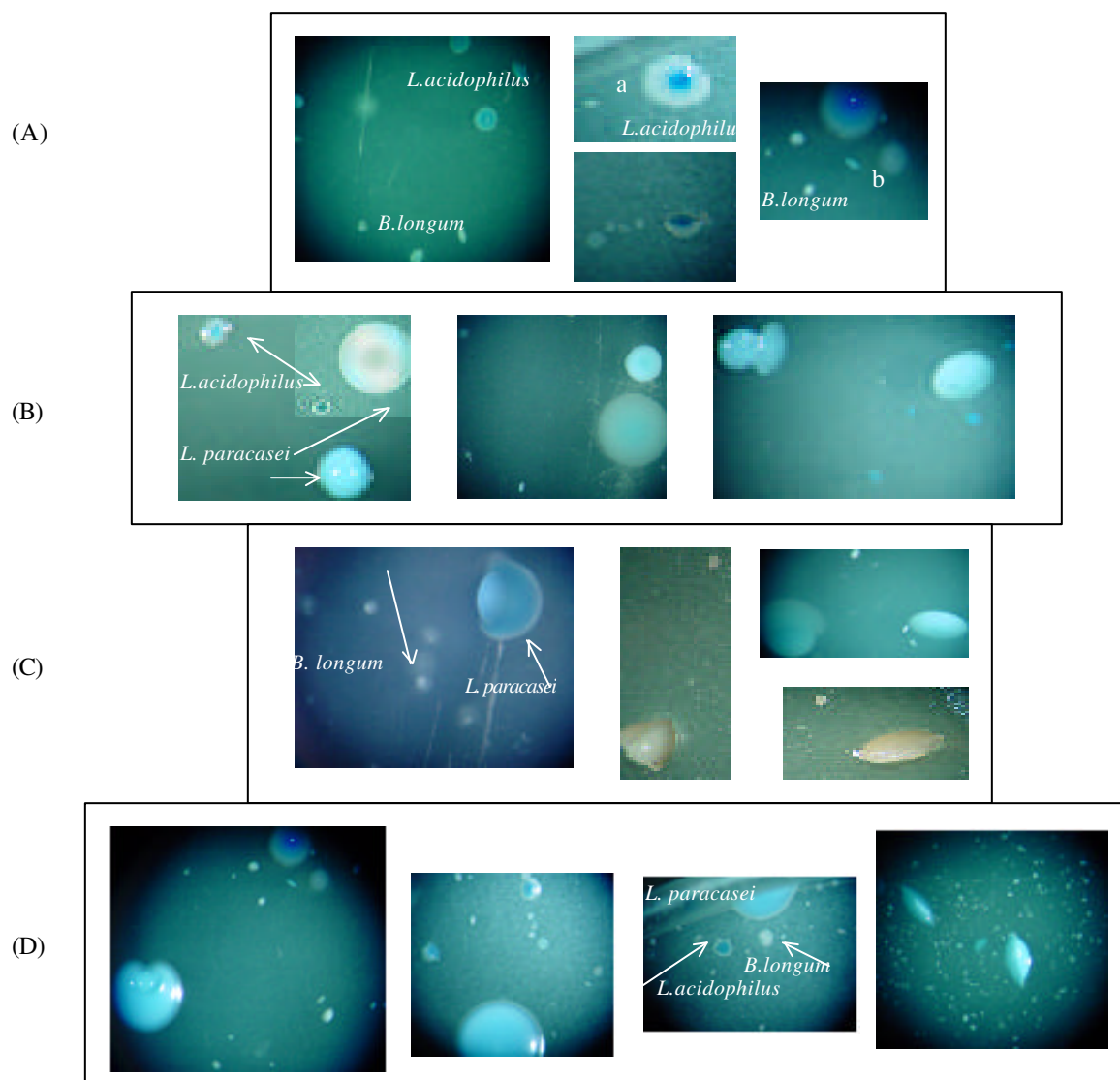


Figura 10. Fotografias das colônias (A) Mistura *B. longum*, *L. acidophilus* (B) Mistura de *L. acidophilus* e *L. paracasei* subsp *paracasei* (C) Mistura de *B. longum* e *L. paracasei* subsp *paracasei* (colônias brancas de LBC81 em Agar MRS) (D) Mistura *B. longum*, *L. acidophilus* e *L. paracasei* subsp *paracasei* em Agar MRS + 0,01% de azul de anilina vistas a través do esteroscópico Citoval 2 – Carl Zeiss com amplificação da imagem de 10 vezes (a,b aumento 30 vezes).

5.2 Seletividade dos meios para contagem diferenciada de probióticos

Na procura de uma metodologia confiável, seletiva e simples para a contagem diferenciada dos probióticos para este estudo, testaram-se os meios Agar MRS-LP (Vinderola & Reinheimer 2000) e MRS-CDAC (Gimenez, 2002) descritos na literatura. As provas realizadas com os meios em avaliação foram feitas simultaneamente tendo como base o meio MRS, meio este de referência para contagem de probióticos. Assim, observadas as dificuldades em usar simultaneamente vários meios de cultura, e baseando-se no conjunto dos resultados, verificou-se que os meios testados não são 100 % seletivos, quer dizer, que às vezes apresentam contagem nula, baixa, igual ou maior que o meio de referência MRS (na mesma condição). Concluiu-se que para este estudo não seriam confiáveis as respostas obtidas com os meios MRS-LP e MRS-CDAC e que a melhor metodologia seria a contagem por diferença de crescimento em Agar MRS em aerobiose e anaerobiose, nos quais as misturas de bactérias diferenciaram-se morfológicamente. Além dos meios MRS modificados serem mais caros, especialmente o MRS-CDAC por conter antibiótico.

A seguir estão apresentados alguns resultados obtidos com os meios MRS-LP, MRS-CDAC.

5.2.1 Agar MRS-LP

Realizou-se a contagem de *B. longum* BL04 *L. acidophilus* LAC 4 e *L. paracasei* LBC81 e suas misturas em tempos diversos de fermentação em extrato de soja a 37 °C.

A Tabela 5 ilustra que o Agar MRS-LP permite a contagem de *B. longum* BL04 com alta porcentagem de recuperação. A inibição do crescimento de *L. acidophilus* puro no meio MRS-LP foi verificada, ao não apresentar contagem, mas na presença de *B. longum* BL04 e *L. paracasei* LBC81 as contagens foram próximas ou maiores em aerobiose com relação as contagens em anaerobiose, verificando-se morfológicamente a presença de *L. acidophilus* LAC4, com porcentagens de recuperação entre 60 e 90 %.

Assim, fica demonstrado que o Agar MRS-LP não é útil para este estudo como meio seletivo para contagem diferenciada dos probióticos nas misturas testadas.

Tabela 5. Contagem de células em extratos hidrossolúveis de soja, fermentado com as culturas puras ou misturas de *B. longum* BL04, *L. acidophilus* LAC4 e *L. paracasei* LBC81, utilizando placas Agar MRS-LP e Agar MRS em condições aeróbias ou anaeróbias.

Tempo de fermentação (horas)	Contagem log (UFC/mL)				% Recuperação	
	MRS-LP Anaerobiose	MRS Anaerobiose	MRS-LP Aerobiose	MRS Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose
<i>B. longum</i> BL 04						
0	8,74	8,61	Não cresceu	Não cresceu	135	~
12	8,30	8,35	Não cresceu	Não cresceu	89	
24	8,00	7,94	Não cresceu	Não cresceu	115	
<i>L. acidophilus</i> LAC4						
0	Não cresceu	-	Não cresceu	7,70		
12	Não cresceu	-	Não cresceu	8,35		
24	Não cresceu	-	Não cresceu	6,85		
<i>L. paracasei</i> LBC81						
60	8,19	8,19	8,20	8,42	100	69
<i>L. acidophilus</i> LAC4/ <i>B. longum</i> BL 04						
24	9,40	9,18	-	8,00	167	-
<i>L. paracasei</i> LBC81/ <i>B. longum</i> BL 04						
24	9,69	9,96	-	9,20	54	-
<i>L. acidophilus</i> LAC4 / <i>L. paracasei</i> LBC81 / <i>B. longum</i> BL 04						
0	5,30	5,43	5,28	5,46	74	66
8	9,25	9,30	9,22	9,28	90	86

Média das análises por duplicata. Considerou-se para 100 % de recuperação a contagem em Agar MRS.

- Não foi testado.

Observou-se que tanto *L. acidophilus* LAC4 (na mistura com *B. longum* BL04) como *L. paracasei* LBC81 (Tabela 5), crescem em Agar MRS na presença e na ausência de oxigênio por serem anaeróbios facultativos. Outra observação interessante é que *B. longum* BL04 não cresce em aerobiose (Tabela 5 e 6), e quando se encontra em mistura com lactobacilos pode ser detectado tanto morfologicamente, quanto pela diferença entre as contagens em condições de anaerobiose e aerobiose. Estas observações são úteis para a contagem seletiva, pois assim procedendo torna-se possível conhecer a quantidade presente de cada probiótico nas misturas utilizadas nas fermentações.

5.2.2 Agar MRS-CDAC

Os resultados dos testes para contagem diferenciada com o Agar MRS-CDAC encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Contagem de células de *L. paracasei* LBC81 e misturas *L. acidophilus* LAC4/ *B. longum* BL04 e *L. paracasei* LBC81 / *B. longum* BL04 em extratos hidrossolúveis de soja fermentado a 37 °C em placas de Agar MRS-CDAC e Agar MRS em condições aeróbicas e anaeróbicas.

Tempo de fermentação (horas)	Contagem log (UFC/mL)			Recuperação (%)	
	MRS-CDAC Anaerobiose	MRS Anaerobiose	MRS Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose
<i>L. paracasei</i> sp LBC81					
0	7,58	7,61	7,54	93	109
12	7,99	8,06	8,19	85	63
24	8,72	8,76	8,74	92	96
60	8,28*	8,19	8,34	124	88
<i>L. acidophilus</i> LAC4/ <i>B. longum</i> BL04					
0	8,36	8,45	7,45	81	809
12	8,61	8,80	7,04	64	3691
24	9,60	9,63	7,83	93	5970
<i>L. paracasei</i> LBC81 / <i>B. longum</i> BL04					
0	7,95	7,54	7,00	257	900
12	9,57	9,28	9,26	194	206
24	9,45	9,32	9,35	133	126

Os resultados são a média de análises por duplicata. Considerou-se para 100 % de recuperação as contagens em Agar MRS.

* MRS-CDAC incubado em aerobiose por 72 horas a 37°C

Verifica-se que, apesar de que o meio MRS-CDAC foi considerado como seletivo para bifidobactérias em presença de lactobacilos (Gimenez, 2002), os ensaios realizados no laboratório não confirmaram sua eficiência, ao contrário, os lactobacilos cresceram muito bem neste meio, alcançando níveis de recuperação perto ou maiores que 100%, quer dizer, que as espécies selecionadas crescem tanto em Agar MRS, que é o meio de referência para contagem de probióticos, como em Agar MRS-CDAC.

As altíssimas percentagens de recuperação de MRS-CDAC em anaerobiose em relação às contagens em Agar MRS em presença de oxigênio se devem a que as bifidobactérias só cresceram em anaerobiose e que nas condições estudadas as bifidobactérias se desenvolveram melhor e em maior número em extrato de soja que os lactobacilos quando os dois se encontram presentes durante a fermentação.

Apesar do meio MRS-CDAC não ser seletivo, a morfologia das colônias é melhor visualizada neste meio, o que facilita a contagem. Isto se deve ao conteúdo de azul de anilina que é absorvido pelas colônias, que se tornam azuladas, rodeadas de um halo mais claro bem definido para cada espécie, como se observa na Figura 9.

Verificou-se que as diferenças nas contagens em aerobiose e anaerobiose permitem calcular indiretamente a quantidade de cada gênero (lactobacilos e bifidobacterias) presentes em qualquer etapa da fermentação.

5.3 Teste preliminar do crescimento de probióticos em extrato de soja

Os dados da Tabela 7, representados na Figura 11, como a população probiótica em função do tempo de fermentação, permitem ter uma idéia do comportamento de cada espécie no meio extrato hidrossolúvel desengordurado de soja 10 %, sem aditivos.

Verificou-se que tanto os lactobacilos estudados quanto *B. longum* BL04, apresentam boa aptidão para crescerem no meio, manifestada pelo incremento da população na maioria dos casos, especialmente quando se misturam as espécies; só o *B. longum* BL04 decresceu ao longo da fermentação, enquanto a população de *L. paracasei* LBC81, aumentou paulatinamente até 48 horas de incubação, e depois decresceu rapidamente.

A linhagem de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 sofreu perda de viabilidade na etapa de reativação da cultura liofilizada, diluição e congelamento do inóculo, realizada como descrito no item 4.2.3. Apesar de ter sido utilizado maior quantidade de inóculo inicial (10^9 UFC/mL) verificou-se que a linhagem de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 cresceu mais lentamente em extrato de soja do que as linhagens de *B. longum* BL04 e *L. acidophilus* LAC4. Entre as linhagens testadas, esta última apresentou baixa viabilidade em extrato hidrossolúvel de soja e contagem de células mais baixa.

Os resultados preliminares mostram que o intervalo de tempo de 12 horas entre amostragens foi muito longo, além do inóculo inicial ser bastante alto, 4%, o que equivale a concentrações iniciais de $10^8 - 10^9$ UFC/mL. Estes cálculos estão baseados nas contagens iniciais dos sachês com os liofilizados. Desta forma a fase lag não é observada, o que seria recomendável durante a fabricação de produtos, mas não para um estudo cinético.

Tabela 7. Desenvolvimento das linhagens de *B. longum* BL04, *L. paracasei* LBC81 e *L. acidophilus* LAC4, em cultura pura e em mistura durante a fermentação em extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v) a 37 °C.

Tempo de fermentação (horas)	Contagem log (UFC/mL)			
	Média das contagens em anaerobiose	Média das contagens em aerobiose	Contagem de Lactobacilos	Contagem de Bifidobacterias
<i>B. longum</i> BL04				
0	8,68 (9,52) ⁺			8,68
12	8,33			8,33
24	7,97(8,60) ⁺			7,97
36	7,54			7,54
48	7,90			7,90
60	7,74			7,74
<i>L. acidophilus</i> LAC4				
0		7,70 (7,65) ⁺	7,70	
12		8,35	8,35	
24		6,85 (7,00) ⁺	6,85	
36		6,70	6,70	
48		6,48	6,48	
60		6,85	6,85	
<i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81				
0	7,60	7,54 (8,87) ⁺	7,57*	
12	8,02	8,19	8,12*	
24	8,74	8,74 (10,03) ⁺	8,74*	
36	9,27	9,08	9,19*	
48	9,37	9,07	9,25*	
60	8,19	8,34	8,27*	
<i>L. acidophilus</i> LAC4 / <i>B. longum</i> BL04				
0	8,40	7,45	7,45	8,35
12	8,71	7,04	7,04	8,71
24	9,62	7,83	7,83	9,61
36	8,27	5,86	5,86	8,27
48	7,58	6,01	6,01	7,56
60	6,77	6,18	6,18	6,64
<i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81/ <i>B. longum</i> BL04				
0	7,80	7,00	7,00	7,72
12	9,45	9,26	9,26	9,00
24	9,39	9,35	9,35	8,37
36	8,29	8,22	8,22	7,49
48	9,35	9,33	9,33	7,87
60	9,63	9,62	9,62	8,08

Os resultados são a média de análises por duplicata. ⁺(contagem de células da amostra sem congelar).

* Média das contagens em anaerobiose e aerobiose.

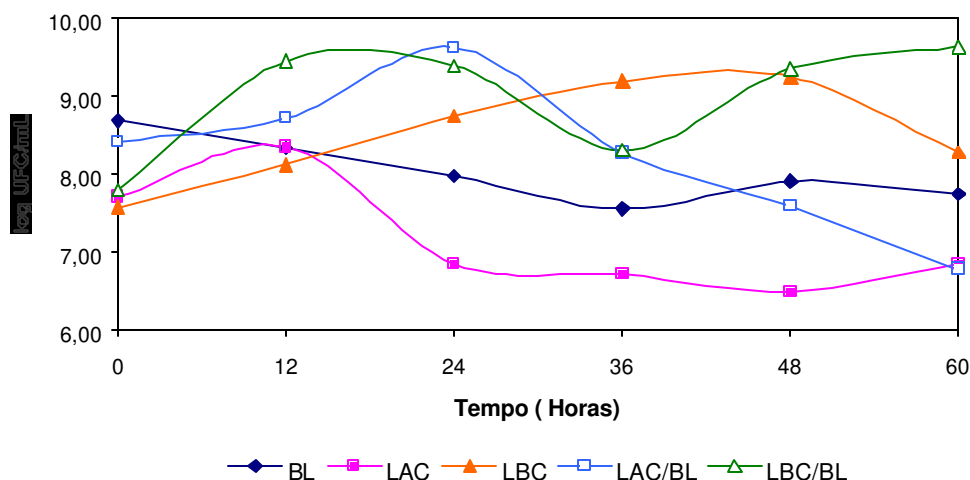


Figura 11. Representação do crescimento individual e em mistura de *B. longum* BL04 (BL), *L. acidophilus* LAC4 (LAC), *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 (LBC) em extrato hidrosolúvel de soja a 37°C em Agar MRS.

A etapa de congelamento utilizada na padronização do inóculo, descrita no item 4.2.3. e no item 4.2.3.1 após fermentação das bebidas, causa perdas de probióticos, as bifidobactérias apresentaram uma diminuição na contagem de perto de um ciclo log, a bactéria *L. acidophilus* LAC4 manteve a contagem, e *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 diminuiu em 1,5 a dois ciclos log. Assim, dos probióticos estudados, *L. acidophilus* LAC4 é o mais resistente ao congelamento.

Observou-se que *B. longum* se desenvolve melhor na presença de *L. acidophilus*. Foi obtido contagem de bifidobactérias iguais a 10^9 UFC/mL, sendo verificado leve inibição do crescimento do *L. acidophilus* (10^5 a 10^7 UFC/mL). Na cultura mista de *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*, as duas espécies atingiram 10^9 UFC/mL. É provável que os lactobacilos por serem proteolíticos (Tamime *et al.* 1995) disponibilizem nutrientes requeridos pelas bifidobacterias.

O inóculo inicial influe nos fenômenos observados, pois na mistura LAC/BL a proporção foi 50:50 em volume, mas 10^7 : 10^8 em população, enquanto para LBC/BL (também 50:50 em volume) foi 10^8 : 10^8 . Portanto, a proporção e concentração inicial do inóculo nas misturas, será objeto de estudo neste trabalho.

As fases *lag* e exponencial se dão entre as 0 e 12 horas de fermentação para a maioria dos ensaios. Na mistura LBC/BL se observou um crescimento constante, somente após 36 horas verificou-se uma diminuição na contagem de células, mas esta se recuperou novamente no final da fermentação, como se se regenerasse.

Para um ótimo estudo cinético, neste tipo de fermentação é necessário partir de inóculos muito pequenos (entre 10^3 e 10^5 UFC/mL), para poder apreciar todas as fases do crescimento, especialmente a exponencial. Segundo o observado, o acompanhamento cinético será feito entre 0 e 24 horas de fermentação com amostragem cada 4 horas, o que equivale a sete amostras, número reduzido de pontos para modelar matematicamente, motivo pelo qual as cinéticas são avaliadas só graficamente.

Verificou-se um rápido consumo de substratos e geração de metabólicos, basicamente ácidos orgânicos. Os açúcares próprios do extrato hidrossolúvel de soja foram consumidos nas primeiras doze horas de fermentação de cada uma das bebidas formuladas, e convertidos em ácidos tituláveis, causando queda do pH (Tabela 8).

Os valores de pH e Brix (Figuras 12 e 13) apresentaram comportamento similar em cada uma das fermentações. Observou-se que *B. longum*, em cultura pura, foi a linhagem que mais acidificou o extrato hidrossolúvel de soja após 48 horas de fermentação. Os outros microrganismos e as misturas abaixam o pH, mas apresentam um leve incremento do pH após 60 horas de fermentação, causado provavelmente por autólise dos microrganismos.

Tabela 8. Consumo de açúcares e produção de ácidos por células de *B. longum* BL04, *L. paracasei* LBC81 e *L. acidophilus* LAC4 em cultura pura e em mistura durante fermentação do extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v) a 37 °C.

Tempo de fermentação (horas)	Análise			
	Açúcares reductores (g/L)	Brix	pH	Acidez titulável (% ac. láctico)
<i>B. longum</i> BL 04				
0	2,21	7,0	6,00	0,053
12	1,58	2,6	4,62	0,135
24	1,14	2,4	4,42	0,176
36	0,99	2,2	4,38	0,188
48	0,87	2,1	4,35	0,206
60	0,77	2,1	4,26	0,269
<i>L. acidophilus</i> LAC 4				
0	1,22	7,2	6,54	0,035
12	0,74	2,8	4,44	0,108
24	0,68	2,8	4,38	0,114
36	0,69	2,8	4,39	0,144
48	0,93	2,8	4,39	0,170
60	0,93	2,8	4,45	0,132
<i>L.paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81				
0	1,29	7,4	6,31	0,036
12	0,98	2,6	4,80	0,090
24	0,93	2,4	4,44	0,134
36	0,96	2,4	4,40	0,150
48	0,70	2,4	4,35	0,180
60	0,43	2,4	4,38	0,134
<i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04				
0	1,73	7,2	6,14	0,045
12	0,66	2,6	4,43	0,187
24	0,51	2,4	4,30	0,224
36	0,52	2,3	4,30	0,239
48	0,51	2,2	4,29	0,234
60	1,13	2,2	4,48	0,186
<i>L.paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81 / <i>B. longum</i> BL 04				
0	1,30	7,5	6,13	0,049
12	0,54	2,5	4,50	0,179
24	0,51	2,4	4,43	0,228
36	0,41	2,3	4,39	0,217
48	0,57	2,2	4,40	0,222
60	1,04	2,0	4,58	0,120

Os resultados são a média de análises em duplicata.

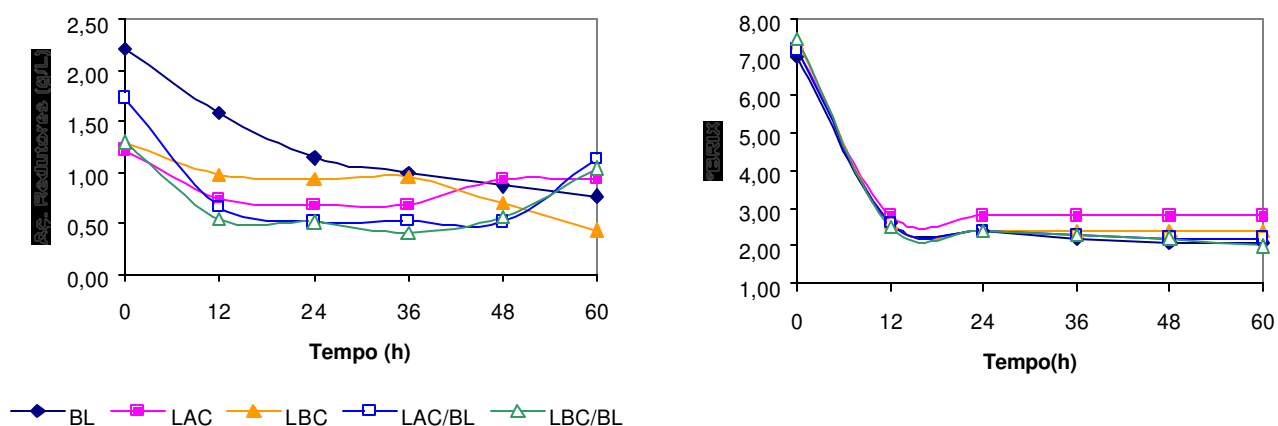


Figura 12. Representação da variação dos açúcares redutores e °Brix durante a fermentação individual e em mistura de *B. longum* BL04 (BL), *L. acidophilus* LAC4 (LAC), *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 (LBC), em extrato hidrossolúvel de soja a 37°C.

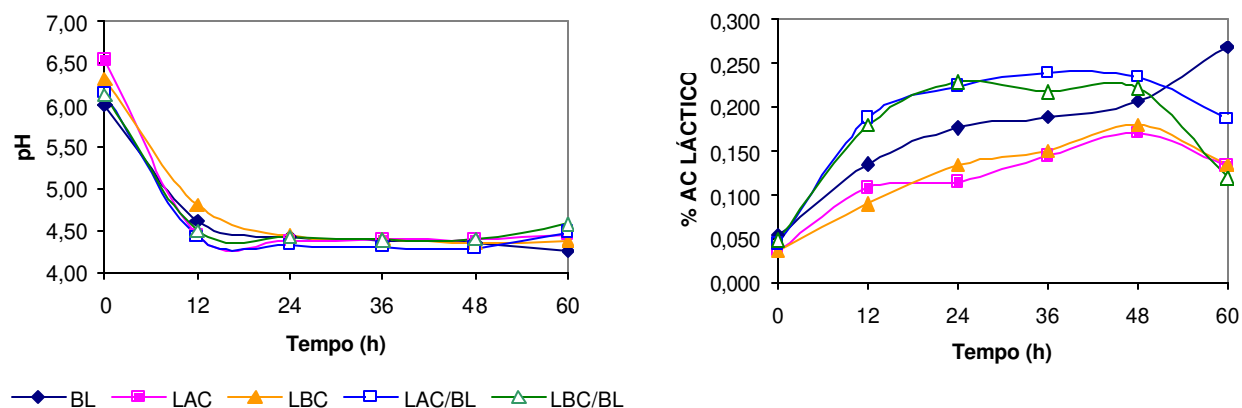


Figura 13. Representação da variação do pH e acidez titulável durante a fermentação individual e em mistura de *B. longum* BL04(BL), *L. acidophilus* LAC4 (LAC), *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 (LBC) em extrato hidrossolúvel de soja a 37°C.

5.4 Desenvolvimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja em presença de oligossacarídeos prebióticos.

5.4.1 Contagem de células do inóculo

Verificou-se por plaqueamento a contagem das culturas diluídas que foram padronizadas em volumes de inóculo fixos, em frascos estéreis, e congelados a -18°C , para aplicação posterior por DVS (*Direct Vat Set*) no meio a fermentar (como se explica em 4.2.3), após descongelamento. Estes dados foram utilizados posteriormente para efetuar os cálculos da dosagem do inóculo em cada fermentação com os valores aproximados para *L. acidophilus* LAC4 de $4,0 \times 10^{10}$ UFC/mL, *L. paracasei* LBC81 de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL, e *B. longum* BL04 de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Os resultados estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9. Contagem de células em UFC/mL dos inóculos padronizados em diluições decimais, obtidos a partir dos probióticos liofilizados concentrados, em Agar MRS + 0,1% de azul de anilina a 37°C

Espécie	Contagem (UFC/mL)			
	1	2	3	Média
<i>L. acidophilus</i> LAC4	$4,0 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$3,83 \times 10^{10}$
<i>L. paracasei</i> LBC81	$2,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$3,25 \times 10^8$	$2,98 \times 10^8$
<i>B. longum</i> BL04	$2,86 \times 10^9$	$2,54 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$	$2,75 \times 10^9$

1,2 e 3 são repetições das contagens.

5.4.2 Quantificação de carboidratos em xaropes de açúcares contendo FOS preparado como substrato de enriquecimento do extrato hidrossolúvel de soja.

Neste trabalho foram realizadas duas produções de xarope de açúcares contendo frutooligossacarídeos, FOS. A primeira produção, foi utilizada no estudo das cinéticas de crescimento de probióticos em meio de fermentação extrato hidrossolúvel de soja. Este xarope foi sintetizado pela enzima inulinase imobilizada de *K. marxianus* com atividade de 28,13 UI/mL a partir de uma solução com 50 % sacarose a pH 5,0, a 50°C por 5 horas. Obteve-se um xarope com 12,3% de FOS, conforme se observa na Tabela 10. Já, a segunda produção, foi obtida com inulinase de atividade de 21,73 UI/mL para um conteúdo final de

8,46% de FOS. O restante da primeira produção foi misturado com a segunda produção, resultando um xarope com 9,55 % de FOS. Esta mistura foi utilizada no planejamento experimental Plackett & Burman para avaliação das variáveis significativas na fermentação de extrato hidrossolúvel de soja com probióticos.

Tabela 10. Composição centesimal dos xaropes de açúcares e FOS sintetizados a partir de enzima inulinase imobilizada de *K. marxianus* a partir de uma solução com 50 % sacarose a pH 5,0 a 50 °C por 5 horas.

Xarope	Produção 1	Produção 2	Mistura 1 e 2*
Nome do componente	Concentração dos componentes em g/L		
Glicose	192,69	171,43	177,22
Frutose	128,13	141,81	154,34
Sacarose	117,67	144,49	120,69
Kestose (GF ₂) ⁺	50,94	42,28	47,75
Nistose (GF ₃) ⁺	3,85	0	0
Frutosilnistose (GF ₄) ⁺	6,72	0	0
TOTAL AÇÚCARES g/L	500,00	500,00	500,00
TOTAL FOS g/L	61,51	42,28	47,75
% FOS	12,30 %	8,46 %	9,55 %

⁺Frutooligosacarídeos FOS: kestose GF₂, nistose GF₃, e frutosilnistose GF₄. * Xarope empregado no planejamento experimental Plackett & Burman.

5.4.3 Caracterização do extrato hidrossolúvel de soja

Os resultados da análise físico-química dos extratos de soja esterilizados empregados como meio de fermentação para o estudo das cinéticas de crescimento de probióticos, encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) em g/L de extrato de soja com e sem adição de xarope de açúcares.

Amostra	PH	AR (g/L)	ART (g/L)
Extrato hidrossolúvel de soja desengordurado a 7,5 %	6,81	0,414	38,901
Extrato hidrossolúvel de soja desengordurado a 7,5 % + 25 g/L de Xarope com 12,3% de FOS	6,81	15,569	94,218

Análises em triplicata

Por dificuldades de separação e integração dos picos dos oligossacarídeos, não foi possível neste trabalho apresentar dados quantitativos destes compostos. Desta forma apresentou-se os dados qualitativos, sobre os quais são feitas as considerações e discussões concernentes.

No Anexo 6, podem ser observados os dados qualitativos de alguns açúcares e oligossacarídeos detectados por cromatografia HPLC e de íons nos seguintes extratos e curvas padrão de monossacarídeos e oligossacarídeos:

- 1) Padrões de açúcares e oligossacarídeos
- 2) Extrato hidrossolúvel de soja 7,5 %
- 3) Extrato hidrossolúvel de soja 7,5% + 25 g/L de xarope contendo FOS
- 4) Extrato hidrossolúvel de soja 7,5% + 20 g/L de xarope contendo FOS
- 5) Extrato hidrossolúvel de soja 6,0 % + 10 g/L de xarope contendo FOS
- 6) Extrato hidrossolúvel de soja 4,5 % + 20 g/L de xarope contendo FOS
- 7) Extrato hidrossolúvel de soja 4,5 %

Verificou-se a presença dos monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos: glicose, frutose, sacarose, galactose, rafinose e estaquiose em extrato hidrossolúvel de soja.

A análise de carboidratos por cromatografia de íons e HPLC foi dificultada pela necessidade de diferentes colunas para a separação de carboidratos. Utilizando-se o cromatógrafo de íons HPLC-PAD e a coluna PA100, foi obtida a separação cromatográfica de frutose e sacarose, porém os frutooligossacarídeos e os açúcares rafinose e estaquiose ficaram sobrepostos, além disso, a glicose e a galactose apresentaram o mesmo tempo de retenção. Desta forma foi testada a coluna PA10 na qual foi obtida a separação cromatográfica de galactose, glicose, rafinose e estaquiose, porém a sacarose e frutose ficaram sobrepostos e os frutooligossacarídeos não foram separados cromatograficamente. Utilizando o HPLC equipado com detector de índice de refração e coluna HPX 87H, os açúcares glicose, frutose e galactose foram separados, mas a sacarose e rafinose ficaram sobrepostos e a estaquiose e frutooligossacarídeos não foram separados cromatograficamente.

Segundo o exposto acima, a quantificação de carboidratos dos extratos hidrossolúveis de soja contendo ou não xarope com frutooligossacarídeos deve ser estudada posteriormente com detalhes em trabalhos futuros.

5.4.4 Cinéticas de crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja

Fermentação do extrato de soja com probióticos puros.

Os probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04 puros, apresentam ótimo crescimento em extrato hidrossolúvel de soja, atingindo contagem de 10^{12} - 10^{13} UFC/mL entre 20 e 24 horas de incubação, as proteínas da soja são desnaturadas pela queda do pH formando um coágulo que dá consistência à bebida fermentada; enquanto que, *L. acidophilus* LAC 4 puro, apresenta um crescimento débil em soja, observado pela baixa contagem, e a pouca mudança no pH do meio ao longo das 24 horas de fermentação, mantendo as proteínas em suspensão, com pouca desnaturação. Os resultados das cinéticas encontram-se resumidos na Tabela 12 e representados nas Figuras 14 e 17 (A), (B) e (C).

Tabela 12. Crescimento de probióticos das culturas puras *L. paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 81), *L. acidophilus* (LAC 4) e *B. longum* (BL 04) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.

Tempo de fermentação (horas)	Contagem log UFC/mL	pH	AR (g/L)	ART (g/L)
<i>B. longum</i> BL 04				
0,02	6,5	6,91	0,4	31,6
4	6,7	6,86	0,3	35,3
8	7,1	6,74	0,4	32,2
12	8,2	6,32	0,7	31,3
16	10,2	5,52	1,1	32,0
20	12,1	5,15	1,2	27,3
24	12,8	4,96	0,8	37,4
<i>L. acidophilus</i> LAC 4				
0,02	3,7	6,91	0,2	46,1
4	3,7	6,89	0,5	34,5
8	6,0	6,85	0,4	40,3
12	7,6	6,64	1,1	35,5
16	8,5	6,75	1,7	36,2
20	8,3	6,55	1,3	28,7
24	7,1	6,17	0,9	24,9
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81				
0,02	7,0	6,81	0,9	34,1
4	7,2	6,12	0,6	31,9
8	9,6	5,52	0,8	39,1
12	10,2	5,28	0,8	20,1
16	12,7	4,64	0,9	18,8
20	13,3	4,47	0,9	15,9
24	13,0	4,40	0,3	17,6

Analises em duplicata.

Todas as fermentações apresentaram a fase lag entre 0 e 4 horas, a fase exponencial prolongou-se até 24 horas em 6-7 ciclos log. Para *L. acidophilus* foi até 16 horas com crescimento de 4-5 ciclos logarítmicos, partindo de inóculos entre 5 e 6 log UFC/mL (Figura 14).

Chou *et al.* (2000) encontraram um máximo de 7,11 log UFC/mL após 48 horas de fermentação de 'leite de soja' por *B. longum*, partindo de um inóculo de 4,06 log UFC/mL, o que significa que o nível de inóculo não deve ser muito baixo para que a fermentação seja menos prolongada e para que alcancem contagens superiores a 8 log UFC/mL, como aconteceu com *L. acidophilus* cujo inóculo foi de 3,7 atingindo só 8,5 log UFC/mL (Tabela 12 e Figura 14)

Os açúcares não redutores (sacarose e oligossacarídeos) foram sofrendo mudanças ao longo da fermentação, sendo hidrolisados a açúcares redutores e em alguns momentos aproveitados pelos microrganismos como fonte de carbono, principalmente por *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, como se observa na Figura 17 (B) e (C).

Fermentação do extrato hidrossolúvel de soja com misturas de probióticos.

Os resultados do crescimento celular, do pH e carboidratos da fermentação das misturas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04, e de *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04 em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, estão ilustrados na Tabela 13.

A Tabela 14 ilustra o crescimento celular, alteração do pH e carboidratos durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja utilizando mistura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04.

As fases lag das diferentes misturas apresentaram-se entre 0 e 4 horas, e as fases exponenciais prolongaram-se até 20 horas (Figuras 14, 15 e 16))

Existe evidência de simbiose entre *B. longum* e *L. acidophilus*, por apresentarem populações elevadas, especialmente observada pelo incremento na contagem individual de *L. acidophilus* LAC4, atingindo 10^{12} UFC/mL (Figura 15 (B)) após 24 horas de fermentação. No caso das misturas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* com *B. longum* as contagens individuais diminuíram notoriamente, obtendo-se um máximo de 10^{10} UFC/mL entre 16 e 24 horas de fermentação (Figuras 14, 15 (A) e 16). O consumo dos substratos

pelas linhagens de microrganismos ocorreu rapidamente junto com a queda do pH (Figura 17 (A),(B) e(C)), o que causou com o tempo leve inibição do crescimento celular, como mostrado nas Tabelas 13 e 14 e Figuras 15A e 16.

Tabela 13. Crescimento da mistura de probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *B. longum* BL 04 e *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04 em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.

Tempo (horas)	Aerobiose log UFC/mL	<i>B. longum</i> * Log UFC/mL	Anaerobiose Contagem total Log UFC/mL	pH	AR (g/L)	ART (g/L)
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>B. longum</i> BL 04						
0,02	7,27	6,30	7,32	6,86	0,4	34,2
4	7,39	6,43	7,44	6,81	0,3	35,0
8	8,65	8,52	8,89	6,39	0,5	30,60
12	8,92	8,33	9,02	5,79	2,0	31,7
16	10,03	9,07	10,08	4,92	1,8	24,4
20	9,38	8,90	9,38	4,59	1,4	16,1
24	9,60	8,78	9,66	5,43	1,3	23,6
<i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04						
0,02	6,67	5,85	6,73	6,86	0,3	33,6
3	5,00	6,47	6,49	6,79	0,4	36,1
7	5,78	7,06	7,09	6,72	0,4	33,5
11	8,04	8,12	8,38	6,46	0,6	34,1
16	7,70	8,53	8,59	5,60	1,6	32,3
20	10,81	8,93	10,81	5,15	1,3	24,9
24	12,00	8,48	12,00	4,92	0,1	23,2

Análises em duplicata

* Contagem de *B. longum* (UFC/mL) = Contagem total ou em anaerobiose – Contagem em aerobiose.

Tabela 14. Crescimento da mistura de probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04 em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37 °C, e mudanças no pH, AR e ART.

Tempo (horas)	log UFC/mL LAC	log UFC/mL LBC	log UFC/mL BL	log UFC/mL TOTAL	PH	A. R (g/L)	ART (g/L)
<i>L. acidophilus</i> LAC 04 / <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>B. longum</i> BL 04							
0,02	5,00	5,14	4,04	5,40	6,85	0,4	38,9
4	5,93	6,71	6,70	6,70	6,78	0,4	37,1
8	8,79	9,06	8,77	9,37	6,42	0,4	38,6
12	9,30	9,44	9,92	10,11	5,80	1,0	36,2
16	9,35	9,98	9,34	10,15	5,03	1,1	35,8
20	9,56	10,33	9,98	10,54	4,60	0,6	27,6
24	9,00	10,35	10,54	10,60	4,46	0,9	23,5

Análises em duplicata

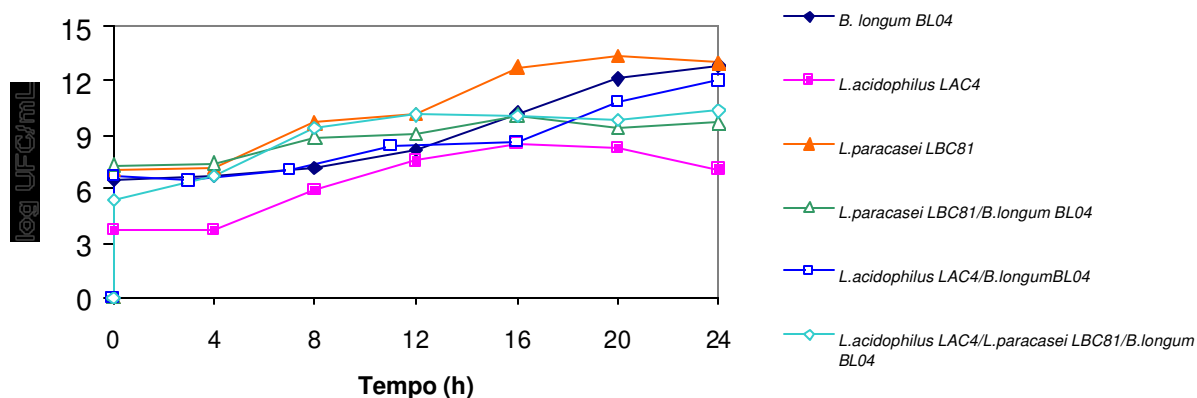


Figura 14. Crescimento das linhagens de *B. longum* BL04, *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 em cultura pura e em mistura, em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37°C.

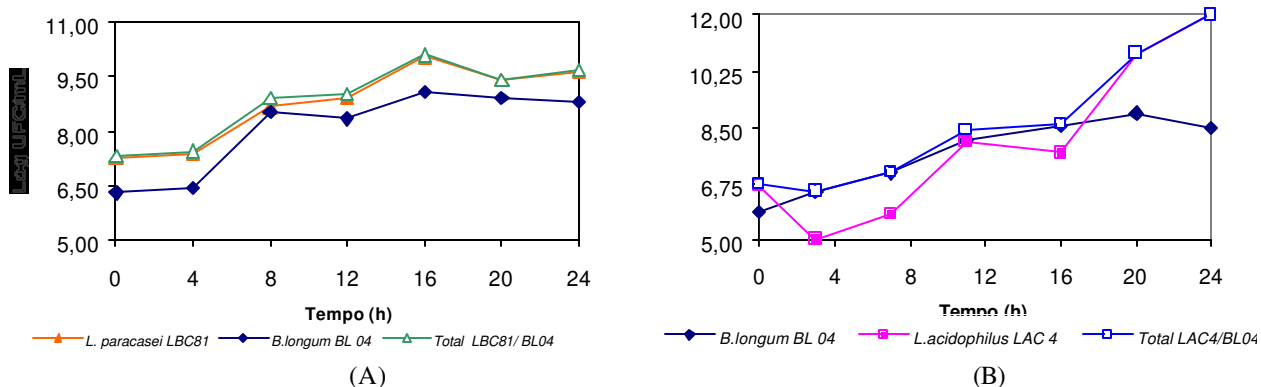


Figura 15. Crescimento dos microrganismos em extratos hidrossolúveis de soja 7,5% fermentados a 37°C com misturas de *B. longum* BL04 com *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81(A) e mistura de *B. longum* BL04 com *L. acidophilus* LAC4(B).

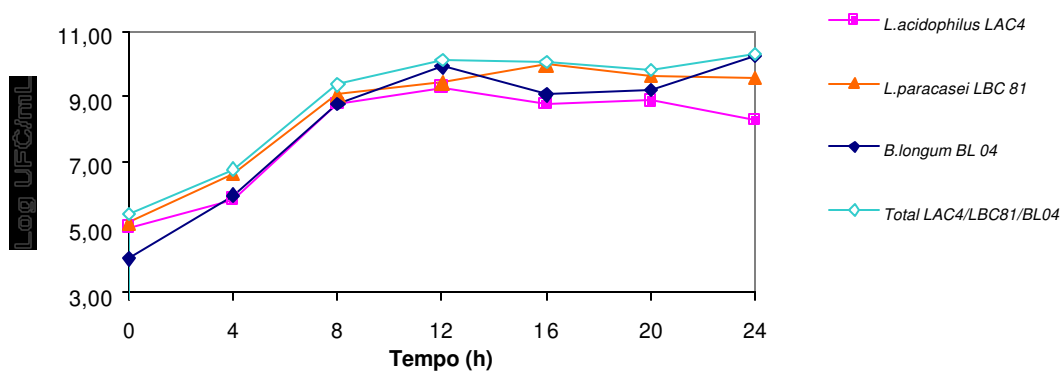


Figura 16. Crescimento dos microrganismos em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% fermentados a 37°C com misturas de *B. longum* BL04, *L. acidophilus* LAC4 e *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81.

L. acidophilus regula o consumo de açúcares, controlando a queda do pH através da proteólise (Tamime, *et al.* 1995), e, permitindo um melhor desenvolvimento individual.

Simultaneamente, *B. longum* hidrolisa açúcares, como rafinose e estaquiose, devido a sua atividade α -galactosidase (Scalabrini, *et al.* 1998), disponibilizando-os para os lactobacilos e facilitando seu desenvolvimento. Assim, verifica-se a simbiose existente entre as espécies e gêneros estudados.

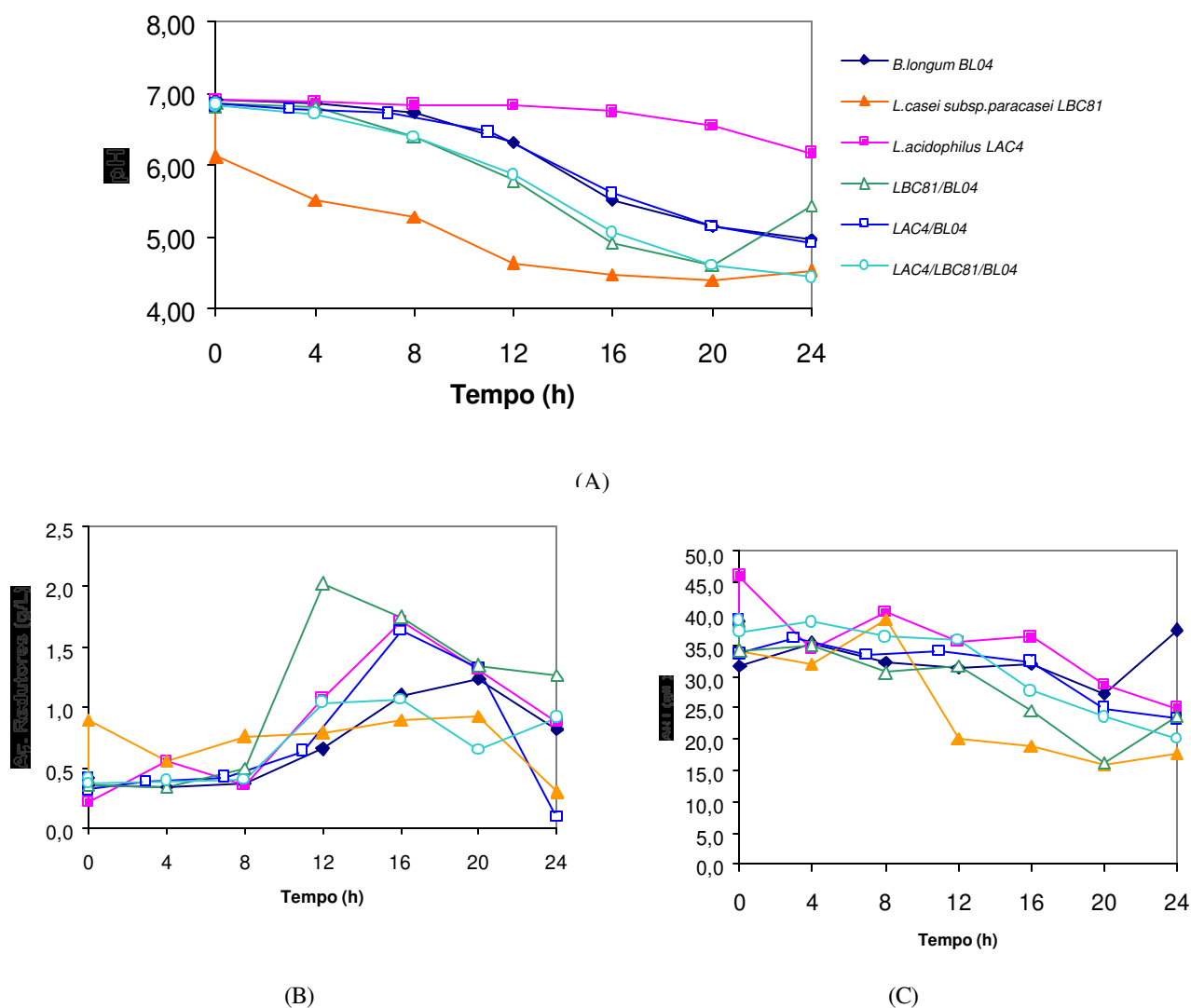


Figura 17. Alteração do pH (A), açúcares redutores (B) e açúcares redutores totais, ART (C) durante a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja 7,5% a 37°C utilizando culturas puras e misturas de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04.

5.4.5 Crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja, com adição de frutooligossacarídeos, FOS.

Fermentação do extrato de soja com mistura de probióticos em presença de FOS.

Observa-se nas Tabelas 15 e 16 o desenvolvimento de probióticos em mistura na presença de frutooligossacarídeos em extrato hidrossolúvel de soja a 37 °C durante 24 horas de fermentação.

Há evidência de simbiose entre probióticos e prebióticos, pois as populações se desenvolvem bem no início, mas a rápida queda do pH causa inibição com o tempo de fermentação. O extrato hidrossolúvel de soja fermentado com mistura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *B. longum* BL 04 sofreu uma diminuição rápida do pH a partir de 12 horas de fermentação, apresentando uma máxima contagem total de 9,30 log UFC/mL às 16 horas, sendo favorecido o crescimento de *L. paracasei* com 9,04 log UFC/mL. No entanto, o extrato hidrossolúvel de soja com mistura de *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04 apresentou uma queda de pH mais lenta atingindo uma contagem máxima de 9,65 log UFC/mL após 24 de fermentação, sendo favorecido o crescimento de *B. longum* com 9,65 logUFC/mL, como observa-se na Tabela 15 e Figura 18.

Tabela 15. Crescimento dos microrganismos, alteração no pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% contendo 25 g/L de Xarope com FOS fermentados a 37°C com misturas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *B. longum* BL 04 e *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04.

Tempo (horas)	Aerobiose log UFC/mL	BL Log UFC/mL	TOTAL log UFC/mL	pH	AR (g/L)	ART (g/L)
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 / <i>B. longum</i> BL 04 + FOS						
0,02	5,80	6,05	6,24	6,70	13,9	109,0
4	6,02	6,14	6,39	6,62	13,2	101,7
8	7,30	7,06	7,50	6,19	12,2	98,2
12	8,35	8,08	8,54	5,04	16,5	110,5
16	9,04	8,95	9,30	4,30	9,6	89,3
20	8,38	8,23	8,38	4,06	8,4	96,0
24	8,16	7,85	8,33	3,92	4,6	70,0
<i>L. acidophilus</i> LAC 4 / <i>B. longum</i> BL 04 + FOS						
0,02	4,90	6,27	6,29	6,80	18,3	93,2
3	5,06	6,44	6,46	6,78	16,5	89,0
7	5,65	6,39	6,46	6,71	15,6	68,3
11	7,20	7,95	8,02	6,34	16,9	95,5
16	8,25	8,53	8,71	5,61	15,8	90,0
20	8,41	9,19	9,26	5,12	20,5	88,0
24	8,59	9,65	9,69	4,87	16,4	82,0

Análises em duplicata

Verifica-se que a mistura *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04 em presença de FOS (Tabela 16 e Figura 18) foi a que apresentou a maior contagem total em 20 horas de fermentação, atingindo uma população de 10^{10} UFC/mL, sendo a máxima contagem para *B. longum*, enquanto para *L. paracasei* e *L. acidophilus* a máxima alcançada foi de 10^9 UFC/mL em 24 horas, nas mesmas condições.

Tabela 16. Crescimento de probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 81) / *L. acidophilus* (LAC 4) / *B. longum* (BL 04) em extrato hidrossolúvel de soja 7,5% + 25 g/L de Xarope com FOS a 37 °C, e mudanças no pH e açúcares redutores e ART.

Tempo (horas)	log UFC/mL LAC	log UFC/mL LBC	log UFC/mL LAC+LBC	log UFC/mL BL	log UFC/mL TOTAL	PH	A.R. (g/L)	ART (g/L)
0,02	5,59	6,37	6,44	6,04	6,58	6,72	17,3	89,2
4	6,35	6,82	6,95	6,32	7,04	6,67	17,1	85,5
8	7,01	7,77	7,84	8,00	8,22	6,24	18,1	86,3
12	8,48	9,18	9,26	9,57	9,74	5,05	15,8	84,4
16	8,08	9,44	9,46	8,71	9,53	4,33	12,5	80,2
20	8,32	9,76	9,77	10,05	10,23	4,01	9,3	69,3
24	8,83	9,85	9,89	9,64	10,08	3,85	5,7	65,1

Análises em duplicata

Como descrito na Tabela 3, e verificado por autores como Chou & Hou (2000), Hou, Yu & Chou (2000), Scalabrini, *et. al.* (1998), Tamime *et al.* (1995), a presença de fatores bifidogênicos no extrato de soja, como os oligossacarídeos rafinose e estaquiase, assim, como outros açúcares (sacarose, frutose, glicose, galactose), vitaminas do complexo B e fontes de nitrogênio das proteínas hidrossolúveis da soja, fazem do 'leite de soja' um meio complexo e ótimo substrato para crescimento de *B. longum* e *L. paracasei* puros e *L. acidophilus* em misturas. Os probióticos 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* (neste estudo) (Figuras 19, 20 e 21), e a disponibilidade de açúcares pelas bifidobactérias com a diminuição da inibição de *L. acidophilus*, fortalecendo seu crescimento.

Chou *et al.* (2000) verificou que durante a adição de diferentes sacarídeos e oligossacarídeos durante a fermentação do extrato de soja, só a bifitose obteve efeito estimulante ao crescimento de *B. longum*, a contagem aumentou de 8,50 a 8,86 (log

UFC/mL) após 48 horas de fermentação. Enquanto neste estudo, as contagens foram superadas entre 8 e 24 horas de fermentação com e sem adição de prebióticos atingindo níveis de 10 log UFC/mL (Tabelas 13, 14, 15 e 16 e Figuras 19, 20 e 21), influenciado pela quantidade de inóculo.

Como as bifidobactérias são altas produtoras de ácido acético (García, 1993), as bebidas fermentadas apresentam um flavor desagradável. Este efeito diminui-se com as misturas dos lactobacilos e bifidobactérias já que resulta em um melhor balanço da acidez, dando como resultado um produto sensorialmente mais aceitável.

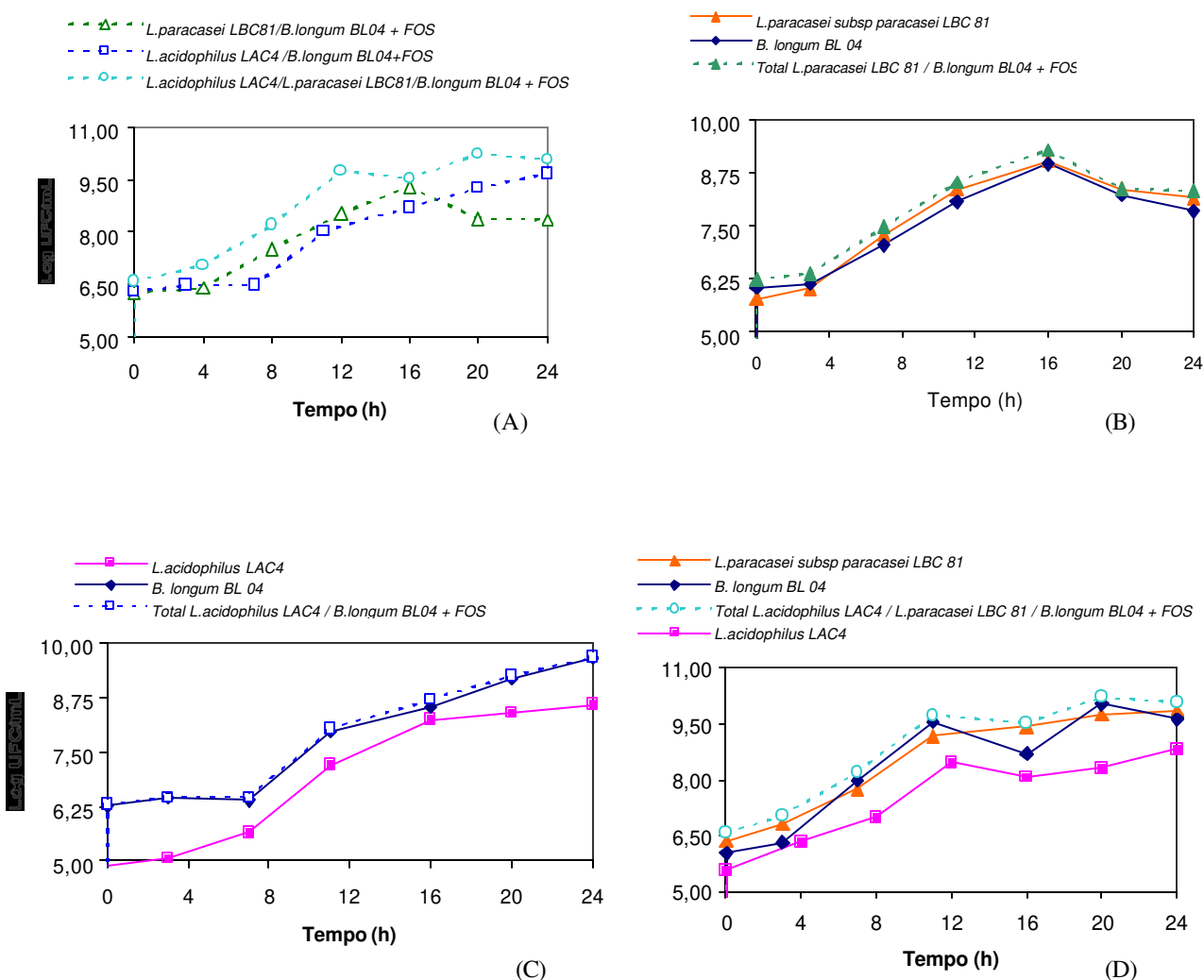


Figura 18. (A) crescimento dos microrganismos nos extratos hidrossolúveis de soja contendo FOS usando mistura de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04; de *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04 e de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04. (B), (C) e (D) crescimento diferenciado dos microrganismos presentes nos extratos hidrossolúveis de soja contendo FOS descritos em (A), respectivamente.

Comparando o crescimento das misturas do probióticos e os simbióticos (produtos com pró e prebióticos), representados nas Figuras 19, 20 e 21, observou-se que apresentaram contagens similares nos diferentes tempos, sendo um pouco maior a contagem nos extratos fermentados de soja que não continham frutooligossacarídeos.

Verificou-se que o aumento das contagens dos probióticos com o tempo ocorreu paralelamente com a queda do pH, com a transformação de açúcares não redutores em redutores pela atividade metabólica microbiana, e com o consumo das fontes de carbono. As máximas contagens de células foram observadas na faixa de pH de 4,3 a 5,5, em todas as fermentações. Quando os meios atingem pH entre 5,8-6,0 e inferiores, ocorre a desnaturação das proteínas solúveis da soja e observa-se uma mudança na consistência e a cor da bebida pela formação de um coágulo estado no qual as proteínas são mais digeríveis.

O alto teor de açúcares presentes no meio enriquecido com FOS causa incremento da pressão osmótica, que somado a grande quantidade de inóculo e substrato, resulta numa rápida queda de pH, que com o tempo causa inibição nos microrganismos. Fica demonstrado que existe simbiose nas bebidas estudadas, ao se obter alto número de probióticos de diferentes espécies em mistura com presença de FOS e outros oligossacarídeos.

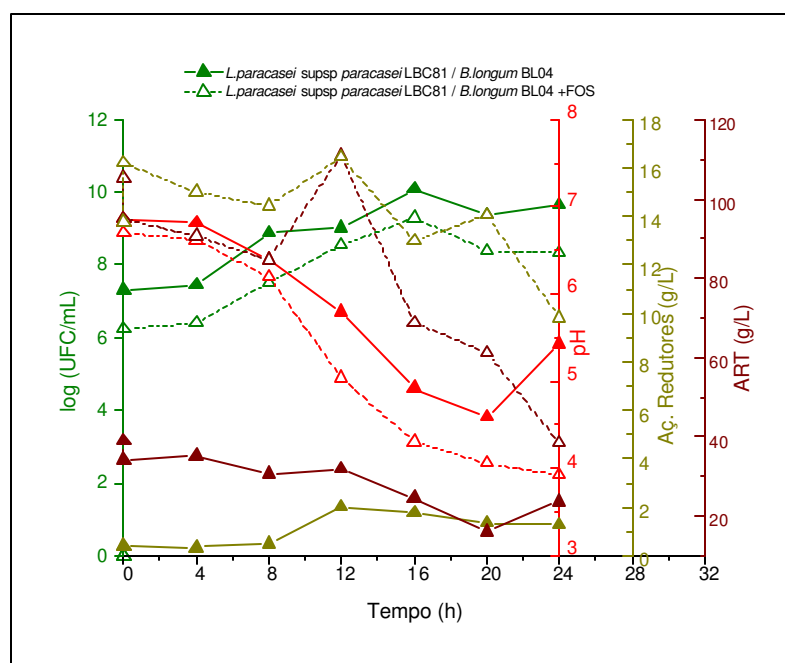


Figura 19. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04.

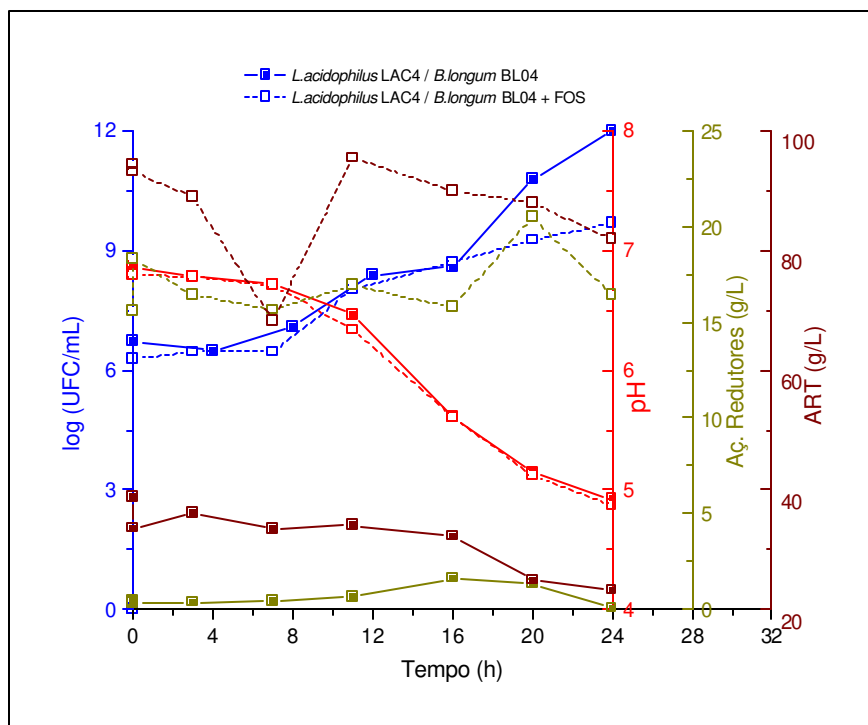


Figura 20. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04.

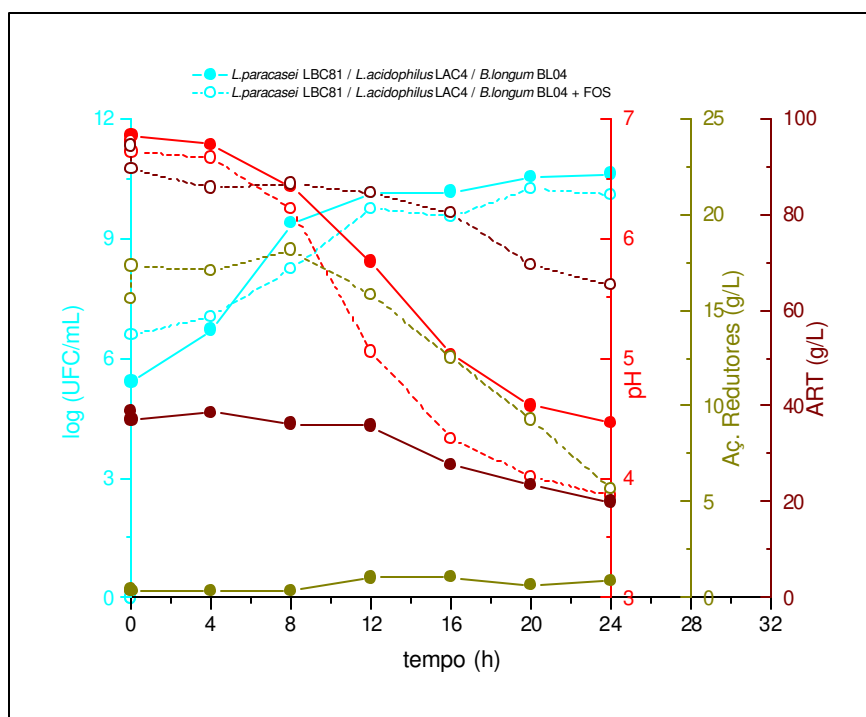


Figura 21. Crescimento do microrganismo, alteração do pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais durante a fermentação de extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % com e sem adição de FOS usando mistura de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC4 e *B. longum* BL04.

5.4.6 Análise qualitativa dos açúcares, oligossacarídeos e frutooligosacarídeos durante o crescimento de probióticos em extrato de soja.

Verificou-se a presença *in natura* dos açúcares sacarose, frutose, galactose e os oligossacarídeos rafinose e estaquiose no extrato hidrossolúvel de soja reconstituído da Olvebra Industrial (Anexo 6). Na Figura 22 e 23, observa-se que os mono e dissacarídeos são os primeiros a serem consumidos pelos probióticos estudados e que a rafinose e estaquiose são aproveitados de diferentes formas pelas bactérias. Nas primeiras 8 horas de fermentação *B. longum* BL04 consome parte dos oligossacarídeos e liberando pequenas frações de sacarose (Figura 22). Scalabrini (1998), verificou que a rafinose é completamente metabolizada com 100% de consumo, enquanto o estaquiose entre 35 e 68 % para diferentes espécies de bifidobactérias.

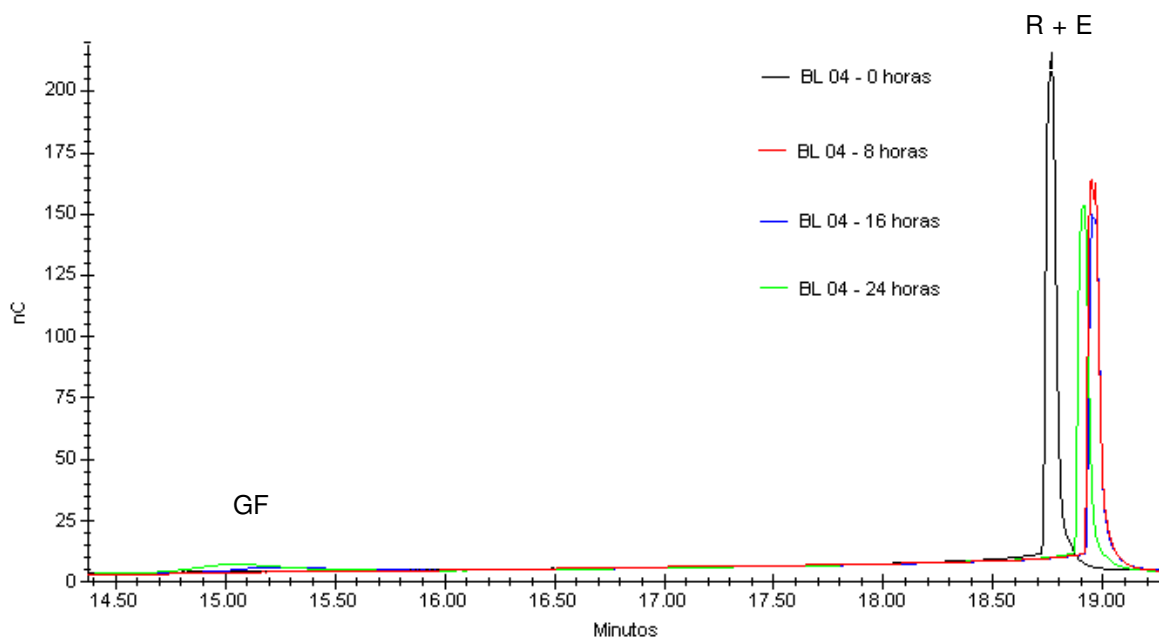


Figura 22. Carboidratos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % durante fermentação com *B. longum* BL04. Os cromatogramas das amostras de 0 a 24 horas de fermentação foram sobrepostos. G-glicose, F-frutose, GF-sacarose, R-rafinose, E-estaquiose.

A Figura 23 apresenta cromatogramas do consumo de carboidratos durante 24 horas de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja em presença ou não de FOS, pela mistura de *B. longum* BL04, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *L. acidophilus* LAC4.

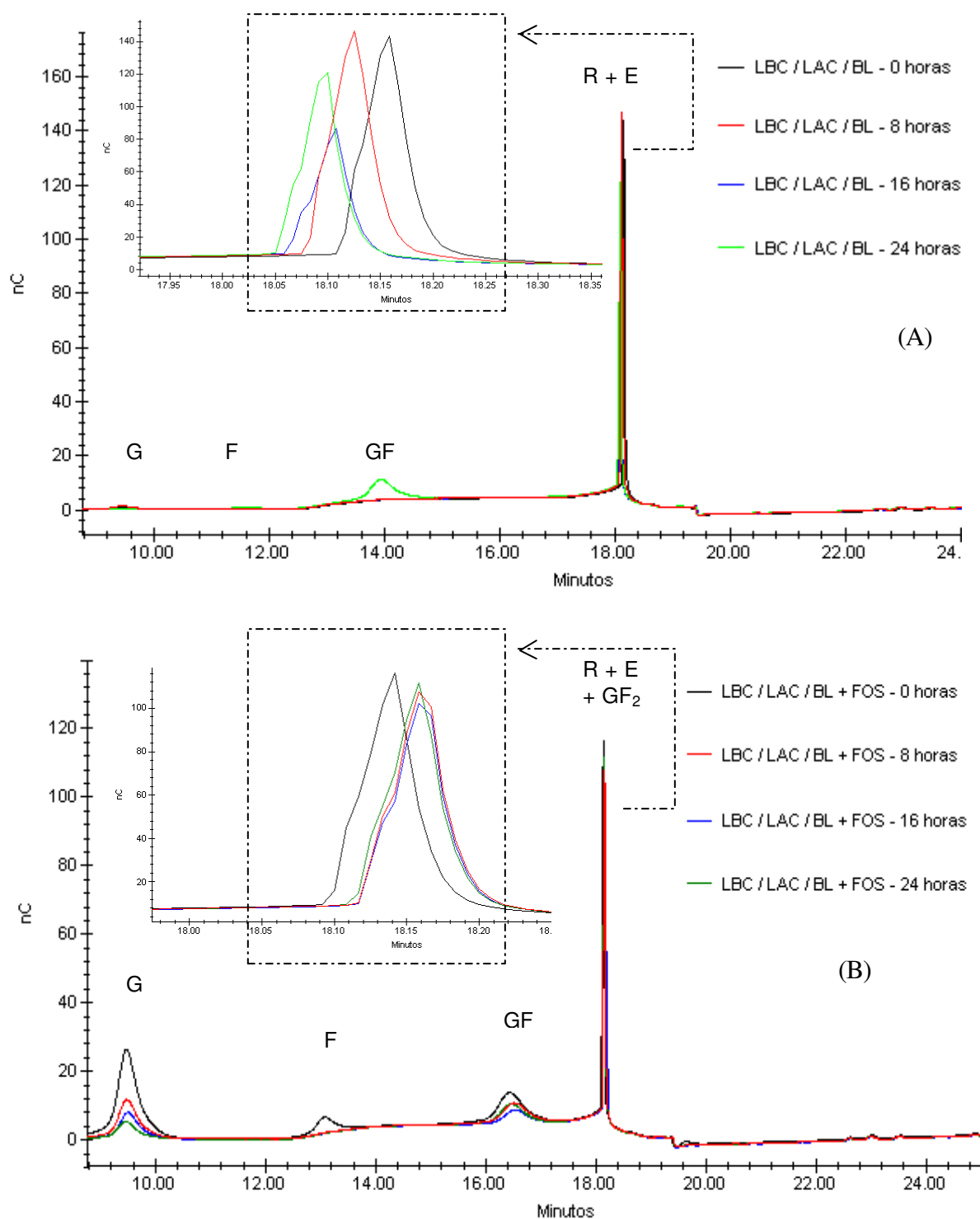


Figura 23. Carboidratos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % (A) sem, (B) com adição de FOS, durante fermentação com mistura de *B. longum* BL04, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81e *L. acidophilus* LAC4. Os cromatogramas das amostras de 0 a 24 horas de fermentação foram sobrepostos.
G-glicose, F-frutose, GF-sacarose, R- rafinose, E-estaquiose e GF₂-kestose.

Verificou-se na Figura 23 (A) que no extrato hidrossolúvel de soja 7,5 % sem adição de FOS o teor de mono e dissacarídeos é baixo enquanto o conteúdo de rafinose e estaquiase é alto. Esses dois últimos são a fonte de carbono para os pró-bióticos durante o processo de fermentação. Entre 0 e 16 horas de fermentação, observou-se o consumo desses oligossacarídeos, mas às 24 horas de fermentação apresentou-se um incremento da sacarose. Presume que a rafinose e estaquiase foram hidrolisadas parcialmente em sacarose e galactose, sendo a galactose liberada e consumida.

Na Figura 23 (B) observa-se que a glicose e frutose aportadas pelo xarope contendo FOS são consumidas ao longo da fermentação, sendo os oligossacarídeos hidrolisados parcialmente liberando sacarose e monossacarídeos. A frutose e galactose liberadas foram consumidas rapidamente. Em relação à sacarose, esta diminuiu entre 0 e 16 horas mas apresentou um acúmulo após 24 horas, provavelmente como subproduto da hidrólise dos oligossacarídeos presentes no meio de fermentação.

Verifica-se que a bebida de extrato hidrossolúvel de soja contendo probióticos e prebióticos é um alimento simbiótico, já que as espécies inoculadas consumiram os açúcares mais simples (presentes e adicionados ao extrato de soja) para seu desenvolvimento, ficando um residual de oligo e frutooligossacarídeos que terá seu efeito terapêutico no intestino, junto com um alto número de espécies probióticas, em sítios diferentes de ação dentro do intestino humano.

Verifica-se a existência de simbiose nas bebidas estudadas, ao se obter números altos de espécies probióticas em mistura e em presença de FOS (prebióticos); mas deve existir um balanço ideal dos carboidratos presentes no meio, para que não exista inibição demasiada, prejudicando o crescimento dos probióticos durante a fermentação e a vida de prateleira, pois um excesso de açúcares eleva a pressão osmótica e acelera o metabolismo microbiano com a conseqüente queda rápida do pH pela conversão de açúcares a ácidos orgânicos (Figura 7).

5.4.7 Análise qualitativa dos ácidos láctico e acético durante o crescimento de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja.

Teóricamente as bifidobactérias produzem grande quantidade de ácido acético a partir de glicose, na proporção 1,5:1,0 (moles de acetato:moles de lactato) (Garcia *et al.*, 1996, Scalabrini *et al.*, 1998)), mas nas condições estudadas o *B. longum* apresentou uma baixa produção de acetato, sendo maior a de lactato após 24 horas de fermentação em extrato hidrossolúvel de soja, detectados por análise cromatográfica, como observado na Figura 24. As bebidas que contem maior concentração de lactato do que ácido acético apresentaram um flavor agradável sendo que o ácido acético pode ser facilmente mascarado através da adição de flavorizantes e aromatizantes apropriados para alimentos deste tipo.

Scalabrini *et al.* (1998), encontrou que várias espécies de *B. longum* produziram maior quantidade de ácido láctico do que do ácido acético nas fermentações em extrato de soja. Espécies de *B. longum* apresentaram uma taxa de LA de 1,74 (LA = relação entre ácido láctico/ácido acético) após 24 horas e de 3,28 após 48 horas.

Neste estudo verifica-se qualitativamente que a produção de ácido láctico é maior que a de ácido acético para *B. longum* BL04 e suas misturas com lactobacilos ao longo de 24 horas de fermentação em extrato de soja, dando uma taxa de LA > 1, verificando-se que a taxa varia segundo o tipo de mistura, com a presença ou não de FOS e o tempo de fermentação. Nas fermentações com a mistura *L. acidophilus* LAC4/ *L. paracasei* LBC81/ *B. longum* BL04 em presença de FOS a produção de 0,33 g/L de ácido láctico após 16 horas de fermentação atingiu 7,09 g/L após 24 horas com leve produção de ácido acético, mantendo-se uma taxa LA maior que 1 (Ver Anexo 6).

How *et al.* (2000) reporta dados contrários, nos quais a taxa de AL diminui de 1,92 até 1,45 após 48 horas de fermentação, favorecida a produção de ácido acético por *B. longum* em extrato de soja.

Observou-se que a diminuição no teor de açúcares se relacionou diretamente com a produção dos ácidos orgânicos láctico e acético.

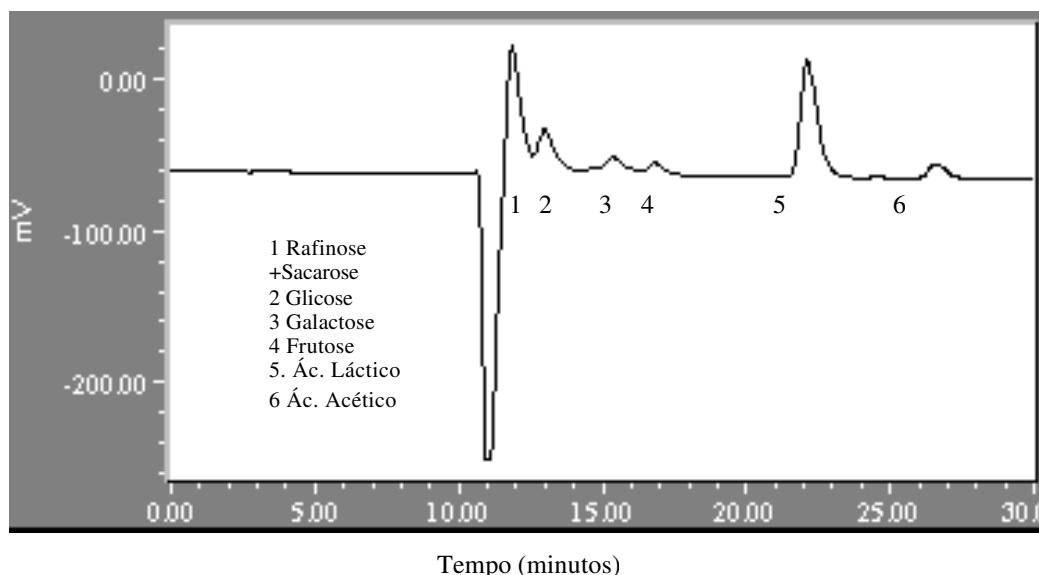


Figura 24. Cromatograma dos carboidratos e ácidos orgânicos do extrato hidrossolúvel de soja 7,5% fermentado com *B. longum* BL04 após 24 horas de fermentação.

5.5 Planejamento experimental para obtenção de bebida fermentada de soja que contenha agentes probióticos e prebióticos.

Realizou-se um planejamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios e 3 pontos centrais (15 ensaios), para avaliar as cinco variáveis independentes no estudo da produção de bebida fermentada de soja:

$X_1 = T$ (37-43°C): temperatura de fermentação em °C.

$X_2 = L_1 + L_2 / B$ (40:60 – 60:40): proporção da mistura de probióticos.

$X_3 = \text{INO}$ (5×10^5 - 5×10^7): quantidade de inóculo em UFC/mL

$X_4 = \text{XAR} + \text{FOS}$ (0-20): Xarope de açúcares contendo frutooligossacarídeos (FOS) em g/L.

$X_5 = \text{ES}$ (4,5 – 7,5): extrato hidrossolúvel de soja em porcentagem (%).

Como variáveis dependentes têm-se:

CP: contagem total e específica dos probióticos, para L_1 , L_2 e B em UFC/mL

Tempo: tempo de fermentação em horas (h)

Na Tabela 17 mostram-se as variáveis independentes que foram estudadas neste planejamento e suas respectivas faixas. Na Tabela 18 aparece a distribuição dos níveis para

cada ensaio, e a Tabela 19 mostra as respostas para tempo de fermentação (tempo para que o pH diminua até 4,5-5,0) e para as contagens de probióticos: total, *B. longum*, *L. acidophilus* e *L. paracasei*.

Tabela 17. Valores dos níveis codificados utilizados no Plackett& Burman.

Variáveis	-1	0	+1
T (°C)	37	40	43
L ₁ +L ₂ /B (proporção)	20+20/60	25+25/50	30+30/40
Inóculo (log UFC/mL)	5,7	6,7	7,7
XAR+FOS (g/L)	0	10	20
ES (%)	4,5	6,0	7,5

Tabela 18. Planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios (Rodriguez, 2000)

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Valores codificados				
	T (°C)	L ₁ +L ₂ /B (proporção)	INO (UFC/mL)	XAR+FOS (g/L)	ES (%)	T (°C)	L ₁ +L ₂ /B (proporção)	INO (UFC/mL)	XAR+FOS (g/L)	ES (%)
1	1	-1	1	-1	-1	43	40/60	5x10 ⁷	0	4,5
2	1	1	-1	1	-1	43	60/40	5x10 ⁵	20	4,5
3	-1	1	1	-1	1	37	60/40	5x10 ⁷	0	7,5
4	1	-1	1	1	-1	43	40/60	5x10 ⁷	20	4,5
5	1	1	-1	1	1	43	60/40	5x10 ⁵	20	7,5
6	1	1	1	-1	1	43	60/40	5x10 ⁷	0	7,5
7	-1	1	1	1	-1	37	60/40	5x10 ⁷	20	4,5
8	-1	-1	1	1	1	37	40/60	5x10 ⁷	20	7,5
9	-1	-1	-1	1	1	37	40/60	5x10 ⁵	20	7,5
10	1	-1	-1	-1	1	43	40/60	5x10 ⁵	0	7,5
11	-1	1	-1	-1	-1	37	60/40	5x10 ⁵	0	4,5
12	-1	-1	-1	-1	-1	37	40/60	5x10 ⁵	0	4,5
13(pc)*	0	0	0	0	0	40	50/50	5x10 ⁶	10	6,0
14(pc)	0	0	0	0	0	40	50/50	5x10 ⁶	10	6,0
15(pc)	0	0	0	0	0	40	50/50	5x10 ⁶	10	6,0

* pc = ponto central

Tabela 19. Resultados dos ensaios do planejamento Plackett & Burman.

Ensaio	pH final	RESPOSTAS*					
		Tempo de fermentação(h)	Contagem total UFC/mL	Contagem BL (B) UFC/mL	Contagem LAC (L ₁) UFC/mL	Contagem LBC(L ₂) UFC/mL	Contagem LAC+LBC UFC/mL
1	4,55	9,67	7,87	7,82	6,73	6,39	6,90
2	4,82	14,17	8,45	8,43	7,08	6,26	7,14
3	4,86	14,30	8,78	8,38	7,29	8,54	8,56
4	4,72	9,58	8,07	8,00	6,68	7,15	7,28
5	4,68	13,95	7,87	7,86	6,23	5,95	6,41
6	4,73	10,33	8,54	8,45	6,54	7,37	7,43
7	4,55	10,87	8,12	8,08	6,35	7,06	7,14
8	4,81	12,25	9,04	8,77	7,37	8,80	8,70
9	5,03	17,75	9,09	8,24	8,59	8,80	9,03
10	4,92	14,12	9,04	9,03	6,69	6,95	7,14
11	5,64	18,00	8,56	8,29	7,54	8,11	8,22
12	5,69	17,75	8,82	8,24	8,55	8,12	8,69
13 (pc) ⁺	4,60	13,42	8,67	8,65	6,76	7,38	7,40
14 (pc)	4,65	11,50	8,99	8,97	7,05	7,61	7,65
15 (pc)	4,46	11,98	8,59	8,55	6,82	7,41	7,43

*As contagens dos ensaios foram realizadas em triplicata em meio de cultura MRS + 0,1% azul de anilina.

⁺ pc = ponto central

Para a resposta contagem total de pró-bióticos, foram analisados os efeitos das cinco variáveis a 90 % de confiança ($p < 0,1$). A estimativa dos efeitos aparece na Tabela 20, e a Figura 25 mostra que são significativas as variáveis: temperatura e extrato de soja. A temperatura apresenta efeito negativo nas condições do estudo, indicando maior crescimento a temperatura de 37 do que a 43 °C. Um efeito positivo na contagem total de probióticos é dado pela variável extrato de soja, na presença de 7,5 % do extrato hidrossolúvel de soja houve maior crescimento do que com 4,5 %. As outras variáveis analisadas não foram estatisticamente significativas (a 90 % de confiança) dentro das faixas estudadas.

Para a resposta contagem de *B. longum* BL04, nas condições estudadas, nenhuma variável foi significativa a 90 % de confiança. A variável extrato de soja apresentou efeito positivo significativo somente a 85 % de confiança (Figura 26).

Tabela 20. Estimativa dos efeitos para a contagem total de probióticos.

Variável	Efeito (log UFG/g)	Desvio padrão	t	p
Média *	8,5666	0,0546	156,894	4,062E-05
Temperatura*	-0,4275	0,1221	-3,502	0,072763
L ₁ +L ₂ /B	-0,2671	0,1221	-2,188	0,160208
Inóculo	-0,2341	0,1221	-1,922	0,194537
Xarope + FOS	-0,1582	0,1221	-1,296	0,324451
Extrato de soja*	0,4127	0,1221	3,380	0,077490

*Efeitos significativos a $p < 0,100$. t = t student, p = probabilidade.

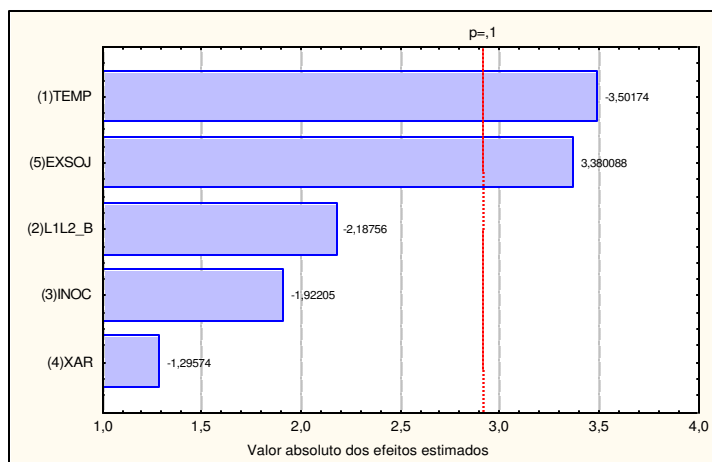


Figura 25. Diagrama de pareto para a resposta contagem total de probióticos a 90 % de confiança pela análise do erro puro.

A Tabela 21 ilustra a estimativa dos efeitos para a resposta contagem de *B. longum* BL04. Conclui-se que a maior porcentagem de extrato de soja favorece o crescimento de *B. longum*. Em relação às outras variáveis, pode-se trabalhar em qualquer dos níveis estudados, pois não exerceram efeito significativo. Assim, para o crescimento do *B. longum* a adição de xarope contendo FOS pode não ter sido estatisticamente significativa, mas pode ser que para uma resposta sensorial e funcional, a adição de FOS seja importante na bebida fermentada de soja. A aplicação do inóculo no nível -1 (5,7 log UFC/mL), diminuiria gastos de produção.

Tabela 21. Estimativa dos efeitos para a contagem de *B. longum* BL04.

Variável	Efeito (log UFG/g)	Desvio padrão	t	p
Média *	8,3828	0,0558	150,1181	4,437E-05
Temperatura	-0,0676	0,1249	-0,54137	0,642492
L ₁ +L ₂ /B	-0,10195	0,1249	-0,81644	0,500024
Inóculo	-0,09816	0,1249	-0,78616	0,514126
Xarope + FOS	-0,13876	0,1249	-1,11126	0,382146
Extrato de soja*	0,313603	0,1249	2,511524	0,128644

*Efeitos significativos a $p < 0,150$.

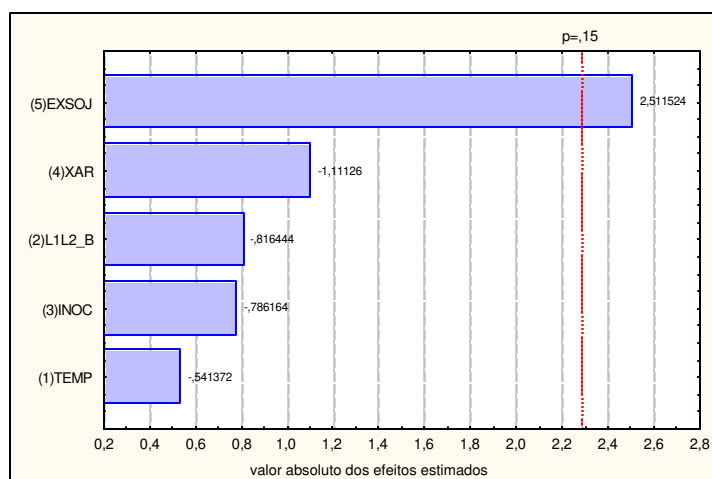


Figura 26. Diagrama de pareto para a resposta contagem de *B. longum* BL04 a 85 % de confiança pelo análise do erro puro.

Para a resposta contagem de *L. acidophilus* encontra-se que três variáveis apresentaram efeitos significativos e negativo a 90% de confiança nas condições estudadas (Tabela 22). São as variáveis: temperatura, proporção da mistura (L₁+L₂/B) e quantidade de inóculo, todas com efeito negativo, nas condições estudadas. Ou seja, o aumento dos valores estudados para cada variável promovem uma queda na contagem deste microrganismo.

Tabela 22. Estimativa dos efeitos para a contagem de *L. acidophilus* LAC4.

Variável	Efeito (log UFG/g)	Desvio padrão	t	p
Média *	7,085237	0,0405	174,7983	3,273E-05
Temperatura*	-0,95712	0,0906	-10,56	0,0088486
L ₁ +L ₂ /B*	-0,59502	0,0906	-6,56497	0,0224249
Inóculo*	-0,6192	0,0906	-6,83168	0,0207613
Xarope + FOS	-0,17845	0,0906	-1,96882	0,1878136
Extrato de soja	-0,03544	0,0906	-0,39101	0,7335111

*Efeitos significativos a $p < 0,100$.

As variáveis temperatura, proporção da mistura (L₁+L₂/B), quantidade de xarope contendo FOS e porcentagem de extrato de soja, apresentaram efeito significativo para a resposta contagem de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 a 90 % de confiança. Estas variáveis exercem efeito negativo sobre o crescimento de LBC nas condições estudadas, a exceção da porcentagem de extrato de soja, sendo melhor trabalhar com valores perto do nível -1 e com valores próximos ou iguais ao nível +1 de porcentagem de extrato de soja em favor do desenvolvimento de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81. A estimativa dos efeitos encontra-se na Tabela 23.

Tabela 23. Estimativa dos efeitos para a contagem de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LAC4.

Variável	Efeito (log UFG/g)	Desvio padrão	t	p
Média *	7,4597	0,0314	237,6183	1,771E-05
Temperatura*	-1,5583	0,0702	-22,1999	0,0020231
L ₁ +L ₂ /B*	-0,4855	0,0702	-6,9158	0,0202742
Inóculo	0,1874	0,0702	2,6704	0,1162752
Xarope + FOS*	-0,2444	0,0702	-3,4817	0,0735114
Extrato de soja*	0,5505	0,0702	7,84238	0,0158733

*Efeitos significativos a $p < 0,100$.

A Tabela 24 ilustra a estimativa dos efeitos para a resposta tempo de fermentação, que foi definido como o tempo em que o pH da bebida atingisse 4,5 a 5,0. Duas variáveis

apresentam efeitos significativos pela análise do erro puro a 95% de confiança, são as variáveis temperatura e quantidade de inóculo, as duas com efeito negativo sobre o tempo de fermentação. Dentro das condições de estudo, quanto maior temperatura e quantidade de inóculo, menor será o tempo de fermentação, o que resultaria numa maior produtividade do processo.

Tabela 24. Estimativa dos efeitos para a resposta tempo de fermentação.

Variável	Efeito (log UFG/g)	Desvio padrão	t	p
Média *	13,30933	0,257992	51,58811	0,0003755
Temperatura*	-3,18333	0,576888	-5,51811	0,0313071
L ₁ +L ₂ /B	0,083333	0,576888	0,144453	0,8983849
Inoculo*	-4,79	0,576888	-8,30317	0,0141967
Xarope + FOS	-0,93333	0,576888	-1,61788	0,2470942
Extrato de soja	0,443333	0,576888	0,768491	0,5225363

*Efeitos significativos a $p < 0,100$.

No estudo das variáveis significativas, a melhor resposta em geral obteve-se com o ensaio 9, o qual apresenta contagem total de 10^9 UFC/mL, e contagens individuais de 10^8 UFC/mL tanto para bifidobacterias quanto para lactobacilos. O número mais elevado de colônias de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja obteve-se nas condições de 37 °C, proporção de 40/60 de *L. acidophilus* + *L. paracasei* / *B. longum*, inóculo de 5×10^5 UFC/mL, 20 g/L de Xarope com 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato de soja desengordurado, para um total de 17,75 horas de fermentação, atingindo um pH de 5,03 e uma população final de $1,24 \times 10^9$ UFC/mL. No caso de favorecimento do crescimento das bifidobactérias, o melhor ensaio seria o número 10, no qual se consegue contagem de 10^9 para *B. longum* com um tempo de fermentação menor, 14 horas, a uma temperatura de 43 °C, sem adição de FOS, mantendo as outras condições; o pH final foi de 4,80, sendo significativa só a variável porcentagem de extrato desengordurado de soja. O ensaio 8 representa uma boa opção na produção da bebida, pois alcança alta contagem total em um tempo de 12 horas aproximadamente, cujas condições são: 37 °C, proporção de 40/60 de *L. acidophilus* + *L. paracasei* / *B. longum*, inóculo de 5×10^7 UFC/mL, 20 g/L de Xarope com 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato de soja desengordurado, atingindo um pH final de 4,81.

6. CONCLUSÕES

Para efeitos deste estudo, determinou-se que a metodologia mais apropriada para a contagem diferenciada das espécies de probióticos dos gêneros *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* envolvidos nos processos de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja, foi através de plaqueamento com Agar MRS + 0,01% de azul de anilina, em anaerobiose e aerobiose, complementada com diferenciação morfológica das colônias.

Mostrou-se que o extrato hidrossolúvel de soja é um excelente meio para o cultivo dos probióticos *B. longum* BL04 e *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 puros, e a mistura de *L. acidophilus* LAC4 com *B. longum* em presença ou não de *L. paracasei* e frutooligossacarídeos, através da fermentação láctica e de bifidobactéria, obtendo-se níveis de 10^{10} - 10^{13} UFC/mL de contagem individual, quantidades estas muito superiores aos níveis mínimos exigidos para este tipo de alimento (10^7 UFC/mL).

As bifidobactérias aproveitam os açúcares presentes na soja como fonte de carbono, liberando mono e dissacarídeos verificando-se que a taxa de produção de ácido láctico é maior que de ácido acético ($LA > 1$). As misturas de probióticos consomem rapidamente os mono, dissacarídeos e oligossacarídeos provenientes tanto da soja como do xarope adicionado, produzindo principalmente ácido láctico com leve produção do acético. Sensorialmente isto é benéfico, tanto pela diminuição do *flavor* original da soja causado pela presença de rafinose e estaquiose, quanto pela melhora na digestibilidade.

O número mais elevado de colônias de probióticos em extrato hidrossolúvel de soja obteve-se nas condições de 37 °C, proporção de 40/60 de *L. acidophilus* + *L. paracasei* / *B. longum*, inóculo de 5×10^5 UFC/mL, 20 g/L de Xarope com 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato de soja desengordurado, para um total de 17,75 horas de fermentação, atingindo um pH de 5,03 e uma população final de $1,24 \times 10^9$ UFC/mL, sendo significativas para o crescimento de probióticos em geral as variáveis temperatura e extrato de soja.

O produto obtido é um alimento funcional simbiótico, já que transporta tanto probióticos como prebióticos em quantidades ótimas, o que significa que seria um bom adjunto dietético, pois ofereceria simultaneamente grupos de probióticos diferentes com sítios específicos de ação no trato digestivo humano.

Atualmente existe a necessidade de oferecer ao mercado novos produtos funcionais e nutracêuticos, que suplementem alguns requerimentos nutricionais e que aportem os benefícios que apresentam os probióticos e prebióticos na manutenção do balanço da microflora intestinal, a redução de problemas intestinais como a má absorção da lactose, a proteção contra infecções a prevenção de muitas doenças de origem digestivas e acredita-se que o produto apresentado neste trabalho pode contribuir significativamente neste sentido, tendo em conta as propriedades acima realçadas.

Cabe ressaltar que neste trabalho, por tratar-se de uma linha de pesquisa muito nova, o grande desafio foi estabelecer a metodologia de estudo. Espera-se em trabalhos futuros, dar continuidade ao estudo e que seja possível definir quantitativamente as respostas a nível físico-químico, cinético e sensorial.

FUTUROS DESENVOLVIMENTOS E PESQUISAS

A pesquisa na área dos probióticos e prebióticos é muito atual como pode ser observado nas referências bibliográficas. Portanto, há ainda muitas possibilidades de estudos, dirigidos ao seu melhor conhecimento para o incremento da sobrevivência dos microrganismos pró-bióticos em diferentes meios ou condições de processo, facilitar sua disponibilidade em diferentes mercados, e consumidores, facilitar a manipulação durante a manufatura de produtos e obter efeitos positivos cada vez maiores em nutrição e saúde.

Para dar continuidade a este estudo sugere-se:

- Estudar o aumento da escala para reatores de bancada.
- Realizar testes de análise sensorial com o produto e com diferentes aditivos como flavorizantes, edulcorantes, estabilizantes, polpas de fruta, etc.
- Realizar bioensaios com animais e voluntários humanos.
- Estudar o efeito dos prebióticos sobre os diferentes probióticos e efeitos sobre a saúde.
- Desenvolver a técnica de quantificação dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes na soja e frutooligossacarídeos. A os produtos do metabolismo microbiano, e outras substâncias adicionadas aos meios durante a obtenção de alimentos simbióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADÁ. **Functional foods and nutraceuticals**. Disponível em <http://www.agr.gc.ca/food/nff/enutraceut.html>. Acessado em março 10 de 2003.
- ALVES, F.V. **Síntese de Oligossacarídeos por inulinase em meio orgânico**. Campinas, 2002. Tese de Doutorado (em andamento) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ASO Y., AKAZAN H.. Preventive effect of *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. **Eur. Urol.** v. 27, p. 104-109, 1995. Apud **Journal of Biotechnology**. v. 84, p. 197-215, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Washington, 1995. v. 1-2.
- BARROS N., B; SPACINO S., I; BRUNS, R.E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp. 2001. 401 p.
- BINKLEY, K.E. Allergy to lactase supplements. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 97, p. 1414, 1996
- BOEKEL, M.A.J.S. Effect of heating on Millard reactions in milk. **Food Chemistry**. v. 62, p. 403-414, 1998
- BRACQUART, P. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. **Journal of applied Bacteriology**. v. 51(2), p. 303-305, 1981. Apud: **International dairy journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- CARVALHO, G. Nutrição, probióticos e Disbiose. **Nutrição, Saúde & Performance**, ano 3, n.14, p. 36-37, 2001
- CAVALIERE V.; RENATA; G.; GIOVANNI; M.; GIANLUIGI, V.; MARCO E. L. **Composition for feed use comprising lyophilized live lactic bacteria**. SITIA-YOMO S.p.A. USPatens 5,895,648, 3 sept. 1997, 20 abr. 1999.
- CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e prática em análise de Alimentos**. Campinas: Editora UNICAMP, 1999. 39-123 p.
- 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
- CRAVERO, RICARDO ALBERTO. **Process for manufacturing a biologically active fermented milk product and product obtained by the process**. SANCOR COOPERATIVAS UNIDAS LIMITADA. USPatens 6,033,691, 17 sept. 1998, 7 mar. 2000.
- DANISCO. **HOWARU™ premium probiotics**. Disponível em www.howaru.com/pro_product_12b.html. Acessado em março de 2003.
- DAVE, R.I., & SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2804-2816, 1998.

- DAVE, R.I., & SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. v. 7, p. 31-41, 1996.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SARPE, M.E. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, p. 130-135, 1960.
- DENNIS KUNKEL MICROSCOPY. *Lactobacillus* under the microscope. Disponível em www.bacteriamuseum.org/species/lactobacillus.shtml e www.denniskunkel.com. Acessado em junho de 2003.
- DOLEYRES, Y.; PAQUIN, M.; LeROY, M. & LACROIX, C. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 60, p.168-173, 2002
- DONNET-HUGHES, A.. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. **Journal Dairy Science**. v. 82, p. 863-869, 1999. Apud **Journal of Biotechnology**. v. 84, p. 197-215, 2000.
- EMBRAPA SOJA. Soja na mesa: Extrato de soja “leite de soja”. Disponível em: www.cnpso.embrapa.br. Acessado em: março de 2003.
- FÁVARO-TRINDADE, C.S. **Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e avaliação da sua tolerância às secreções gastrointestinais**. Campinas, 2001. 104 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FERREIRA, Célia L.L., TESHIMA, Elisa. 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.
- FRIENDMAN, M. Food browning and its prevention: an overview. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.44, p. 631-653, 1996
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. **Journal of applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989. Apud: **International dairy journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- GARCIA G, M.; QUINTERO R., M.; LÓPEZ-MUNGUÍA C., A. **Biotechnologia Alimentaria**. México D.F: Editorial Limusa, 1993. 636 p.
- GARREAU JEAN. JAMES. **Ice Cream product based on fermented soymilk or other vegetable**. LE SOJAMI SOC (FR). FR 2789854, 25 ago 2000. esp@cenet database
- GERMAN, B., SCHIFFRIN, E., RENIERO, R., MOLLET, B., PFEIFER, A., NEESER, J. R. The development of functional foods: lessons from the gut. **Trends in Biotechnology**. v.17, p. 492-499, december 1999
- GIBSON, G. R. and ROBERFROID, M.B. Dietary and modulation of human Colonic Microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. **J. Nutr.** v. 125, p.1401-1412, 1995. Apud **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998
- GIMENEZ P., M. A. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogurtes**. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 86 p.

- GONÇALVES, C.E.A.G. **Curso técnico em alimentos**. Campinas, 1998. Relatório de Estágio (Estágio no Centro de Tecnologia de Laticínios-TECNOLAT). Instituto de Tecnologia de Alimentos ITAL- 26 p.
- GUILLILAN, S.E. & SPEAK, M.L. Antagonistic action of *L. acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. **Journal of food protection**. v. 40(11) p.820-823, 1977.
- HANSEN, R. Bifidobacteria have come to stay. **North European Dairy Journal**. v. 3. p. 1-6. 1985.
- HANSEN, W. **Method for the manufacture of cheese, quark and yogurt products from soybeans**. APPLICANT No. 195006. USPatens 6,254,900, 18 nov. 1998, 3 jul 2001.
- HERNALSTEENS, S. **Efeito da composição protéica do leite no desenvolvimento de culturas probióticas**. Campinas, 1999. Relatório final (Iniciação Científica em Engenharia de Alimentos). Instituto de Tecnologia de Alimentos –ITAL-. 27 p.
- HOST, A.; HALKEN, S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. **Allergy**. v. 45, p. 587-596, 1990.
- HOU, J-W., YU, R-C., CHOU, C-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**. v.33. p. 393-397. 2000.
- JAKOBSSON, L.; LINDBERG, T. A prospective study of cow's milk intolerance in Swedish infants. **Acta Pediatric Scand**. v. 68, p. 853-859, 1979.
- JUAREZ TOMAS, M.S., BRU DE LABANDA, E., PESCE DE RUIZ, A. E NADER-MACÍAS, M.E. Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompert
- KLAVER, F., KINGMA, F, BOLLE, A.. (1990). Growth relationships bifidobacteria and *Lactobacilli* in milk. **Voedingsmiddelentechnologie**, 23, 13-16, 1990. Apud: **International Dairy Journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- KNORR, Dietrich. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998
- KURMAN, Joseph A., RASIC, Jeremija. **Encyclopedia of fermented fresh milk products**. New York: Van Nostrand Reinhold., 1992. p.306-307
- LILLEY, D.M. & STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**. v. 147, p. 747-748, 1965 Apud **International Dairy journal**. v.9, p.53-61, 1999.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- LUCHANESKY, J. B.. **Probiotic Bifidobacterium strain**. WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION. USPatens 5,922,375, 25 nov. 1998, 13 jul. 1999.
- MAHECHA, Gabriela. **Avaliação sensorial em el control de calidad de alimentos procesados**. Bogotá: Editoria Carrea 7ª Ltda. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 1985, 135 p.
- MARTIN, J. H. Technical consideration for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. **International Dairy Federation Bulletin**. n. 313, p.49-51, 1996.
- MAUGERI F.; PINHEIRO S. A. **Produção de xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido ou não com frutooligosacarídeos, a partir de sacarose**.

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. BR. Pedido de patente PI0202602-3, 28 fev 2002.
- Mc. CARTNEY, WENZHI and TANNOK. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of human. **Applied and environmental Microbiology**, 62, 4608-4613, 1996. Apud **International dairy journal**. v. 9, p. 53-61, 1999.
- MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas**, Instrução Normativa No. 36, 31 de outubro de 2000.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31 (3), p. 426-428. 1959.
- MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: Ed. Campinas, Unicamp, 1993, p.93
- OUWEHAND, Arthur, SALMINEN J. The health effects of cultured milk products with viable and non viable bacteria. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 749-758, 1998
- PACHER, B., & KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products. **International Dairy Journal**. v. 6, n.1, p. 43-64, 1996. Apud **International dairy journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- PARKER, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal nutrition and health**. v. 29, p. 4-8, 1974. Apud **International Dairy Journal**. v. 9, p. 32-61, 1999.
- PELTO, L.; TANTAKOKKO, H.; LILIUS, E; NUUTILA, J; SALMINEN, S.. No difference in symptoms and receptor expression in lactose-intolerant and in milk-hypersensitive subjects following intake of homogenized and unhomogenized milk. **International Dairy Journal**. v.10, p. 799-803, 2000.
- PINHEIRO, Andreina S. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Campinas, 2002. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
- PIERRE FABRE; RENE BELLE; BERNARD FABRE. (2002). **Préparations pharmaceutiques contenant des extraits d'isoflavone de soja et des micro-organismes probiotiques**. LABORATOIRES DOLISOS FR. n. EP1186295A1. 31 ago 2001, 13 mar 2002. Office européen des brevets. esp@cenet database
- PONCONNET ERIC. **Nutricional food supplement for force-fed palmipeds**. FR 2668683. 7 mayo 1992. esp@cenet database .
- PYKE, Magnus. **Success in nutrition**. London: John Murray publishes, 1975 p.15-169
- RASIC, J.L. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **International Dairy Federation Bulletin**, v. 252, p. 22-48, 1990. Apud **International dairy journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.
- RIBKA, S. & KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v. 50(2), p. 51-57, 1995.
- ROBERFROID, M.. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. **Am.J Clin Nutr** 71(suppl):1682S-7S, 2000.
- 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.

- RODRIGUEZ, Aida de S. **Biotecnologia**. Bogotá. Editorial Unisur. 1994. p.157
- RODRIGUES, M.I.; KALIL,S.J.; MAUGERI, F. **Planejamento fatorial e “Screening Design” como ferramenta para otimização de processos bioquímicos**. In: XI SINAIFERM. 31 de Julho a 2 Agosto de 1996, UFSCar, São Carlos-SP. p. 640-645
- 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.
- SALMINEN, S., OUWEHAND,A., BENNO, Y., LEE, Y. K. Probiotics: how shold they be define?. **Trend in Food Science & Technology**. v.10 (3), p. 107-110, 1999.
- SAXELIN, M. GRENOV, B., SVENSSON, U., FONDÉN, R., RENIERO R., MATTILA-SANDHOLM T. The technology of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**. v. 10, 387-392, 1999.
- SCALABRINI, P., ROSSI, M., SPETTOLI, P., & MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* stains for use in soymilk fermentation. **International Journal or Food Microbiology**. v. 39. p. 213-219.1998
- SMITH, A. **Soybeans, chemistry and technology**. The Avi Publishing Company.Westport, 1972 .
- SPANHAAK, S. The effect of consumption milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **European Journal Of Clinical Nutrition**. v.52, p. 899-907, 1998.
- SPERTY, G.S. **Probiotics**. West point Connecticut: Avi Publishing Col, 1971 apud **International Dairy journal**. v.9, p.53-61, 1999.
- SPIEGEL, J.E., ROSE, R., KARABELL, P., FRANKOS, V. H., SCHMITT, D.F. Safety and Benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**. v.48 p. 85-89, 1994.
- 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.
- TAMIME Y. & ROBINSON,R. **Yogurt science and technology**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Second edition. 2001.p.358-359,366-367.
- TERAGUCHI, S., UCHARA, M. OGASA,K. & MITSOUKA,T. Enumeration of *Bifidobacteria* in dairy products, **Japanese Journal of Bacteriology**. v. 33, p.753-761, 1978.
- VARMAN, A. H. & SUTHERLAND, J. P. Milk and milk products. London: Capman and Hall. 1994. p 347-380.
- 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.
- VINDELORA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, p. 497-505, 1999.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, p. 107-117, 1996.
- 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.

Apêndice 1. Meios seletivos para numeração de probióticos (Laurens-Hautting *et al.* 2001)

GRUPO DE BACTERIA	AGAR-MEIO	OBSERVAÇÕES
BIFIDOBACTERIUM	TPPY	(Bracqual, 1981)
	TPPYPB	(Teraguihi, 1978)
Para redução do potencial Redox:	TOS (oligossacarídeos transgalactosilados como fonte	Numeração seletiva em populações misturadas com lactobacilos e estreptococos
Cisteína, cistina, ácido ascórbico, de carbono única)		(Wijman, 1989)
sulfato de sódio	NNLP agar (ácido neomicina-cloreto de lítio,	TOS modificado para melhora na seletividade
Agentes seletivos:	paramomicina): TOS modificado	(Chr. Hansen)
Antibióticos, ácido propiônico,	Inclue: sulfato de neomicina, ácido nalidixico,	
fontes simples de carbono, cloreto	cloreto de lítio e sulfato de paramomicina	
de lítio	`Bif ' agar	Contem: base para MRS com L-cisteína, HCl e ingredientes seletivos (antibióticos)
	RCPB (Agar para clostridio reforçado com Azul de	
Inibidores de crescimento de bactéria láctica:	Prússia)	
Fortificado com sangue de cavalo	M17	
ou ovelha.	NNLP modificado	
	X-alfa-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa galactosídeo)	
	YN-6	
Incubação:	YN-17	
Anaerobiose 37 °C x 3 dias	L-arabinose	
	TOS-NNLP	
	Columbio modificado	
	LP (cloreto de lítio-propionato de sódio)	
	BL-OG(sangue-glicose-fígado + oxgall + gentamicina)	
	BIM-25 (Bifidobacterium iodoacetato meio 25)	
	PSM (Meio de Petuely seletivo)	
	HBSA seletivo	
	MRS + 0,5 % cloridrato de cisteína ¹	
	MRS-WP (MRS soro filtrado) ²	Para <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707
	MRS + 0,5 ug/ml doclosaxillina, 1mg/ml LiCl, e	Para <i>Bifidobacterium</i> Bb12
	0,5 ug/ml de hidrocloreto de cisteína¹	
LACTOBACILLUS	MRS-maltose (Man, Rogosa e Sharpe)	Empregado pela Chr. Hansen.
	MRS-agar¹ (Man, Rogosa e Sharpe)	Geral para <i>Lactobacillus</i>
Incubação:	MRS-agar ¹ (Man, Rogosa e Sharpe) pH 5.41	<i>L. paracasei</i> F19 seletivo baseado na morfologia das colônias
Microanaerobiose 37 °C x 16-18 horas	EC (esculina celobiose)	37°C x 16-18 horas
	TPPY (triptose-proteose-peptona, extrato de levedura	
	LBSO (agar seletivo para <i>Lactobacillus</i> com	
	oxgall)	Para estimulação de probióticos no meio:¹
	PCA (plate count agar)	2% de glicose m/v
	X-Glu	0,038 % extrato de levedura m/v
	MNA + salicin (minimal nutrient agar)	0,1% de três frações diferentes de proteínas hidrolisadas de leite m/v
MISTURA DE <i>L. Acidophilus</i> e <i>B. Bifidum</i>	HHD (homofermentative, heterofermentative	
	diferencial), HHD modificado	
	TPPY modificado	(FE100, FE120 e FE160) da DMV, Holanda

Referências: Laurens-Hattingh *et al.* (2001), ¹Saxelin (1999), ²Doleyres (2002).

Apêndice 2. Composição do meio de cultura MRS (Man,Ragosa,Sharpe) (De Man *et al.* 1960)

Ingrediente	Quantidade
Peptona bacteriológica	10 g.
Extrato de carne	10 g.
Extrato de levedura	5g.
D-glicose	20 g.
Tween-80	1 g.
Fosfato de potásio	2 g.
Acetato de sódio	5 g.
Citrato de tri-amônio	2 g.
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g.
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05 g.
Agua destilada	1000 mL.
Agar	15 g.

Hernalsteens (1999)

Misturam-se todos os ingredientes, ajusta-se o pH a 6,5 utilizando NaOH 0,1N e HCl 0,1N e esteriliza-se em autoclave a 121°C por 15 minutos.

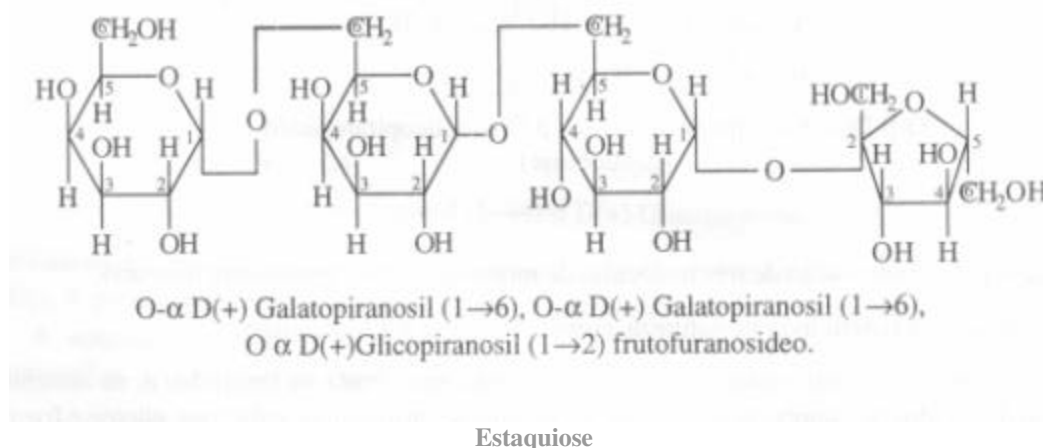
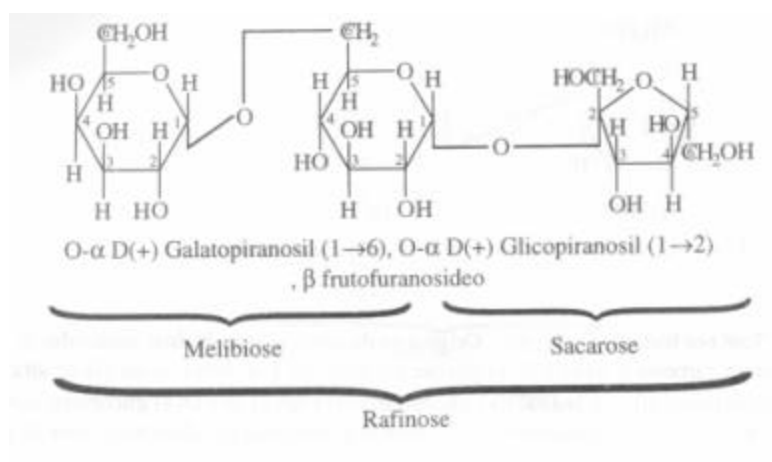
Apêndice 3. Soja

3.1 Exemplos de alimentos fermentados de soja.

Produto	Ingrediente	Microrganismo e produto
Molho de soja	Soja + sal	<i>Pediococcus halophilus</i> : ácido láctico
Miso	Soja+arroz+sal	<i>P. halophilus</i> , <i>P. pentosaceus</i> : ác. láctico
Hama-nato	Soja+cereal+sal	<i>Pediococcus ssp</i> : ácido láctico
Koji ¹	Arroz, soja,açúcares	<i>Leveduras</i> , <i>A. oryzae</i> .
Shoyu ¹	Farinha + soja + sal	<i>A. oryzae</i> , <i>L.delbrueckii</i> .
Yogurth	Leite de soja + flavor + leite+ açúcares.	<i>L.delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> , <i>L. Acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> .
Zabadi	Leite de búfala + leite de soja	<i>L.delbrueckii</i> , <i>S. thermophilus</i>

Tamime *et al.* 2001, ¹Smith, A. 1972.

3.2 Estrutura química dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes na soja.



3.3. Ficha técnica do extrato desengordurado de soja provido pela OLVEBRA INDUSTRIAL S/A

MARCA: PROVESOL

REGISTRO no MS.: Dispensado de registro

ORIGEM e CARACTERÍSTICAS

PROVESOL PSA é um extrato protéico obtido a partir da emulsão aquosa da farinha de soja desengordurada, submetido a tratamentos térmicos adequados para inativação dos fatores antinutricionais. A fração solúvel é concentrada, e em seguida seca por processo spray-dryer.

É isento de ingredientes adicionais e quaisquer aditivos químicos.

APLICAÇÕES

PROVESOL PSA é um produto protéico natural e indicado como complemento alimentar em dietas, como substituto do leite de origem animal nas restrições de caráter fisiológico (lactose) ou religioso (Kosher).

Recomendado como matéria-prima na fabricação de sopas, tofu, cremes, chocolates, sobremesas e outros produtos alimentícios que se deseje isentos de lactose, caseína e glúten.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS e NUTRICIONAIS

	100g	30g (3 colheres de sopa)	% VD (*)
Valor Calórico Total	490 kcal	150 kcal	6%
Carboidratos	19,0 g	6,0 g	2%
Proteína	44,0 g	13,0 g	26%
Gorduras totais	26,0 g	8,0 g	10%
Gorduras saturadas	5,0 g	1,5 g	6%
Colesterol	Zero	zero	zero
Fibra alimentar	1,0 g	zero	zero
Sódio	40 mg	zero	zero
Cálcio	157 mg	47 mg	6%
Ferro	4,5 mg	1,4 mg	10%

(*) Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.500 calorias.

Umidade	4,0 g
Cinzas	6,0 g

PADRÕES MICROBIOLÓGICOS

Contagem padrão em placas	máx. 5×10^4 UFC/mL
Coliformes totais	máx. 10 UFC/mL
Coliformes fecais	máx. 1 UFC/mL
Salmonela	ausência em 25 g
Bolores e leveduras	máx. 1×10^3 UFC/mL

REIDRATAÇÃO

Conforme o uso de 7,5% a 10% de PSA em relação à água adicionada.

EMBALAGEM

PROVESOL PSA: é acondicionado em saco de papel Kraft multifolhado e revestido internamente com saco de polietileno, com peso líquido de 25 Kg.

ARMAZENAMENTO

PROVESOL PSA, deve ser estocado em sua embalagem original, sobre estrados em local seco e ventilado.

Manter a embalagem corretamente fechada quando não estiver em uso.

PRAZO DE VALIDADE

09 (nove) meses

Apêndice 4 Alguns exemplos de produtos lácteos probióticos disponíveis no mercado mundial (Tamime, *et al.* 1995; Lourens-Hauttingh, *et al.*, 2000)

<i>Produto</i>	<i>País</i>	<i>Cultura</i>	<i>Aditivo prebiótico</i>
Produto lácteo AB	Dinamarca	A + B	
Iogurte Acidophilus bifidus	Alemanha	A + B + cultura de iogurte	
BA “Bifidus ativo	França	<i>B. longum</i> + cultura de iogurte	
Leite Bifidus	Alemanha	<i>B. bifidum</i> ou <i>B. longum</i>	
Iogurte Bifidus	Vários países	<i>B. bifidum</i> ou <i>B. longum</i> + cultura de iogurte	
Bifighurt	Alemanha	<i>B. longum</i> + <i>S. thermophilus</i>	
Bifilak(c) t	União Soviética	A + B	
Biobest	Alemanha	<i>B. bifidum</i> ou <i>B. longum</i> + cultura de iogurte	
Biokis (= Femilact)	Antiga Tchecoslováquia	A + B + <i>Pediococcus acidilactici</i>	
Biomild	Alemanha	A + B	
Mil-Mil	Japão	A + B + <i>B. breve</i>	Contém semente de biogerme
Bioghurt	Alemanha	A + B + <i>S. thermophilus</i>	
Cultura	Dinamarca	A + B	
	Noruega		
Philus	Suécia	A + B + <i>S. thermophilus</i>	
BA live	Reino Unido	A + B + Cultura de Iogurte	
A – 38	Dinamarca	A + B + Mesophilic cultura LD	
Leite Acidophilus	Suécia	A + B + Mesophilic cultura LD	
Kyr	Itália	A + B + Cultura de Iogurte	
Ofilus	França	A + B + <i>S. thermophilus</i>	
BIO	França	A + B + Cultura de Iogurte	
Biogarde	Alemanha	A + B + <i>S. thermophilus</i>	
Fermento ABC	Alemanha	A + B + <i>L. paracasei</i>	Inulina
AKTIFIT plus	Suíça	A + B + <i>L. paracasei</i> GG + <i>S. thermophilus</i>	Oligofrutose
Symbalance	Suíça	A + B + <i>L. reuteri</i> + <i>L. paracasei</i>	Inulina
Mona fysisig	Holanda	<i>L. acidophilus</i>	
Actimell	Alemanha	<i>L. paracasei</i>	Inulina
LC-1	Alemanha	<i>L. acidophilus</i>	
LA-7 plus	Bauer	A + B	Oligofrutose
Vifit	Alemanha	<i>L. paracasei</i> GG	Oligofrutose
Primo	Alemanha	Culturas BactoLab	
Zabady	Egito	<i>B. bifidum</i> + Cultura de iogurte	

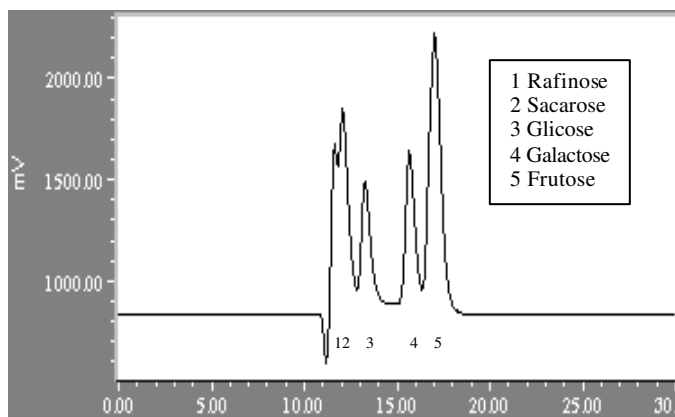
*A: *L. acidophilus*, B: Bifidobacteria, Cultura de Iogurte: *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Apêndice 5. Resumo de algumas patentes de produtos relacionados com probióticos e prebióticos.

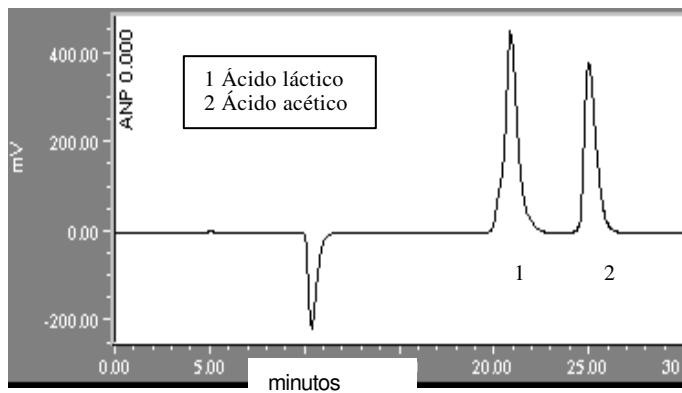
Numero	Título	Data publicação	Abstract	Fonte
EP1186295A1	Préparations pharmaceutiques contenant des extraits d'isoflavone de soja et des micro-organismes probiotiques.	2002-03-13	Preparação farmacêutica de extratos de isoflavonas da soja e os microrganismos probióticos vivos, como produto da combinação para uma administração simultânea ou separada no tempo, útil no tratamento dos sintomas ligados à menopausa.	esp@cenet
FR2789854	Ice Cream product based on fermented soyamilk or other vegetable	2000-08-25	Sorvete feito com leite vegetal fermentado, especialmente o leite de soja e xarope de cereal rico em glicose. Preparação: (a) preparação do leite vegetal; (b) inoculação do leite com bateria láctica, preferivelmente probiotica; (c) recuperação do coagulado; (d) adição do xarope de cereal rico em glicose; (e) homogeneização da mistura; (f) formação do sorvete.	esp@cenet
FR2668683	Nutricional food supplement for force-fed palmipeds	1992-05-07	Consiste em farinha de soja ou ervilha misturada com bicarbonato de sódio, probióticos, vitaminas, minerais, enzimas, soro e aminoácidos e levado na forma de balas ovóides mastigáveis. O produto de acordo com a invenção é experimentado como alimento fortificador de palmípedes para produção de patê de foie gras.	esp@cenet
6,254,900	Method for the manufacture of cheese, quark and yogurt products from soybeans	2001-07-03	Inclui os seguintes passos: (a) preparação do leite de soja; (b) adição de açúcar vegetal; (c) adição de gorduras e óleos vegetais emulsificantes no leite de soja; (d) preparação do cocktail de cultivo com pH de 3.8-4.5...(e) maturação final do produto até obter queijo, quark e yogurt.	USPatents
6,033,691	Process for manufacturing a biologically active fermented milk product and product obtained by the process	2000-03-07	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 55544) e <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 55543) são simultaneamente inoculados em leite previamente adicionado com <i>Streptococcus</i> , e depois fermentado, resultando um produto de leite ativo biologicamente. O produto pode ser mantido entre 4-10 C por 30 dias. O produto pode ser liofilizado e mantido a 20-25 C, U.R. 40-60% por mínimo 4 meses. Ao reconstituir-se consegue pH perto do produto líquido original e é palatável.	USPatents
5,895,648	Composition for feed use comprising lyophilized live lactic bacteria	1999-04-20	Composição de uso de alimentos que contém uma mistura de bactéria viva liofilizada compreendendo pelo menos duas espécies de bactéria selecionada de <i>Bifidobacterium brevi</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i> e pelo menos duas espécies de bactérias selecionadas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Streptococcus faecium</i> e um ou mais oligossacarídeos.	USPatents
5,922,375	Probiotic <i>Bifidobacterium</i> strain	1999-07-13	Especie de <i>Bifidobacterium</i> isolado incorporado em alimentos, bebidas, alimentos para animais e ou suplementos alimentícios.	USPatents

Apêndice 6. Cromatogramas dos padrões, cinéticas das fermentações dos pró-bióticos em extrato de soja e alguns ensaios do planejamento experimental P&B.

Cromatografia de carboidratos e ácidos orgânicos em HPLC – Varian

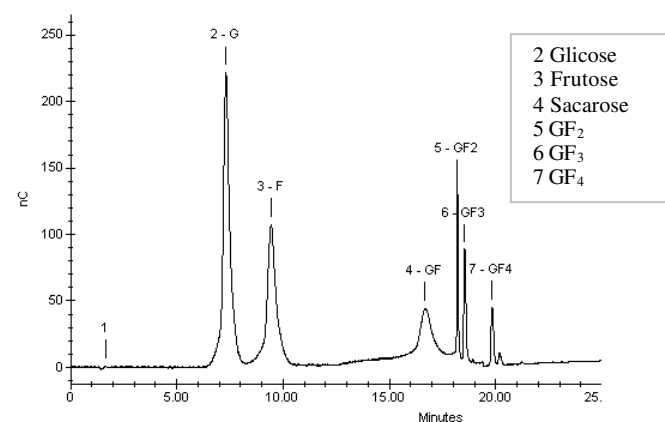


Açúcares e oligossacarídeos. Coluna HPX 87H

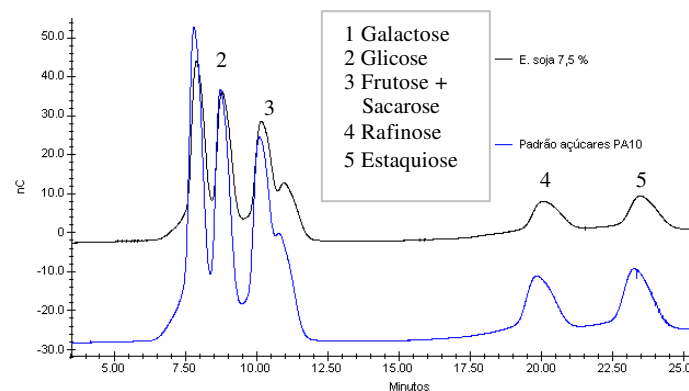


Ácidos orgânicos. Coluna HPX 87H

Análise de carboidratos em cromatógrafo Dionex

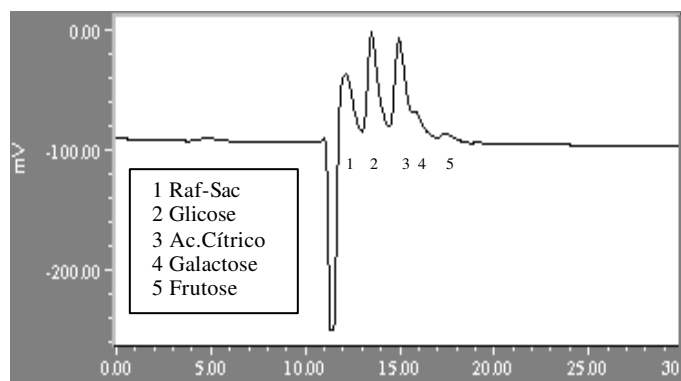


Açúcares e frutooligosacarídeos. Coluna PA100. GF₂-kestose, GF₃-nistose, GF₄-1^F – fructofuranosilnistose.

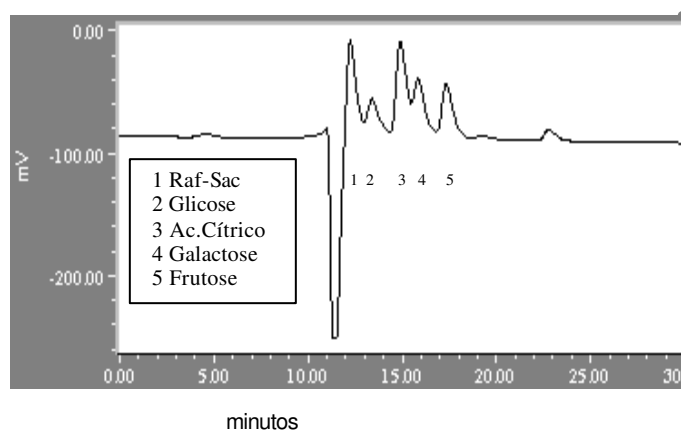


Açúcares e oligossacarídeos e extrato de soja. Coluna PA10.

Cromatografia de carboidratos e ácidos orgânicos em HPLC – Varian

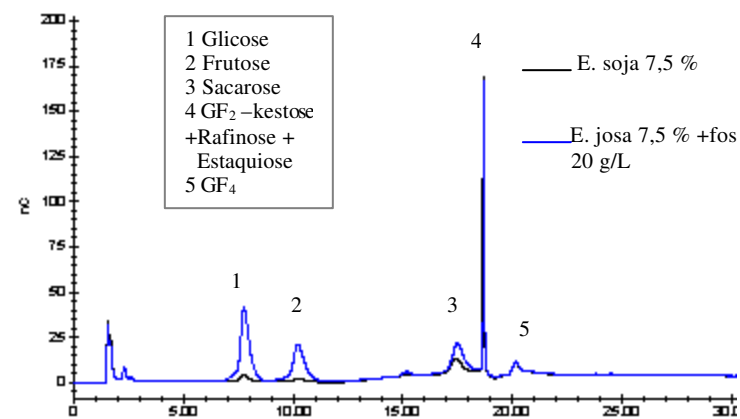


Extrato de soja 7,5 %. Coluna HPX 87H



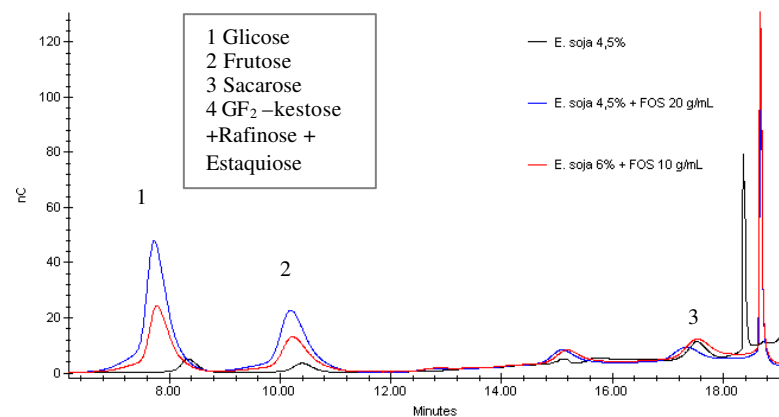
Extrato de soja 7,5 % + 25 g/L xarope com FOS. Coluna HPX 87H

Análise de carboidratos em cromatografo Dionex



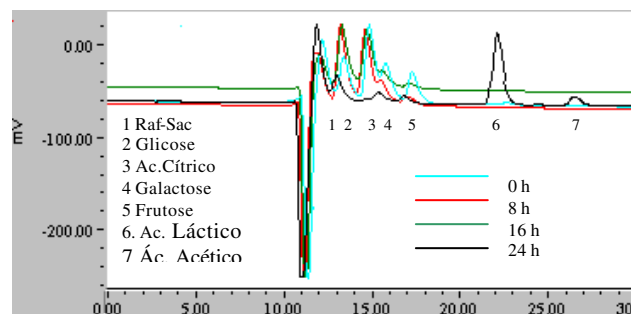
GF₃-nistose, GF₄-1⁺ – fructofuranosilnistose.

4

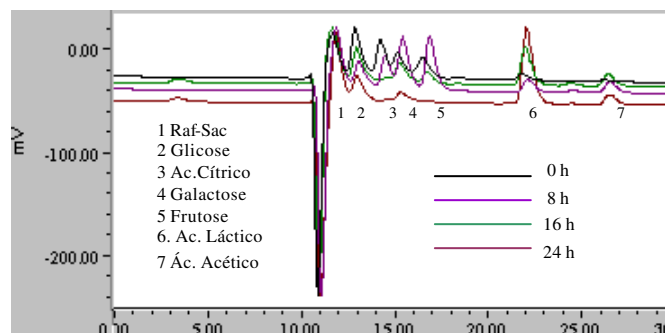


Extrato de soja 4,5% sem e com xarope com FOS (20 g/L), e extrato de soja 6%+ 10 g/L de Xarope com FOS. Coluna PA100

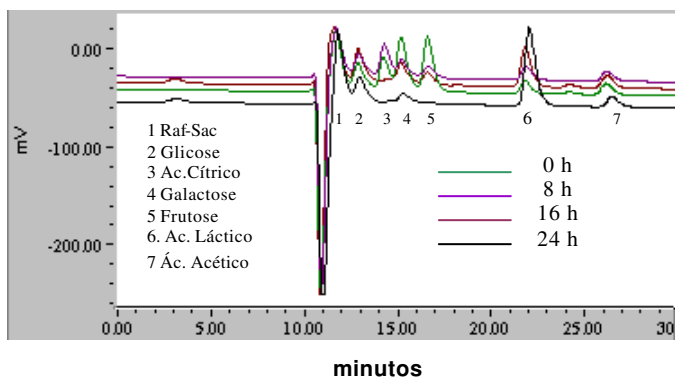
Cromatografia de carboidratos e ácidos orgânicos em HPLC – Varian



Cinética *B. longum* em extrato de soja 7,5 %. Coluna HPX 87H

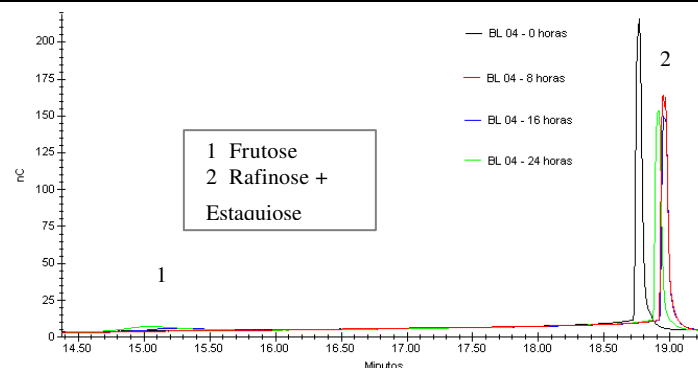


Cinética *L. paracasei* em extrato de soja 7,5 % Coluna HPX 87H

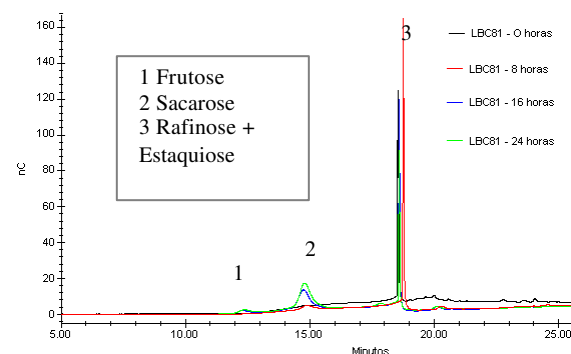


Cinética *L. acidophilus* em extrato de soja 7,5 %. Coluna HPX 87H.

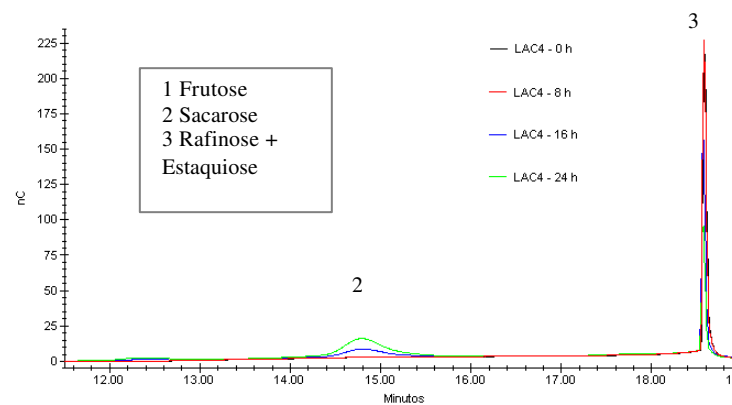
Análise de carboidratos em cromatografo Dionex



Cinética *B. longum* em extrato de soja 7,5 %. Coluna PA100.

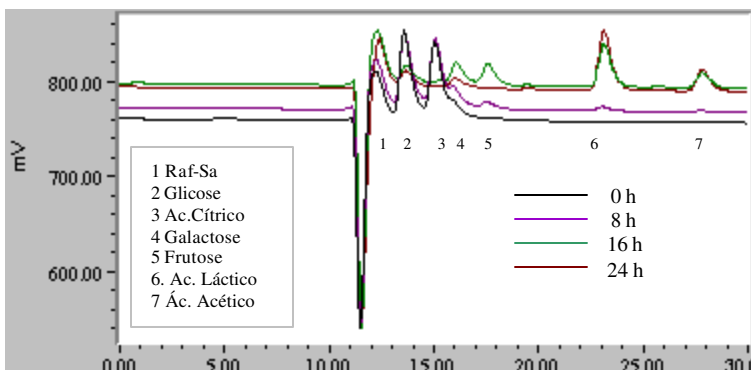


Cinética *L. paracasei* em extrato de soja 7,5 %. Coluna PA100

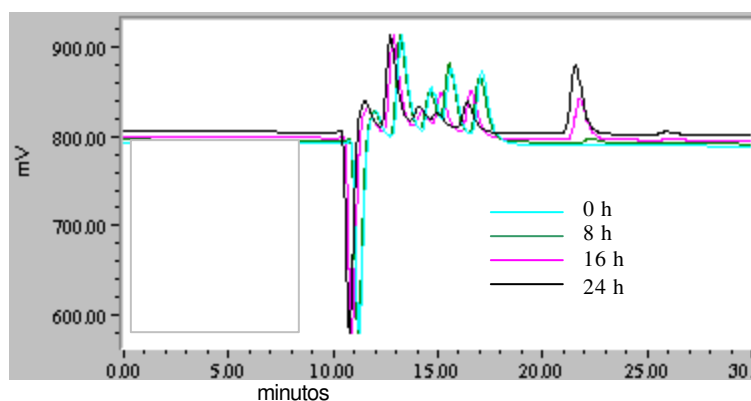


Cinética *L. acidophilus* em extrato de soja 7,5 %. Coluna PA100

Cromatografia de carboidratos e ácidos orgânicos
em HPLC – Varian

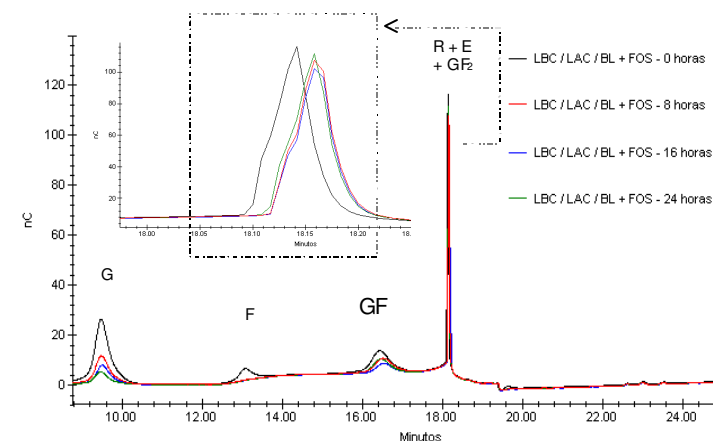
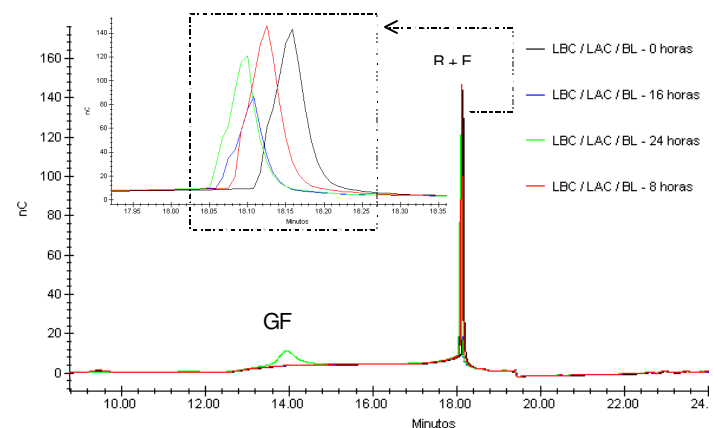


Cinética *L. acidophilus* /*L. paracasei*/B. *longum*. em extrato de soja 7,5 %.
Coluna HPX 87H



Cinética *L. acidophilus* /*L. paracasei*/B. *longum*. em extrato de soja 7,5 %
+ xarope com FOS (25 g/L). Coluna HPX 87H

Análise de carboidratos em cromatografo Dionex



Cinéticas de *L. acidophilus* /*L. paracasei*/B. *longum*. em extrato de soja 7,5 % (cromatograma acima), e de *L. acidophilus* /*L. paracasei*/B. *longum*. em extrato de soja 7,5 % + xarope com FOS (25 g/L) (cromatograma abaixo). Coluna PA100

