



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

***DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO SIMBIÓTI CO
FERMENTADO DE SOJA***

Olga Lucía Mondragón Bernal

Mestre em Engenharia de Alimentos 2004 (UNICAMP)

Engenheira de Alimentos 1994 (UJTL-Colômbia)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Orientador

**Tese de doutorado apresentada à
Comissão de Pós-Graduação da Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do Título de Doutor em
ENGENHARIA DE ALIMENTOS.**

Campinas, 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M745d Mondragón-Bernal, Olga Lucía
Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja / Olga
Lucía Mondragón-Bernal. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Simbiótico. 2. Exopolissacarídeos. 3. Testes funcionais. I.
Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Development of soymilk synbiotic fermented food
Palavras-chave em inglês (Keywords): Synbiotic, Exopolysaccharides, Functional tests
Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho
Hélia Harumi Sato
Saartje Hernalsteens
Helena Maria André Bolini
Maria de Fátima Pícolo Barcelos
Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese de doutorado **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja** defendida por **Olga Lucía Mondragón Bernal**, aprovado pela Comissão Julgadora em

-----.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador FEA/UNICAMP

Profª Dra. Hélia Harumi Sato
Membro Titular FEA/UNICAMP

Profª Dra. Helena Maria André Bolini
Membro Titular FEA/UNICAMP

Profª Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos
Membro Titular Depto. de Ciência dos Alimentos/UFLA

Profª Dra. Saartje Hernalsteens
Membro Titular Depto. de Ciências Exatas e da Terra /UNIFESP

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

Dra. Yara Maria Franco Moreno
Membro Suplente DCA/UNICAMP

Dra. Izildinha Moreno
Membro Suplente CTL/ITAL

*“Vi flores nascerem em lugares pedregosos,
E coisas gentis feitas por pessoas feias de rosto,
E a taça de ouro ganha pelo pior cavalo nas corridas,
E, assim sendo, eu também confio”.*

(John Masefield, poeta inglês)

*Dedico aos meus amores:
Mariana, minha filha,
Zé Guilherme meu melhor amigo e esposo...*

*...Aos meus pais Eduardo e Alicia,
à minha tia Stella,
aos meus irmãos: Nohora, Nelson, Javier e Iván,
às minhas sobrinhas: Natalia e Sofía.*

*Com muito afeto,
Por seu amor imenso e incondicional, pelo exemplo, presença e
apoio constantes na minha vida.*

*“...Soñé que eras una tierna paloma mensajera
Con un mensaje celeste entre tus alas,
Soñé tu voz como el murmullo suave
De la brisa apacible entre las ramas...
Soñé en tus manos, la caricia suave,
Como roce de nube, como botón de rosa
Que perfuma y transmuta
El dolor de la espina en mariposa.
Soñé en mi frente,
La tibia claridad de tu mirada...
Y te entregué mis noches, para soñarte bella,
Y te entregue mis días para hacerte una reina...
Y en una clara mañana...
Tu voz clara e sonora, como la voz de un ángel
Potente y tierna resonó en mi vida
Y entonces pude escuchar la melodía
De un suave suspirar, sobre mi almohada...
Y sentí que en la tibia y radiante mañana
Una gota de cielo se posaba en mi vida,
Y un aroma de nardo perfumaba mi alma”*

(Yamile Alberd – Estrella de noviembre)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo nesta vida.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri por orientar este trabalho, por acreditar sempre, pela dedicação, exemplo, amizade, confiança, compreensão e apoio a cada etapa desta longa caminhada.

À Prof^a. Maria Isabel Rodrigues e à Dra. Fátima Costa (Bel e Fifa) pelo carinho, amizade, momentos compartilhados, oportunidades brindadas, preocupação, orientação sempre oportuna e valiosa para com meu trabalho e também pelos ensinamentos e exemplos constantes de vida.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, porque no seu caloroso ambiente proporcionou não só meu desenvolvimento profissional, mas também grandes amizades, aprendizados e vivências inesquecíveis.

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

À Profa. Florência Menegalli e Dra. Délia Tápia Blacido do LEP por suas valiosas colaborações com o empréstimo do reômetro, também agradeço a Ângela e Ana pela ajuda prestada.

Ao CNPq/PEC-PG, pelas bolsas de doutorado e de iniciação científica concedidas para a realização deste trabalho.

Aos componentes da banca de avaliação deste trabalho, Profa. Hélia Harumi Sato, Profa. Helena Maria André Bolini, Profa. Maria de Fátima Piccolo Barcelos, Dra. Saartje Hernalsteens, Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa, Dra. Yara e Dra. Izildinha pelas considerações, correções e sugestões pertinentes.

Às entidades e empresas pela doação do material utilizado nesta pesquisa: DANISCO pelos probióticos e a polidextrose, OLVEBRA pelo extrato de soja, ORAFIT pelos frutooligossacarídeos, USDA pelas bactérias lácticas, Chr. Hansen pelos probióticos e aromas, Duas Rodas, Firmenish, Vitta Flavor, Givaudan, Citromax, Centroflora pelos aromas e polpas, a Proceedings pelo apoio financeiro na primeira etapa do projeto, e pelo fornecimento de diversos ingredientes e embalagens.

Aos colegas e amigos do LEB de várias gerações: Daniel, Yemiko, Saartje, Fernandinha, Helen, Luciano, Bernardo, Eliane, Raquel, Andrea, César (querido agregado), Ana Paula, Marquinhos, Márcio, Rosana, Remi, Lilian, Angélica, Juliana, Ma. Fernanda, Rafael, Felipe, Fernanda, Geraldo, pelo companheirismo e agradável convívio.

À Juliana e Maria Fernanda, alunas de iniciação científica pelo grande carinho e amizade, com sua competência, dedicação e paciência foram fundamentais para este trabalho, vocês vão longe, sorte sempre.

Aos meus queridos amigos e colegas: Délia & Harold, Kassandra & Zeca, Jacque & Gilvair, Nadia & Ricardo, Eliza & Sayuri, Maria Inês & Alexis, Dora & Alfredo, Luciano & Adriana, César & Andrea, Kelly & Marcos, Soraia, Lucielen, Cinthia, Bárbara, Severina, Eliana & Jairo, Gabriela & Mateus, Carol & Alexander, Hugo & Margarita, Tati, Beatriz... pelas horas felizes, os momentos difíceis e as vivências inesquecíveis.

A toda minha querida família Colombiana, aos meus tios(as), primos(as), cunhado(as) e aos meus amigos(as) da escola, faculdade e outras instâncias, não poderia nomear todos aqui, pois o espaço é curto, mas agradeço pelo apoio, carinho, orações, atenções, companhia, mensagens e lembranças. À memória dos “abuelitos Barbarita, Elias y Tia Leonor”.

A toda minha querida família Brasileira: “Os Lembi e agregados” Uma dedicatória especial para D. Zélia por sua generosidade e amor sem limites, aos meus cunhados e sobrinhos pelo carinho e apoio permanente. Aos meus vizinhos e amigos de Lavras por sua amizade sincera.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
RESUMO GERAL	XXIII
ABSTRACT	XXV
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	5
PLANO DE TRABALHO	6
CAPÍTULO 1	9
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. Análise sensorial.....	12
1.2. Expectativas de aceitação do extrato hidrossolúvel de soja e derivados.	12
1.3. Funcionalidade da soja e derivados	13
1.4. Funcionalidade dos simbióticos (probióticos e prebióticos)	14
1.4.1. <i>Probióticos</i>	14
1.4.2. <i>Prebióticos</i>	15
1.4.3. <i>Simbióticos</i>	18
1.5. Polissacarídeos.....	19
1.6. Exopolissacarídeos EPS.....	20
1.7. Análise de Exopolissacarídeos.....	24
1.8. Vida-de-prateleira de alimentos processados	25
1.9. Propriedades reológicas de alimentos	26
1.9.1. <i>Fluidos que não necessitam de tensão inicial de cisalhamento (σ_0) para escoar</i>	27
1.9.2. <i>Fluidos que necessitam de tensão inicial de cisalhamento (σ_0) para escoar</i>	28
1.10. Interações entre proteínas-polissacarídeos	28
1.11. Screening Design Plackett & Burman.	29
1.12. Efeitos benéficos dos probióticos	29
1.13. Estudos de funcionalidade e aplicações clínicas.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2	41
1ª. PARTE	41

2.1. OPTIMIZATION OF SYMBIOTIC FERMENTED FOOD FROM HYDROSOLUBLE SOY EXTRACT APPLYING EXPERIMENTAL DESIGN AND SENSORY ANALYSIS TECHNIQUES	41
ABSTRACT	43
PRACTICAL APPLICATIONS	43
2.1.1. INTRODUCTION	44
2.1.2. MATERIALS AND METHODS	46
2.1.2.1 <i>Raw material</i>	46
2.1.2.2 <i>Sample preparation for sensory tests</i>	47
2.1.2.3 <i>Preliminary affective sensory test for prototypes of flavored fermented soy beverages</i>	47
2.1.2.4 <i>CCRD and affective sensory tests for ideal sweetness and flavor, overall acceptance and purchasing intent</i>	47
2.1.2.5 <i>Validation test for the models</i>	48
2.1.2.6 <i>Test conditions</i>	48
2.1.3. RESULTS AND DISCUSSION	49
2.1.3.1 <i>Preliminary tests</i>	49
2.1.3.2 <i>CCRD experimental design to determine the just-about-right sweetness and flavor and affective sensory tests for acceptance and purchasing intent</i> ...	50
2.1.3.3 <i>Verification of the CCRD under the conditions that satisfied the responses</i>	56
2.1.4. CONCLUSIONS	57
2.1.5. REFERENCES	58
CAPÍTULO 2	63
2ª. PARTE	63
2.2. EQUIVALENCIA DE DOÇURA PARA UMA MISTURA DE EDULCORANTES HIPOCALÓRICOS E SACAROSE EM ALIMENTO SIMBIÓTICO FERMENTADO A BASE DE EXTRATO DE SOJA	63
RESUMO	65
ABSTRACT	65
2.2.1. INTRODUÇÃO	65
2.2.2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.2.2.1 <i>Preparação das amostras para testes sensoriais</i>	68
2.2.2.2 <i>Pré-seleção dos provadores para escala de magnitude</i>	69

2.2.2.3. Teste de diferença do controle para escolha da amostra referência a ser utilizada na determinação da equivalência de doçura entre sacarose e associação de edulcorantes	69
2.2.2.4. Teste de escala de magnitude para equivalência de doçura de uma mistura de edulcorantes em relação a sacarose	70
2.2.2.5. Análise Estatística	70
2.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.2.3.1. Teste triangular para determinar a similaridade entre amostras adoçadas com sacarose e com edulcorantes no teor teórico (mistura de acessulfame-k:sucralose 1:1)	70
2.2.3.2. Escolha da amostra referência a ser utilizada na determinação da equivalência de doçura entre sacarose e associação de Acessulfame-K e Sucralose	71
2.2.3.3. Determinação da estimação de magnitude para análise da equivalência de doçura de uma mistura de edulcorantes em relação à sacarose	72
2.2.4. CONCLUSÃO	73
2.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 3	77
3. ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DE ALIMENTOS SIMBIÓTICOS A BASE DE EXTRATO DE SOJA	77
RESUMO	79
3.1. INTRODUÇÃO	79
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	82
3.2.1. Preparação das amostras para estudo da vida-de-prateleira	82
3.2.2. Metodologia analítica	83
3.2.2.1. Determinação do pH	83
3.2.2.2. Medida de Sinérese	83
3.2.2.3. Contagem de colônias	83
3.2.2.4. Determinação das propriedades reológicas	83
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.4. CONCLUSÃO	92
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CAPÍTULO 4	97
4. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM EXTRATO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO - ESTUDOS CINÉTICOS	97

RESUMO	99
4.1. INTRODUÇÃO.....	99
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	101
4.2.1. <i>Culturas Lácticas e Probióticas</i>	101
4.2.2. <i>Meio de cultura</i>	102
4.2.3. <i>Propagação, preparação do inóculo e determinação da concentração de células</i>	102
4.2.4. <i>Triagem para bactérias produtoras de hidrocolóides</i>	103
4.2.5. <i>Crescimento da linhagem <i>L. rhamnosus</i> LR32 e ou mistura de probióticos padrão em extrato hidrossolúvel de soja</i>	104
4.2.6. <i>Metodologia analítica</i>	104
4.2.6.1. <i>Determinação do pH</i>	104
4.2.6.2. <i>Medida de Sinérese</i>	104
4.2.6.3. <i>Contagem de colônias</i>	104
4.2.6.4. <i>Determinação das propriedades reológicas</i>	105
4.2.6.5. <i>Separação de células</i>	106
4.2.6.6. <i>Determinação de Açúcares Redutores (AR), Açúcares Redutores Totais (ART), Açúcares Não Redutores (ANR)</i>	106
4.2.6.7. <i>Determinação de Exopolissacarídeos (EPS)</i>	106
4.2.6.8. <i>Identificação de açúcares e polissacarídeos em HPLC</i>	106
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.3.1. <i>Resultados dos estudos cinéticos</i>	108
4.3.2. <i>Resultados de vida-de-prateleira</i>	116
4.4. CONCLUSÕES	121
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
CAPÍTULO 5	125
5. ESTUDO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA ESTABILIDADE E FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA	125
RESUMO	127
5.1. INTRODUÇÃO.....	127
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	130
5.2.2. <i>Culturas Probióticas e Lácticas</i>	130
5.2.3. <i>Procedimento de elaboração de alimento simbiótico</i>	130
5.2.4. <i>Estudo das variáveis significativas na estabilidade</i>	131

5.2.5. Metodologia Analítica	131
5.2.6. Análise Sensorial	133
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
5.3.1. Vida-de-prateleira.....	134
5.3.2. Análise sensorial.....	143
5.4. CONCLUSÃO	146
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
CAPÍTULO 6.....	151
6. TESTES <i>IN VITRO</i> DE RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL	151
RESUMO	153
6.1. INTRODUÇÃO.....	153
6.1.1. Sobrevivência durante o trânsito estomacal.....	155
6.1.2. Tolerância aos sais biliares.....	156
6.3. MATERIAL E MÉTODOS	157
6.3.1. Matéria-prima	157
6.3.2. Culturas Probióticas e Lácticas.....	159
6.3.3. Preparo dos fermentados de extrato hidrossolúvel de soja com as culturas probióticas.....	159
6.3.4. Testes de digestibilidade: resistência a sucos digestivos simulados <i>in vitro</i>	159
6.3.4. Digestão <i>in vitro</i>	160
6.3.5. Metodologia Analítica	160
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
6.5. CONCLUSÃO	170
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
CONCLUSÕES GERAIS	175
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	179
APÊNDICE 1. FICHAS APLICADAS PARA TESTES SENSORIAIS	181
APÊNDICE 2. COMPORTAMENTO DE ÍNDICES REOLÓGICOS EM ALIMENTOS SIMBIÓTICOS A BASE DE SOJA DURANTE VIDA DE PRATELEIRA.	187
APÊNDICE 3. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL PARA ANÁLISE DE EXOPOLISSACARÍDEOS EPS- PRODUZIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE FERMENTAÇÃO DE EXTRATO DE SOJA	189

ÍNDICE DE TABELAS

		Pag.
Capítulo 1	Tabela 1. Efeitos benéficos de probióticos em humanos. Critérios de seleção.	31
Capítulo 2 Parte 1.	Table 1. Preliminary sensory test for a synbiotic soy beverage with added masking soy agent (E) and flavorings: average overall acceptance scores for flavor.	51
	Table 1. Preliminary sensory test for a synbiotic soy beverage with added masking soy agent (E) and flavorings: average overall acceptance scores for flavor.	52
	Table 3. ANOVA, coefficient of determination (R^2), and the calculated and tabulated F values for the evaluation of the models used.	53
	Table 4. Average responses to verification of the models using unstructured just-about-right scale with 0 as the middle category.	58
	Table 5. Verification of models by ANOVA with respect to ideal sweetness and flavor as generated by CCRD.	58
Capítulo 2 Parte 2	Tabela 1. Teste de Dunnet da análise sensorial de diferença do controle, para sabor e doçura de sobremesa fermentada de extrato hidrossolúvel de soja, sabor leite condensado.	71
	Tabela 2. ANOVA para teste de diferença do controle das amostras de sobremesa funcional fermentada de soja no sabor leite condensado.	72
Capítulo 3	Tabela 1. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada.	83
	Tabela 2. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Natural Light (N-L) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.	84
	Tabela 3. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Natural Sacarose (N-S) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.	84
	Tabela 4. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Pêssego Light (P-L) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.	87
	Tabela 5. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Pêssego Sacarose (P-S) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.	87
	Tabela 6. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Morango Light (M-L) durante a vida-de-prateleira	88
	Tabela 7. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Morango Sacarose (M-S) durante a vida-de-prateleira	88
	Tabela 8. Modelos e parâmetros reológicos para amostra comercial e para as amostras N-S, N-L, P-S e P-L após 20 dias de vida-de-prateleira.	91
Capítulo 4	Tabela 1. Condições e tempo total de propagação individual das linhagens de bactérias lácticas	103
	Tabela 2. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada.	105
	Tabela 3. Crescimento celular das bactérias lácticas durante fermentação em meio MRS modificado em condições de aerobiose,	

	anaerobiose, turbidez e viscosidade.	108
	Tabela 4. Cinéticas de crescimento celular de <i>L. rhamnosus</i> e variação de pH durante fermentação de EHsoja com e sem adição de sacarose.	109
	Tabela 5. Cinética das contagens e pH de fermentados de EHsoja com mistura de probióticos adicionados ou não de <i>L. rhamnosus</i> com adição de sacarose.	110
	Tabela 6. Teor de açúcares AR, ART e ANR, EPS e sinérese durante fermentação de EHsoja por <i>L. rhamnosus</i> e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose.	111
	Tabela 7. Viscosidade aparente e constantes τ_0 , k e n dos modelos reológicos ajustados para fermentados de EHsoja com <i>L. rhamnosus</i> e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose durante fermentação.	115
	Tabela 8. Contagem de microrganismos e pH de fermentados de EHsoja com <i>L. rhamnosus</i> com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.	117
	Tabela 9. Contagem de microrganismos e pH de fermentados de EHsoja com mistura de probióticos adicionados ou não de <i>L. rhamnosus</i> com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.	117
	Tabela 10. Teor de açúcares AR, ART e ANR, EPS e sinérese de fermentados de EHsoja com <i>L. rhamnosus</i> , Mistura de probióticos adicionados ou não de <i>L. rhamnosus</i> com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.	119
	Tabela 11. Viscosidade aparente e constantes τ_0 , k e n dos modelos reológicos ajustados para fermentados de EHsoja com <i>L. rhamnosus</i> e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.	120
Capítulo 5	Tabela 1. Níveis das variáveis para o planejamento Plackett & Burman	131
	Tabela 2. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada	132
	Tabela 3. Plackett & Burman para o estudo da estabilidade do alimento simbiótico fermentado a base de extrato de soja durante 0, 10, 20 e 30 dias de prateleira.	135
	Tabela 4. Modelos reológicos ajustados para os ensaios do delineamento experimental Plackett & Burman.	138
	Tabela 5. Resumo dos efeitos das variáveis independentes e coeficiente de variação explicada para as respostas do delineamento experimental Plackett & Burman na estabilidade do simbiótico de soja durante vida de prateleira.	141
	Tabela 6. Testes afetivos de aceitação sensorial para os ensaios com melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira a partir do delineamento experimental Plackett & Burman.	144
	Tabela 7. Teste afetivo de intenção de compra pelo público alvo para os ensaios com melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira a partir do delineamento experimental Plackett & Burman.	145
Capítulo 6	Tabela 1. Matriz do delineamento experimental Plackett & Burman	158

	Tabela 2. Teor de açúcares redutores-AR (g/L), açúcares redutores totais-ART (g/L) e exopolissacarídeos-EPS (g/L) após digestão <i>in vitro</i> de amostras simbióticas selecionadas em sucos simulados do trato gastrointestinal.	162
	Tabela 3. Resultados das contagens total, de lactobacilos e de bifidobactérias (log UFC/mL) durante 8 horas de digestão <i>in vitro</i> de amostras simbióticas selecionadas.	167

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag.
Capítulo 1	Figura 1. (a) Estrutura molecular de frutooligosacarídeos (A) 1-kestose (B) nistose e (C) frutofuranosil nistose (b) Estruturas moleculares dos α -galactosídeos rafinose e estaquiiose.	17
	Figura 2. Estrutura molecular da polidextrose	18
	Figura 3. Curvas de escoamento para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.	27
	Figura 4. Esquema da evolução no desenvolvimento de tecnologias para produtos envolvendo probióticos, prebióticos e simbióticos. TI: trato intestinal. AGCC: ácidos graxos de cadeia curta	32
Capítulo 2 Parte 1.	Figure 1. Experimental values to ideal sweetness (a), ideal flavor (b), overall acceptance (c) and purchasing attitude (d) in function of predicted values by the adjusted models.	54
	Figure 2. Response surfaces and contour plots for (a) and (b) ideal sweetness; (c) and (d) ideal flavor; (e) and (f) overall acceptance; (g) and (h) purchasing attitude.	55
	Figure 3. Distribution of the percentages in the population from purchasing attitude to CCRD s assays 4, 2 and 11 for synbiotic fermented beverage of soymilk.	57
Capítulo 2 Parte 2	1. Determinação dos coeficientes da lei de potencia para: (a)sacarose (b) edulcorantes..	73
Capítulo 3	Figura 1. Viabilidade de bactérias probióticas lactobacilos e bifidobactérias (Bif) em UFC/mL nas bebidas de soja adoçadas com sacarose (S=sacarose) ou com edulcorantes hipocalóricos (L=light) nos sabores: natural (N), morango (M) e pêssego (P) (contendo pedaços de fruta).	90
	Figura 2. Mudanças na cor e presença de sinérese em simbiótico morango light durante vida-de-prateleira	92
Capítulo 4	Figura 1. Esquema da propagação e contagem de células dos microrganismos puros.	102
	Figura 2: Esquema das análises realizadas.	105
	Figura 3. Colônias de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR32 em meio MRS, substituindo-se glicose por 120 g/L de sacarose e adicionado de 0,01% de azul de anilina e 6% de EHsoja.	108
	Figura 4. Cinética da fermentação em EHsoja (a) Contagem (logUFC/mL) pH e (b) Contagem EPS (g/L) de LR light (L.	108

	<i>rhamnosus</i> sem sacarose), LR+12%sac (<i>L. rhamnosus</i> + 12% sacarose), LR+ Mix+ 12% (<i>L. rhamnosus</i> + Mistura de probióticos + 12% sacarose), Mix+12%sac (Mistura de probióticos + 12% sacarose)	110
	Figura 5. Cromatograma da formação de EPS durante a fermentação de (a) <i>L. rhamnosus</i> em extrato hidrossolúvel de soja <i>light</i> adicionado de prebióticos FOS e polidextrose (b) <i>L. rhamnosus</i> em extrato hidrossolúvel de soja <i>light</i> e sem adição de prebióticos	113
	Figura 6. Comportamento durante a vida-de-prateleira da (a) sinérese (%) e pH, e, (b) sinérese (%) e EPS (g/L) para as fermentações em EHsoja LR light (<i>L. rhamnosus</i> sem sacarose), LR+ 12%sac (<i>L. rhamnosus</i> + 12% sacarose), LR+ Mix+12% (<i>L. rhamnosus</i> + Mistura de probióticos + 12% sacarose), Mix+ 12%sac (Mistura de probióticos + 12% sacarose) e Mix light.	118
Capítulo 5	Figura 1. Viscosidade aparente (Pa.s) do Plackett & Burman durante a vida-de-prateleira.	140
	Figura 2. Distribuição das percentagens dos consumidores potenciais do produto quanto à atitude de compra.	146
Capítulo 6	Figura 1. Teor de açúcares redutores AR (g/L) durante digestão simulada em ensaios e amostras comerciais (a) em relação ao tempo (b) em relação aos tratamentos digestivos.	163
	Figura 2. Teor de açúcares totais (g/L) nos ensaios e amostras comerciais durante digestão simulada (a) em relação ao tempo e (b) em relação aos tratamentos digestivos.	164
	Figura 3. Quantificação de EPS nos ensaios e amostras comerciais durante a digestão simulada: (a) em relação ao tempo e (b) em relação aos tratamentos digestivos.	165
	Figura 4a. Contagem total log (UFC/mL) durante digestão simulada	168
	Figura 4b. Contagem de Bifidobactérias log (UFC/mL) durante digestão simulada.	168
	Figura 5. Resultados das contagens total, lactobacilos e bifidobactéria dos ensaios 5 (a), 7 (b), 9(c) e 15(d) durante digestão simulada. A linha verde indica a população mínima para ter efeito probiótico > 6 log UFC/mL.	169

RESUMO GERAL

É reportado que problemas como a disbiose intestinal, que consiste no desequilíbrio da flora intestinal causada por diversos fatores da vida moderna, aumentaram bruscamente nos últimos anos. Há, portanto uma tendência mundial em reconhecer o problema de disbiose intestinal e a busca por parte dos consumidores conscientes de dietas saudáveis que melhorem tal equilíbrio. O extrato hidrossolúvel de soja é uma matéria-prima com grande potencial para o desenvolvimento de alimentos com apelo saudável como bebidas fermentadas funcionais simbióticas (probióticos e prebióticos). No Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP desenvolveu-se, em 2004, um alimento à base de extrato hidrossolúvel de soja contendo bifidobactérias, lactobacilos e prebióticos em simbiose. Mostrou-se que o extrato de soja é um meio adequado para cultivo de probióticos resultando em alta concentração de células ($> 10 \log \text{UFC/mL}$) e de oligossacarídeos no produto final. Porém, apesar do alimento simbiótico ter apresentado boas características funcionais, este não seria bem aceito pelo consumidor, já que suas características sensoriais foram insatisfatórias. Durante a vida de prateleira foi observado que o produto apresentava também sinérese e outras mudanças pela alta atividade microbiana. Devido aos problemas apresentados, este novo estudo visou a otimização sensorial do alimento simbiótico a base de extrato hidrossolúvel de soja, além da análise das mudanças ocorridas durante a vida-de-prateleira, dos efeitos de diversas variáveis na estabilidade do produto e finalmente a avaliação dos efeitos probióticos através da resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal. Assim sendo, foram obtidos protótipos de alimentos simbióticos fermentados a base de soja, adoçados com sacarose ou na versão *diet* em sacarose. Estes produtos apresentaram melhora no sabor e doçura com aceitação e intenção de compra pelo público alvo. Produtos com alto teor de extrato de soja ($> 8\% \text{ m/v}$), frutooligossacarídeos ($> 2\% \text{ m/v}$) e/ou povidexose ($> 2\% \text{ m/v}$) adoçados com sacarose ($12\% \text{ m/v}$), ou com associação dos edulcorantes hipocalóricos acessulfame-k e sucralose em proporção 25:75 m/m ($0,024\% \text{ m/v}$), fermentados por quatro bactérias lácticas probióticas *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, *L. rhamnosus* LR32 and *B. longum* BL04 (em proporção 15:15:10:60 respectivamente), e, sem adição do agente tamponante lactato de cálcio, apresentaram boas características de estabilidade durante 30 dias de vida-de-prateleira e com características funcionais de resistência às condições gastrointestinais

simuladas do trato digestivo humano. Os produtos desenvolvidos neste projeto inexistem no mercado brasileiro e viriam suprir a lacuna existente de alimentos apropriados para pessoas que sofrem de disbiose intestinal e outras disfunções relacionadas com o consumo de leite de bovino e derivados.

Palavras chaves: alimento funcional simbiótico, extrato hidrossolúvel de soja, análise sensorial, exopolissacarídeos, bactérias lácticas, vida-de-prateleira, testes funcionais.

ABSTRACT

Problems as intestinal dysbiosis, that is imbalances in intestinal flora caused by many aspects of modern life, have been growing largely in recent years. There is a world-wide trend in recognizing intestinal dysbiosis as a disease and the conscientious consumers of the importance of healthful diets have been searching for foods that improve this balance. The hydrosoluble soy extract is a raw material with great potential in the food development with a healthy appeal as the synbiotics functional and fermented drinks (with probiotics and prebiotics substances. In the Bioprocess Engineering Laboratory of the Food Engineering College at UNICAMP it was developed, in 2004, a foodstuff from hydrosoluble soy extract, containing *Bifidobacterium*, *Lactobacilli* strains and prebiotic in symbiosis. It was shown that the soy extract is a good broth for probiotics culture resulting in high counting ($> 10 \log\text{UFC/mL}$) in the final product and of oligosaccharides. However, although that the synbiotic food presented good functional characteristics, this would not be well accepted for the consumer, due to its sensorial characteristics were unsatisfactory. During the shelf life it was observed that the product also presented syneresis and other changes caused by the high bacteria activity. For the mentioned problems the goals of this new study were the sensorial optimization of the synbiotic food from soymilk, analysis of the changes during shelf life, effects of many variables in the product stability and finally the determination of probiotic effects by the resistance to simulated conditions of gastrointestinal tract. Thus food prototypes of fermented synbiotic foods from soymilk were prepared, sweetened with sucrose or in the version diet in sucrose. These products presented improvement in the flavor and sweetness with acceptance and purchasing intent for the target consumers. Products with high concentration of soymilk ($> 8\% \text{ m/v}$), fructooligosaccharides ($> 2\% \text{ m/v}$) and/or polidextrose ($> 2\% \text{ m/v}$) sweetened with sucrose ($12\% \text{ m/v}$), or with mixture of the hipocaloric sweeteners acesulfame-k and sucralose in the ratio 25:75 m/m ($0.024\% \text{ m/v}$), fermented by four probiotic bacteria *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81, *L. rhamnosus* LR32 and *B. longum* BL04 (in ratio 15:15:10:60 respectively), and, without addition of the calcium lactate buffer agent, presented good characteristics of stability during 30 days of shelf life and good functional resistance to the simulated gastrointestinal conditions of the human digestive tract. The developed products in this work do not exist in the Brazilian market and would come to supply options of adequate food for people with intestinal dysbiosis and disorders or dysfunctions related to bovine milk and derivatives consumption.

Keywords: synbiotic functional food, soymilk, sensorial analysis, exopolysaccharides, acid lactic bacteria, shelf life, functional tests.

INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos funcionais são aqueles que fornecem benefícios adicionais à saúde, além dos nutrientes tradicionais que geralmente contém. Produtos contendo probióticos e prebióticos são alimentos funcionais, já que oferecem benefícios ao melhorar a digestão e em outros aspectos do funcionamento do corpo humano (ADA Reports, 2004).

Em relação a alimentos saudáveis, a dieta é um tema que, hoje em dia, constitui o maior foco estratégico relacionado à saúde pública com o objetivo de manter boa saúde ao longo da vida, prevenindo o aparecimento de doenças crônicas, como desordens gastrointestinais, cardiovasculares, câncer, osteoporose, assim como a procura por promotores de saúde para a população da terceira idade. Pesquisas recentes mostram novos resultados que prometem melhorar a compreensão do tema saúde/dieta, como é o caso da crescente demanda de alimentos saudáveis, estimulando a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos. Há duas décadas atrás, tem-se observado em muitos países um aumento em marcas de produtos que contem bifidobactérias, usando um único gênero, ou em combinação com outras bactérias lácticas em forma de misturas de cultivos *starter* (Tamime et al., 1995).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (2002), explica que diversas forças motivadoras em todo o mundo têm fortalecido o interesse no uso da alimentação como determinante importante da saúde, já que existe um consenso da relação estreita entre alimentação, saúde e doença.

O extrato hidrossolúvel de soja, popularmente conhecido como leite de soja, apresenta grande potencial no desenvolvimento de novos produtos com apelo saudável. Mas encontra grande rejeição devido ao seu sabor característico que lembra feijão cru (Behrens, 2002), causado principalmente pela presença do composto n-hexanal (Hou et al., 2000).

Segundo Behrens (2002), para ser bem aceito pelo consumidor, não é suficiente que um alimento possua boas características nutricionais e alegações de benefícios à saúde, pois além das escolhas baseadas nas informações mostradas na embalagem e rótulo do produto, também avalia a conveniência de uso, preço, e principalmente a qualidade sensorial do alimento. Portanto, produtos com baixa aceitação sensorial pelos consumidores, como é o caso do leite de soja, para as

populações ocidentais, necessita ter suas características sensoriais melhoradas, preferencialmente seu aroma e sabor, de modo a torná-lo um produto mais atrativo para indivíduos de origem não asiática.

Entre os principais efeitos benéficos e terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos estão: a manutenção do balanço da microbiota intestinal, o antagonismo do crescimento de patogênicos, o estímulo do sistema imunológico e a redução da intolerância à lactose, que beneficiam a saúde aumentando a proteção contra infecções intestinais e a prevenção de diversas doenças, entre outros benefícios (Lourens-Hattingh et al., 2001)

Diversos autores descrevem algumas pesquisas que consideram urgentes no campo dos probióticos, tais como a importância na seleção de espécies com capacidade de fermentação de leite e outros substratos num aceitável período de tempo; a ampliação da aplicação de bifidobactérias na indústria de alimentos, não só laticínios; a demonstração dos efeitos na saúde em estudos com humanos ou *in vitro*; o direcionamento de aspectos específicos relacionados com os consumidores e a comercialização de produtos funcionais; ampliação dos estudos relacionados com prebióticos, especialmente de frutooligossacarídeos, entre outras pesquisas (Tamime et al., 1995; Salminen et al., 1999; Saarela et al., 2000; Hernalsteens, 2006). Além disso, as indústrias alimentícias que desejam lançar no mercado produtos à base de soja e fermentados probióticos devem investir tanto nos aspectos sensoriais do produto, como na formulação do mesmo com sabores de frutas, na estabilidade durante a vida-de-prateleira, além da divulgação dos benefícios do consumo de produtos à base de soja e de probióticos à saúde humana, a fim de levantar expectativas positivas nos consumidores e estimular a compra e consumo destes produtos (Behrens, 2002).

Assim, o objetivo de esta tese foi desenvolver produtos simbióticos a base de extrato hidrossolúvel de soja, com aceitabilidade sensorial pelo público alvo, cuja estabilidade durante a vida-de-prateleira fosse melhorada e suas características funcionais probióticas de resistência às condições drásticas do trato intestinal fossem demonstradas.

Diante o exposto acima, e de posse dos resultados obtidos anteriormente (Mondragón, 2004), foi otimizado um alimento simbiótico fermentado a base de soja nos aspectos sensorial e de estabilidade durante a vida-de-prateleira. Foi aprofundado também o conhecimento dos efeitos probióticos do novo produto funcional. Este estudo foi dividido em cinco fases: *i)* otimização sensorial do alimento fermentado simbiótico

de soja, com diferentes saborizantes idênticos ao natural e edulcorantes; ii) foram realizados estudos de vida de prateleira de produtos elaborados com e sem sacarose, adicionados ou não de polpas de fruta; iii) com o objetivo de melhorar a estabilidade do produto sem adição de estabilizantes foi realizada triagem para selecionar bactérias lácticas (BAL) produtoras de exopolissacarídeos (EPS) *in situ* e realizado estudos cinéticos do comportamento da BAL selecionada e o EPS produzido em extrato hidrossolúvel de soja; iv) foi realizado um estudo dos efeitos das variáveis na estabilidade do produto simbiótico durante a vida-de-prateleira; e finalmente, v) foi testada a funcionalidade dos melhores protótipos de alimento simbiótico de soja através de bioensaios *in vitro* em condições simuladas do trato gastrointestinal humano.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

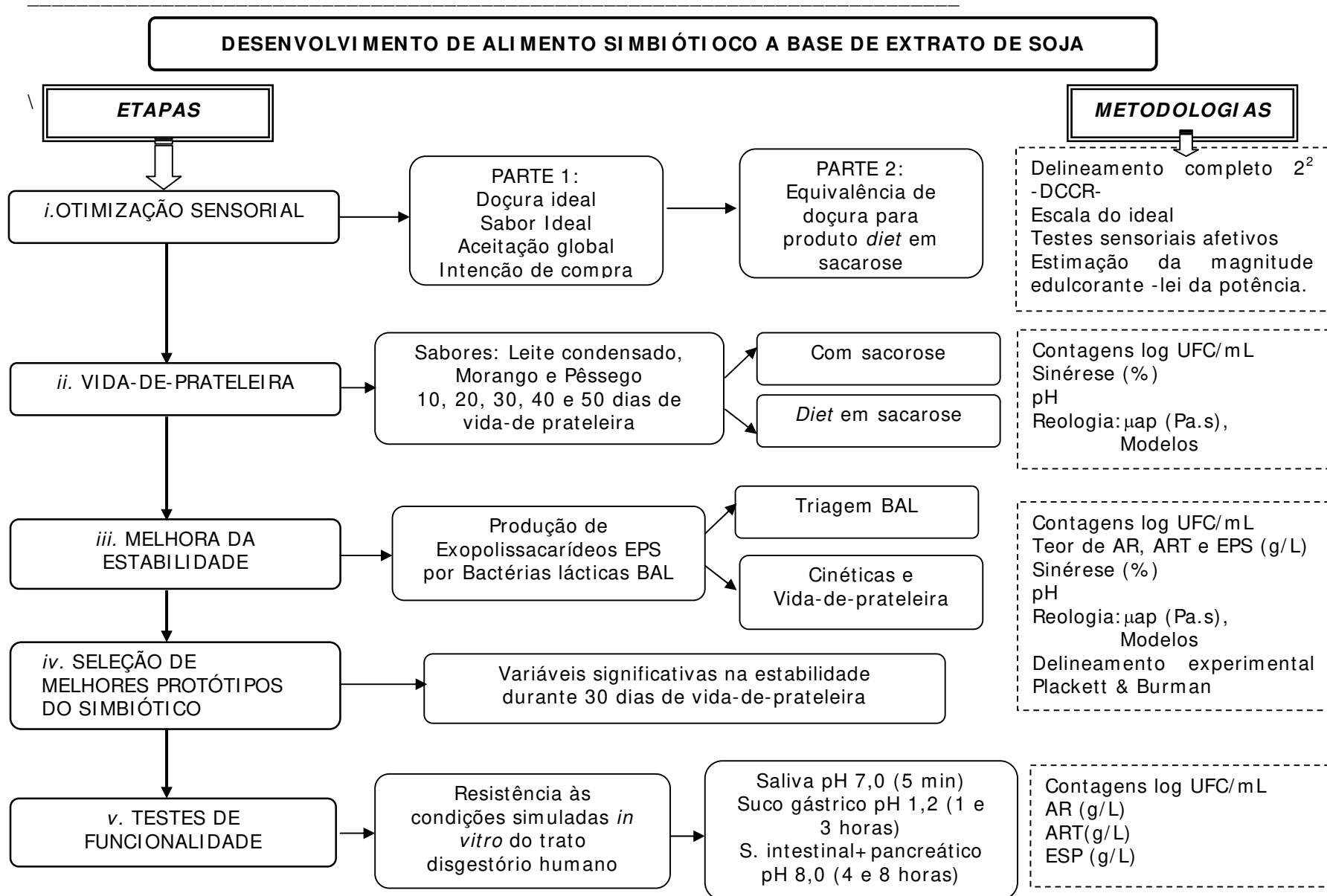
Otimizar sensorialmente um alimento simbiótico a base de soja, estudar e melhorar a estabilidade durante a vida-de-prateleira com exopolissacarídeos, produzidos *in situ* por adição de bactérias lácticas selecionadas, e, realizar testes funcionais *in vitro* de resistência às condições gastrointestinais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar a formulação com diferentes aditivos como saborizantes e edulcorantes numa bebida fermentada de soja contendo probióticos e prebióticos, através de testes sensoriais de escala do ideal, escala de magnitude edulcorante e testes afetivos com o público alvo.
2. Realizar estudos de vida-de-prateleira e observar o comportamento dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e reológicos.
3. Realizar estudos de produção de exopolissacarídeos (EPS) no alimento simbiótico por bactérias lácticas selecionadas a fim de melhorar a estabilidade do produto durante a vida-de-prateleira ou *shelf life*.
4. Estudar o efeito de diversas variáveis na estabilidade do alimento simbiótico durante 30 dias de vida-de-prateleira.
5. Testar a funcionalidade do alimento simbiótico fermentado de soja através da resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal humano com ensaios *in vitro*.

PLANO DE TRABALHO

A continuação são detalhadas as diferentes fases do estudo por capítulos, assim: no Capítulo 1 se apresenta a revisão bibliográfica geral. O Capítulo 2 se divide em duas partes: Parte 1: correspondente à otimização sensorial do produto, por meio de Delineamento Experimental Composto Central Rotacional (DCCR), baseado na doçura e sabor ideal e estudos afetivos de aceitação e intenção de compra por parte do público alvo. A Parte 2 do Capítulo 2, corresponde ao estudo para obter mesma magnitude equivalente de doçura ideal para elaboração do simbiótico na versão *diet* em sacarose pela adição de associação de edulcorantes hipocalóricos. O Capítulo 3 apresenta o estudo do comportamento durante 50 dias de vida-de-prateleira de produtos simbióticos a base de soja, elaborados com ou sem sacarose e adicionados ou não de preparados com pedaços de fruta. No Capítulo 4, apresentam-se os resultados da triagem para seleção de uma BAL produtora de EPS em extrato de soja, as cinéticas de crescimento da BAL selecionada em meio de fermentação com e sem sacarose e comparado com diferentes associações de inóculo de probióticos, assim como, o comportamento durante 25 dias de estocagem. No Capítulo 5, estão descritos os resultados do estudo de avaliação dos efeitos de diversas variáveis na estabilidade do produto simbiótico durante 30 dias de vida-de-prateleira e testes sensoriais afetivos dos melhores protótipos obtidos através de delineamento experimental Plackett & Burman. Finalmente, no Capítulo 6, apresentam-se os resultados correspondentes aos testes de resistências às condições simuladas do trato gastrointestinal humano, *in vitro*, realizados para os melhores protótipos obtidos no Capítulo 5. Todos os capítulos desta tese são apresentados em forma de artigos científicos em língua portuguesa com exceção da Parte 1 do capítulo 2 em inglês. O fluxograma a seguir mostra as etapas e metodologias aplicadas.



CAPÍTULO 1.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

“Para obter algo que você nunca teve, precisa fazer algo que você nunca fez” (Chico Xavier)

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, na Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, considera a alegação de propriedade funcional aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Considera também a alegação de propriedade à saúde aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relações entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

A ANVISA (1999) explica que há tendência do Codex Alimentarius de vários países de disciplinar as alegações sobre as propriedades funcionais dos alimentos ou de seus componentes, como também a segurança de uso com base em evidências científicas. Os princípios gerais do Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados já estabelecem que: a) não se pode apresentar no rótulo atributos de efeitos ou propriedades que não possam ser demonstrados; b) é proibida a indicação de que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas.

No Laboratório de Engenharia Bioquímica, LEB, da Faculdade de Engenharia de Alimentos-FEA, da UNICAMP, desenvolveu-se um alimento funcional à base de extrato de soja contendo bifidobactérias, lactobacilos e prebióticos em simbiose, que gerou o pedido de patente PI0404152-6 (Maugeri, Mondragón & Mukuno 2004). Mondragón (2004) demonstrou que o extrato hidrossolúvel de soja é um meio apropriado para o cultivo de probióticos através da fermentação láctica e de bifidobactérias. Verificou-se que as culturas puras de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81 e *B. longum* BL04 têm ótimo crescimento em extrato de soja, atingindo contagem de células de 10^{12} - 10^{13} UFC/mL. Evidenciou-se que a mistura de *L. acidophilus* LAC4, *B. longum* BL04 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* com e sem FOS, atingiu contagem individual de 10^{10} - 10^{13} UFC/mL, quantidades muito superiores às mínimas exigidas para este tipo de alimento de 10^7 UFC/mL para obter um efeito terapêutico ótimo (Ribka e Kailasapathy, 1995).

Como as bifidobactérias são produtoras de ácido acético (Hou, 2000), as bebidas fermentadas apresentam *off-flavor*, sabor desagradável (Behrens, 2002). Este efeito diminui com a utilização concomitante de lactobacilos e bifidobactérias resultando em um melhor balanço da acidez e um produto sensorialmente mais aceitável. Mondragón (2004) verificou que durante a fermentação do extrato de soja, *B. longum* tanto puro quanto em mistura com lactobacilos apresentou maior produção de ácido láctico (L) que de ácido acético (A), sendo a relação $L/A > 1$. 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. Além disso, verifica-se a necessidade de estudar a viabilidade dos probióticos na bebida fermentada de soja durante o tempo de estocagem, e aplicar diversas tecnologias para preservar a viabilidade e características funcionais.

1.1. Análise sensorial

A avaliação sensorial fornece uma informação integral e rápida sobre a qualidade de um produto, determina a aceitação por parte do consumidor e em consequência a compra do produto (Moraes,1993); um alimento pode apresentar boas características nutricionais, mas não é suficiente para ser bem aceito (Behrens, 2002). Entre os métodos sensoriais disponíveis para se avaliar a aceitação de um produto pelo consumidor, a escala hedônica não estruturada de 9 centímetros é um dos métodos mais utilizados devido à confiabilidade e validade de seus resultados, bem como sua simplicidade em ser utilizada pelos provadores (Stone e Sidel, 2001). A escala do ideal, a escala de equivalência de doçura e o poder edulcorante são técnicas sensoriais que atualmente vem sendo aplicadas no desenvolvimento de novos produtos de apelo *light*, *diet* e *low-carb* (Cardoso *et al.*, 2004)

Em testes que envolvem mais de um produto ou variáveis, outras análises estatísticas como o teste t, a análise da variância (ANOVA) e a análise de superfícies de resposta são empregadas na análise dos dados (Mac Fie & Thomsom, 1988, Rodrigues e Lemma, 2005).

1.2. Expectativas de aceitação do extrato hidrossolúvel de soja e derivados.

Segundo publicação da empresa Danisco (2004), a qualidade e a diversidade dos produtos e as escolhas dos consumidores direcionarão o crescimento dos mercados *light*, *diet* e de funcionais. Deve-se prestar atenção que dietas *low-carb* (baixo conteúdo de carboidratos) criarão um novo segmento e novas oportunidades de mercado. Além disso há uma tendência mundial pelo consumo de *wellness drinks* ou bebidas saudáveis por parte dos consumidores de bom nível educacional e conscientes da importância de dietas saudáveis (Behrens *et al.*, 2004).

O extrato hidrossolúvel de soja tem como limitante o gosto adstringente devido a compostos voláteis de baixa massa molecular como o n-hexanal, um sabor desfavorável de leguminosa, produto da ação das lipoxigenases (Murti *et al.*, 1993, Hou *et al.*, 2000), que por tratamento térmico são inativadas. Os fatores antitripsina e hemaglutinina indesejáveis são termosensíveis, sendo facilmente eliminados com tratamento térmico. O problema de possuir um alto teor de α -D-galactosil-oligossacarídeos, pseudo-açúcares indigeríveis pelo organismo humano causando flatulências, pode ser solucionado através de diversas técnicas de processamento e/ou fermentação (Hou *et al.*, 2000). A fermentação tem sido extensivamente

empregada para desenvolver vários produtos e superar essas limitações, por exemplo, na produção de queijo de soja e tipos de iogurte (Chou e Hou, 2000). Do ponto de vista sensorial, a fermentação do extrato de soja por *L. acidophilus* e *L. casei* contribui para a melhoria não somente do sabor, mas também do aroma do produto. A atividade proteolítica desses microrganismos principalmente *L. casei*, é responsável pela formação de precursores do aroma e sabor, contribuindo para a eliminação do *off flavor*.

Behrens (2002) estudou a aceitação a partir de um Mapa Interno de Preferência, para bebidas de soja fermentadas com *L. casei* ou *L. acidophilus* ou uma mistura comercial contendo *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* (BIO-RICH probiótico®), suplementadas com sacarose e lactose. A mistura comercial com sacarose obteve os melhores resultados em termos de aceitação. O produto combinou baixa acidez com um conjunto de notas doces aromáticas. Quando utilizados os sabores abacaxi e goiaba, obteve-se alta aceitação pelos consumidores mostrando, portanto, alto potencial de mercado. Os sabores de morango, coco e kiwi obtiveram boa aceitação. O produto com sabor avelã foi reprovado. Este estudo demonstrou ser possível a melhoria da qualidade sensorial além dos nutricionais e de saúde, aumentando o potencial de seu sucesso no mercado consumidor. Neste trabalho as crenças e a atitude do consumidor em relação aos produtos derivados da soja foram avaliadas indicando que: o consumo de soja e produtos derivados ainda é baixo; o iogurte de soja é praticamente desconhecido; uma proporção reduzida dos entrevistados achou que o iogurte de soja teria um sabor ruim e a maioria demonstrou atitude neutra com relação a essa afirmativa. Isto indica uma oportunidade de mercado, e ainda deve-se considerar que as alegações de caráter nutricional e de saúde geraram alta expectativa e intenção de compra entre os consumidores, sendo a maior proporção de consumidores positivamente influenciada pelas alegações aumentando a aceitação do produto em relação ao teste cego.

1.3. Funcionalidade da soja e derivados

Considerando-se que a soja é uma leguminosa abundante no Brasil, uma fonte apreciável de proteínas e lipídeos, e possui boas características químicas e nutricionais, têm-se feito importantes esforços para o seu aproveitamento na obtenção de produtos mais atrativos, aceitáveis e apetecíveis. A soja é considerada como um alimento funcional, pois possui substâncias que ajudam a diminuir o risco de certas doenças. A soja pode ser usada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (Hasler, 1998, Tamime & Robinson, 2001, Chiarello, 2002, Donkor & Shah, 2008), pela composição e comportamento físico-químico, e é uma alternativa de consumo para pessoas que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela leite bovino

(principalmente lactentes) (Wang et al., 1994, Pelto et al., 2000, Mondragón, 2004), além de conter oligossacarídeos naturais (rafinose e estaquiose) considerados como prebióticos ao estimular o crescimento de probióticos (Hou et al., 2000).

A presença de fatores bifidogênicos no extrato de soja, como os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, assim, como outros açúcares (sacarose, frutose, glicose, galactose), vitaminas do complexo B e fontes de nitrogênio das proteínas hidrossolúveis da soja, fazem do extrato hidrossolúvel de soja um meio complexo e ótimo substrato para crescimento das bifidobactérias (Chiarello, 2002, Chou e Hou, 2000, Hou et al., 2000, Scalabrini et al., 1998).

Donkor e Shah (2008) estudaram a produção de β -glucosidase e a hidrólise das isoflavonas (fitoestrogênios) por *L. acidophilus*, *B. lactis* e *L. casei* em extrato de soja. Todas as bactérias produziram β -glucosidase, e as isoflavonas β -glucosiladas foram hidrolisadas para isoflavonas agliconas. O incremento de isoflavonas agliconas no extrato de soja fermentado é desejável para melhorar a sua funcionalidade biológica.

O extrato de soja e os seus isolados protéicos possuem diversas propriedades funcionais como emulsificantes, espumantes e espessantes e também como agentes gelificantes. Aproximadamente 90% das proteínas da soja são globulinas e as que precipitam a pH 4,5 são chamadas de glicininas. Ambas são muito complexas, consistindo de diversas subunidades que facilmente se associam e dissociam sob diferentes condições de pH, força iônica e tratamento térmico (Braga, 2006). Daí que as propriedades reológicas dos fermentados a base de extrato de soja sofram diversas variações de acordo com as condições ambientais do meio, modificando a funcionalidade das proteínas, observadas como: mudanças na viscosidade aparente, consistência, escoamento, tensão de deformação, sinérese entre outros.

1.4. Funcionalidade dos simbióticos (probióticos e prebióticos)

Alimentos que contêm probióticos e prebióticos são denominados simbióticos (Mattila-Sandholm et al. 2002, Crittenden et al. 2001, Ferreira e Teshima, 2000, Roberfroid et al., 1998, Ziemer e Gibson, 1998).

1.4.1. Probióticos

Guarner e Schaafsman (1998) definiram os probióticos como: microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos na saúde do indivíduo .

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 metabolitos produzidos (Ferreira e Teshima, 2000). Bactérias do

gênero *Lactobacillus* atuam no intestino delgado, ao passo que o grupo bifidogênico atua no intestino grosso, notadamente no colon. A reintrodução destes grupos microbianos no hospedeiro é feita por meio de administração de espécies selecionadas, que deverão estar em números elevados (maior de 10^7 UFC.mL⁻¹) e viáveis no momento do consumo, (Ribka & Kailasapathy, 1995). 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 microbiota 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 entre outros. (Tamime et al., 1995). Os lactobacilos diminuem a atividade enzimática fecal, reduzem a diarreia associada a antibióticos em crianças, auxiliam no tratamento e prevenção de rotavírus e diarreias agudas em crianças e no tratamento da diarreia recorrente causada por *Clostridium difficile*, modula a resposta imune, alivia os sintomas de dermatite em jovens, modulam a microbiota intestinal e incrementam a excreção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes (Saarela et al., 2000).

É reportado que problemas como a disbiose intestinal, definida como desordem no trato gastrointestinal devido ao desequilíbrio das bactérias intestinais (Carvalho, 2001), e a obesidade (Behrens, 2002) aumentaram bruscamente nos últimos anos. A dieta, consumo de drogas, situações de estresse, tratamentos quimioterápicos, idade, tempo de trânsito intestinal, pH intestinal, disponibilidade de material fermentável, e outras situações, provocam diferentes tipos de problemas gastrointestinais como a disbiose intestinal (Ferreira e Teshima, 2000)

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 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* além de espécies de *Bifidobacterium*. (Ferreira e Teshima, 2000)

1.4.2. Prebióticos

Segundo Chou e Hou (2000), é difícil a manipulação de bactérias bífidas por serem anaeróbias e não tolerarem bem o ambiente ácido, sendo o emprego de prebióticos uma alternativa para o seu aumento no trato gastrointestinal (Gibson, 1994).

Segundo Pineiro et al (2008), os prebióticos foram originalmente definidos por Gibson e Roberfroid (1995) como ingredientes alimentícios no digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento de um ou um número limitado de bactérias no colon e melhorando a saúde do hospedeiro Uma definição mais recente

estabelece que um prebiótico é um ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal e confere benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro (Gibson et al, 2004).

Outros autores explicam que os prebióticos são substâncias não metabolizáveis no intestino delgado, e que, chegando ao intestino grosso, são seletivamente utilizados como fonte de carbono pelas bactérias bífidas ali presentes. Para um ingrediente alimentar ser considerado prebiótico, não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal, oferecendo um efeito benéfico ao hospedeiro; deve promover seletivamente o crescimento e/ou estimular a atividade metabólica de um número limitado de bactérias autóctonas promotoras de saúde e não o de outras bactérias, alterando a microbiota colônica em favor de uma composição mais saudável (Yun, 1996, Gibson e Roberfroid, 1995, OMGE, 2008). O principal objetivo de administrar prebióticos é favorecer o desenvolvimento do gênero *Bifidobacterium* (Crittenden e Playne, 1996).

Em 2008 foi publicado o relatório do Encontro técnico da FAO sobre Prebióticos que propôs uma definição mais abrangente para incluir os novos prebióticos e para mostrar de forma mais precisa a compreensão atual sobre a ecologia da microbiota humana. A definição revisada é a seguinte: Um prebiótico é um componente alimentar não viável que confere benefício à saúde do hospedeiro associado com a modulação da sua microbiota (Pineiro, 2008).

Os ingredientes alimentares que mais atendem a esses requerimentos, até o presente momento, são os oligossacarídeos (Pinheiro, 2002, Gibson, 1994).

Os oligossacarídeos, tais como os frutooligossacarídeos (FOS- Figura 1a), β -D-frutanos, Galactooligossacarídeos (GOS), transgalactooligossacarídeos (TOS), isomaltoligossacarídeos (IMO), mananoligossacarídeos (presente na parede celular de leveduras) e inulina cumprem com as condições dos prebióticos (Fooks et al., 1999). Um prebiótico pode ser uma fibra, mas no necessariamente uma fibra é um prebiótico (Pineiro et al, 2008).

A síntese de oligossacarídeos é muito estudada e existem patentes japonesas, brasileiras e européias abordando sua produção e utilização. Os oligossacarídeos de grau alimentar podem ser produzidos química ou enzimaticamente, como a síntese enzimática a partir de açúcares simples pela reação de transglicosilação de plantas ou de origem microbiológica (Ekhart e Timmermans, 1996). No cólon, os FOS são rapidamente fermentados pela microbiota benéfica, principalmente bifidobactérias. Estas, por sua vez, inibem, especificamente, o crescimento de bactérias prejudiciais, tais como *Clostrideos*, e tal alteração na composição da microbiota intestinal pode ser benéfica para a saúde intestinal e para a sensação de bem-estar (Yun, 1996).

Há também uma variedade emergente de novos prebióticos que incluem: pectinolisaccharides, lactosucrose, açúcares alcoóis, glucooligosacárideos, levanas, amidos resistentes, xilossacárideos e oligossacárideos da soja. Estas substâncias estão sendo estudadas *in vitro* em diversos graus, como estudos de alimentação animal, mas raramente em estudos com alimentação humana. Novos compostos para a dieta humana que se encaixam dentro da categoria do regulamento Europeu de alimentos inovadores requereram de legislação para avaliar os níveis toxicológicos e de segurança antes de serem incluídos como produtos alimentícios (Pineiro et al., 2008). Os oligossacárideos presentes em algumas leguminosas como a soja são a rafinose e estaquiose (Figura 1b) que se caracterizam por serem indigeríveis pelo humano, e com efeito prebiótico (Scalabrini et al., 1998).

Recentemente, tem-se também atribuído efeitos prebióticos à polidextrose (Figura 2). Esta substância é um polissacarídeo sintetizado pela polimerização randômica da glicose, na presença de quantidades menores de sorbitol e um catalisador ácido adequado, sob alta temperatura e vácuo parcial. A polidextrose é parcialmente fermentada no intestino grosso, mas não é digerida nem absorvida no intestino delgado, e em sua maior parte é excretada nas fezes, tendo efeitos fisiológicos similares com as fibras dietárias: conduz ao crescimento de microbiota favorável, reduz a microbiota putrefativa, produz ácidos graxos de cadeia curta e suprime a produção de metabólitos carcinogênicos (Jie et al., 2000).

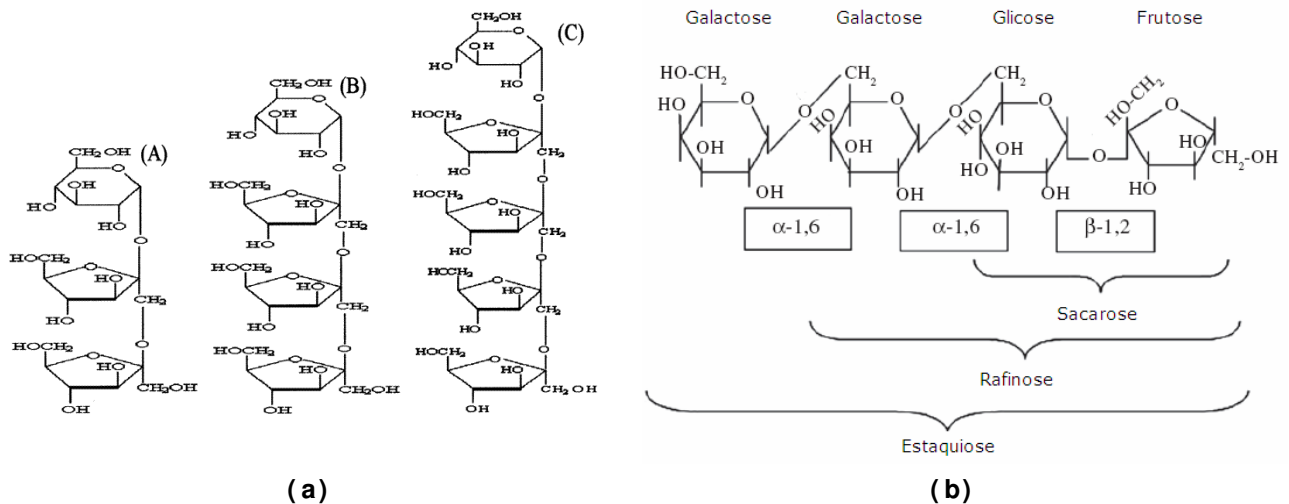


Figura 1. (a) Estrutura molecular de frutooligosacárideos (A) 1-kestose (B) nistose e (C) frutofuranosil nistose (Yun, 1996). (b) Estruturas moleculares dos α -galactosídeos rafinose e estaquiose (LeBlanc et al., 2004).

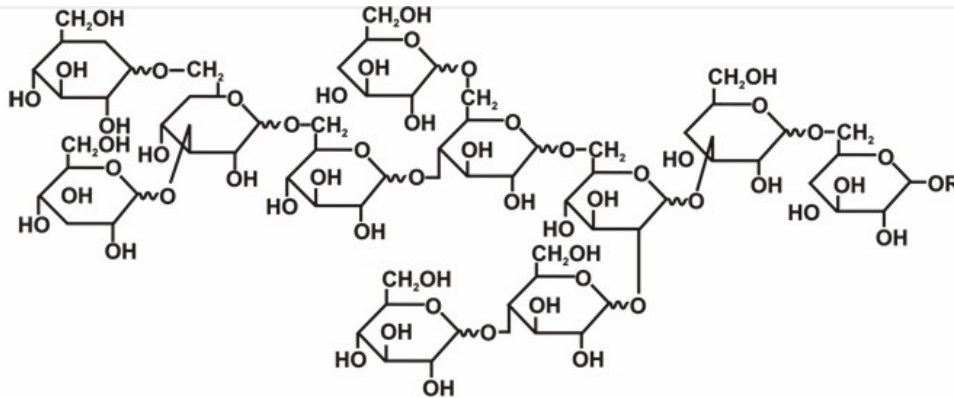


Figura 2. Estrutura molecular da polidextrose (PRODIET, 2009)

1.4.3. Simbióticos

Dada a potencial sinergia entre probióticos e prebióticos, os alimentos que contém uma combinação destes ingredientes são freqüentemente denominados como simbióticos. O termo foi originalmente empregado em inglês *synbiotic*, aonde, *syn* vem de sinergia e *biotic* para a vida (Mattila-Sandholm et al., 2002)

Como o conceito de simbióticos é relativamente novo, não existem muitos estudos específicos da interação entre probióticos e prebióticos (Saarela et al., 2000). 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 e Teshima, 2000). Mattila-Sandholm et al. (2002) destacam ainda que a evolução no desenvolvimento de simbióticos integrados precisa além de estudos envolvendo sinergias específicas entre ingredientes probióticos e prebióticos no trato gastrointestinal (TI), também o estudo de prebióticos que protejam os probióticos durante a manufatura, estocagem, formulação e trânsito gastrointestinal, que controlem a liberação de probióticos em locais específicos no TI e além disso que promovam uma fermentação lenta e com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no cólon distal. A fermentação de carboidratos por bactérias anaeróbicas como bifidobactérias, lactobacilos, estreptococos e enterobactérias, produzem AGCC que diminuem o pH no colon distal e inibem o crescimento de bactérias patogênicas, tendo como conseqüência a redução da fermentação putrefativa causada por essas bactérias.

A adição de fatores bifidogênicos na dieta humana, normalmente favorece o aumento na ocorrência e no número de bifidobactérias isoladas do material fecal, sugerindo que a suplementação na dieta deveria ser implementada (Crittenden et al., 1996).

Hidaka et al. (1989) verificou que administrando 8,8 g/dia de frutooligosacarídeos aumentaria a produção de ácidos graxos. Mackellar & Modler (1989) constataram que a

bifidobactéria possui enzimas hidrolíticas conhecidas como inulinase (β -2,1-D-frutano-frutano-hidrolase), que hidrolisam os frutooligossacarídeos, ao contrário das enzimas digestivas de humanos e animais.

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que *B. longum* tem dificuldades de metabolizar polímeros de cadeia longa, tais como a inulina. *B. adolescentis* metabolizou a inulina de forma mais eficaz de que *B. longum*, mas *B. thermophilum* apresentou melhor crescimento e atividade de inulinase. *B. infantis* são capazes de utilizar cadeias curtas de FOS, porém são incapazes de metabolizar polímeros de cadeias longas, com grau de polimerização maior que 25. Modler (1994) verificou que a adição de frutooligossacarídeos à dieta humana (15 g/dia), provocou um acréscimo de 10 vezes na população de bifidobactérias no intestino grosso, houve uma redução de 0,3 unidades no valor de pH intestinal e decréscimo na contagem de enterobactérias. Chou e Hou (2000) verificaram que durante a adição de diferentes sacarídeos e oligossacarídeos durante a fermentação do extrato de soja, só o isomaltooligossacarídeo obteve efeito estimulante ao crescimento de *B. longum*, a contagem aumentou de 8,50 a 8,86 (log UFC.mL⁻¹) após 48 horas de fermentação. Mondragón (2004) obteve contagens para *B. longum*, na presença dos lactobacilos *L. acidophilus* e/ou *L. paracasei* subsp. *paracasei*, de aproximadamente 10 log UFC.mL⁻¹ entre 16 e 24 horas de fermentação com adição de 2,5 g/L frutooligossacarídeos influenciado pela quantidade de inóculo (maior ou igual a 6 log UFC.mL⁻¹).

Os probióticos *B. longum* e *L. paracasei* subsp. *paracasei* puros e associações de *L. acidophilus* e bifidobactéria e/ou *L. paracasei* subsp. *paracasei*, tem crescimento aceitável em extrato de soja, gerando relações simbióticas, como a disponibilidade de proteínas e a redução da acidez do meio por *L. acidophilus*, e a disponibilidade de açúcares pelas bifidobactérias devido à sua atividade de β -galactosidase, fortalecendo o crescimento de *L. acidophilus*. Os probióticos e misturas consomem os mono, di e oligossacarídeos provenientes tanto da soja como dos FOS adicionados, produzindo principalmente ácido láctico com leve produção do acético (LA > 1, ácido láctico/ácido acético). Sensorialmente isto é benéfico, tanto pela diminuição do gosto original da soja e do gosto acético, quanto pela melhora na digestibilidade (Mondragón, 2004, Hou et al., 2000).

1.5. Polissacarídeos

Os polissacarídeos constituem um amplo e diverso grupo de polímeros, cuja funcionalidade individual é determinada por características, tipos de ligações glicosídicas, graus de ramificação e composição química. Os polissacarídeos são os componentes da demanda vital de células mais versáteis para o armazenamento de componentes, formação de estruturas e caracterização celular. Ao mesmo tempo, esta diversidade oferece uma extensa aplicação

destes polímeros na indústria, cobrindo desde o consumo massivo dos simples componentes até sua exploração como promotores de saúde e ainda como compostos farmacêuticos (Korakli et al., 2002).

Os polissacarídeos podem ser utilizados como aditivos em produtos como agentes de corpo e para substituição parcial ou total de gordura, com o intuito de suprir a perda de textura além de evitar a separação de fases. E também atuam como estabilizantes e espessantes, devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade do sistema podendo, inclusive, formar géis (Braga, 2006)

Os polissacarídeos são classificados em estruturais e não estruturais. Os primeiros formam a estrutura de plantas, insetos ou bactérias (celulose, pectina, quitina e murina). Polissacarídeos não estruturais (amido, glicogênio e inulina) geralmente servem como reserva energética em eucariotas. Estes polissacarídeos podem ser sintetizados não somente por plantas e algas, mas também por uma ampla variedade de microrganismos incluindo bolores, leveduras e bactérias, cujo papel nem sempre foi definido. Baseados na localização, os polissacarídeos microbianos podem ser divididos em: polissacarídeos encapsulados (PSC) associados com a superfície celular, os quais se supõe que existam para melhorar as características virulentas de patogênicos como o *Streptococcus pneumoniae*; e polissacarídeos extracelulares (EPS) secretados no meio ambiente (Korakli e Vogel, 2006).

1.6. Exopolissacarídeos EPS

Segundo a sua composição, os EPSs podem ser classificados em homo (HoPSs) e heteropolissacarídeos (HePSs). HoPSs são constituídos de um único monossacarídeo (a maioria frutose ou glicose) e são usualmente produzidos em grandes quantidades acima de 40 g/L de sacarose pela ação das glicosiltransferases (Monsan et al. 2001, Korakli et al., 2003). Os HePSs são compostos de dois a oito monossacarídeos (a maioria de glicose, galactose, ramnose e frutose) e são produzidos em quantidades superiores a 2 g/L (De Vuyst e Degeest, 1999, Bergmaier et al., 2005).

Dentro do genoma da maioria de organismos, 1-3% dos genes codificam glicosil-hidrolases ou glicosiltransferases. Em membros da microbiota do intestino humano, como *Bacteroides fragilis* e *Bifidobacterium longum*, genes codificam enzimas carboidrato-ativas em níveis reportados de 4,8 e 3,6% do genoma, respectivamente (Davies et al., 2005). HoPSs de bactérias estão compostos de monossacarídeos como a glicose (glucana) ou frutose (fructana) e são sintetizados a partir de glicose através da ação de uma enzima pertencente ao grupo das glicosiltransferases (*glucansucrases*). As enzimas envolvidas na biosíntese de glucanas e frutanas são denominadas também glicosiltransferases (GTFs) e frutossiltransferases (FTFs),

respectivamente (Hernalsteens, 2006). O metabolismo da sacarose via FTF ou GTF não só serve para a formação de EPS como também afeta o balanço de oxido-redução e a energia de geração (Korakli e Vogel, 2006). A produção depende da espécie usada, da concentração de sacarose e das condições de crescimento. Além de sintetizar polissacarídeos de alta massa molecular, as glicosiltransferases catalisam também a produção de oligossacarídeos (Hernalsteens, 2006).

Muitas bactérias lácticas BAL- possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos quando fermentadas em meios apropriados (Cerning, 1990, Smitinont et al., 1999, Turnier et al., 2000, Gorret et al., 2003, Champagne, et al., 2006, Grattepanche et al., 2007). Apesar do importante papel das BAL na indústria de alimentos, recentemente era dada pouca atenção à produção de EPS com grau alimentício por estes microrganismos (Smitinont et al., 1999).

As BAL produtoras de EPS são algumas vezes responsáveis pela turbidez e viscosidades indesejáveis em produtos alimentícios como o vinho, a cidra e a cerveja (Smitinont et al., 1999). Estes polímeros podem exercer efeitos negativos associados com a degradação de alimentos, por exemplo, o entupimento de tubulações por dextranas e levanas na indústria açucareira, formação de filmes em bebidas doces com datas de validade vencidas, assim como, a formação de biofilmes de mutana, a qual está relacionada à adesão da microbiota oral causadora das cáries na superfície dos dentes. No entanto, em muitos casos os polissacarídeos extracelulares de BAL podem oferecer vantagens numa variedade de produtos alimentícios fermentados (Cerning, 1990, Korakli e Vogel, 2006). Estes EPS exibem características interessantes que se estendem desde a melhora na textura e palatabilidade até o incremento da vida-de-prateleira de alimentos, além de oferecer propriedades promotoras da saúde (Korakli et al., 2002, Tieking e Gänzle, 2005).

As dextranas sintetizadas por *Leuconostoc mesenteroides* foram uns dos primeiros biopolímeros produzidos em escala industrial e que tem grande aplicação na medicina, tecnologias de separação e biotecnologia. Nas últimas décadas, outros EPS de origem microbiana têm sido descritos como substituto dos polissacarídeos de plantas. Xantana de *Xanthomonas campestris* e gelana de *Sphingomonas paucimobilis* são exemplos de polissacarídeos produzidos em grandes quantidades por bactérias não lácticas. Estes EPSs têm diferentes aplicações em alimentos e não alimentos (Sutherland, 1998).

Dada a inocuidade natural intrínseca da maioria das BAL, surge o grande interesse em estudar novos EPSs com aplicações clínicas e em alimentos. A grande maioria dos EPS produzidos por *Lactobacilli* foram isolados de produtos lácticos como os leites fermentados, iogurte e grãos de kefir (De Vuyst e Degeest, 1999) e outras espécies produtoras foram isoladas de cereais fermentados e do trato intestinal (Tieking et al., 2003, Tieking et al., 2005b). A produção de polissacarídeos liberados extracelularmente por algumas BAL tem

despertado interesse nos últimos anos por suas propriedades reológicas: prover textura em produtos alimentícios (Cerning e Marshall, 1999, Savadogo et al., 2004), viscosidade e retenção de umidade em alimentos fermentados, eliminando problemas como a sinérese, freqüente neste tipo de produtos (Ruas-Madiedo et al., 2006, Mondragón-Bernal et al., 2007).

Historicamente a natureza dos produtos fermentados varia de uma região para outra, pois dependem da microbiota local, a qual reflete as condições climáticas do lugar. Assim, em leites fermentados tradicionais de lugares frios prevalecem bactérias mesófilas tais como *Lactococcus* e *Leuconostoc spp*, enquanto bactérias termófilas, que incluem especialmente *Lactobacillus* e *Streptococcus*, prevalecem em regiões com climas quente, subtropical ou tropical (Kurman, 1994, Savadogo et al., 2004).

Em muitos casos pode ser conveniente usar bactérias lácticas produtoras de EPS como cultivos *starter*, no lugar de utilizar aditivos como melhoradores de textura, estabilizantes, emulsificantes, gelificantes ou agentes anti-sinérese em alimentos fermentados, (Smitinont et al. 1999). No concernente à segurança alimentar, pode ser interessante eliminar o uso desses aditivos e substituí-los por EPSs produzidos por BAL nas culturas *starter*, e, dado que os EPSs são produzidos *in situ* durante o processamento do produto, estes não são considerados como ingredientes (Turnier et al., 2000, Tiekling et al., 2003).

Os EPS interagem com as micelas de caseína, melhorando a textura do iogurte, incrementando a viscosidade e diminuindo a susceptibilidade à sinérese (Hess et al. 1997, Grattepanche et al., 2007). Misturas de culturas de bactérias lácticas mesófilas contendo *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* são geralmente utilizadas na fabricação de queijo fresco para produção de ácido, compostos de aroma e de textura (Lucey, 2003, Grattepanche et al., 2007).

Algumas espécies de BAL tem efeito benéfico à saúde em geral, proporcionando balanço da microbiota benéfica no intestino humano (Salminen et al., 1999), além das funções tecnológicas (Tannock et al., 2000, Savadogo et al., 2004). Os lactobacilos são comumente empregados como *starters* na fabricação de produtos lácteos, sendo o caso de *L. rhamnosus ssp* que é uma espécie produtora de EPS com potencial probiótico (Dupont et al. 2000, Macedo et al. 2002, Champagne et al. 2006). Outras espécies com potencial de produção de EPS são *Lactococcus lactis* spp (Turnier et al., 2000, Champagne et al. 2006, Grattepanche et al. 2007); *Leuconostoc* spp., *L. fructosum*, *L. mesenteroides* spp (Santos et al., 2000, Hernalsteens, 2002, Champagne et al., 2006); *Pediococcus acidilactici* (Smitinont et al., 1999); e *Proponibacterium* como *P. freudenreichii* spp (Jan et al. 2000, Gorret et al. 2003, Tharmaraj e Shah, 2004, Leverrier et al. 2005), tendo este último um crescente interesse pelos seus efeitos estimulantes sobre probióticos e por ser também produtores de vitamina B12 (Tharmaraj e Shah, 2004).

Propionibactérias presentes em produtos lácteos são microrganismos de grau alimentício produtoras de EPS, mas esses EPS têm sido pouco estudados em relação aos de bactérias lácticas. Crow (1988) isolou polissacarídeos produzidos por *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ATCC9614, e determinou sua composição: galactose (39%), glicose (4%), metilpentose (39%). Gorret e colaboradores (2003) estudaram a produção de EPS por *P. acidi-propionici* SSP, esses EPS não apresentaram capacidade de gelificação, podendo ser usados para formar fluidos mais densos e viscosos.

Segundo Champagne et al. (2006) é possível controlar a população final de bactérias produtoras de EPS, ou de aroma, por meio do ajuste do inóculo das culturas, dado que maiores níveis de inóculo afetam positivamente o aroma e a viscosidade de produtos lácteos. A temperatura de fermentação teve efeito significativo positivo sobre a viscosidade aparente, no entanto ocorreu maior sinérese. Na faixa de 23,5 a 36,5 °C, temperaturas mais baixas promoveram o crescimento de *Leuconostoc* e *L. lactis* ssp. *cremoris*, enquanto altas temperaturas favoreceram *L. rhamnosus* e *L. lactis* ssp. *lactis*, sendo estes últimos associados à produção de EPS e incremento da viscosidade.

Para *Lactococci*, Ruas-Madiedo et al. (2002) sugerem que, uma população superior a 10^8 UFC.mL⁻¹ é necessária para que os cultivos produtores de EPS afetem significativamente a textura de leites fermentados. Para *L. rhamnosus*, aumentos significativos na viscosidade aparente em pH 6,0 só foram notados quando a população foi superior a 10^9 UFC.mL⁻¹ (Macedo et al., 2002). Segundo Beal et al. (1999), um pH final menor levou ao aumento na viscosidade do iogurte devido à formação de um gel firme resultado da coagulação ácida das micelas de caseína em pH baixo e/ou maior produção de EPS por *L. rhamnosus*.

A partir de produtos fermentados tailandeses, Smitinont et al. (1999) isolaram duas espécies de *Pediococcus pentosaceus* que produziam altas quantidades de EPS a partir da fermentação em meio MRS enriquecido com sacarose. De 104 linhagens isoladas de BAL, cinco *coccus* foram capazes de produzir EPS em meio líquido, os quais foram identificados como *Pediococcus pentosaceus*. *P. pentosaceus* espécies AP-1 e AP-3 sintetizaram EPS em alta produção. Com base na composição de açúcares, análise de metilação e por espectroscopia nuclear de ressonância magnética, os dois EPSs mostraram pertencer ao mesmo tipo de dextrana. O EPS de *P. pentosaceus* AP-3 mostrou ter um maior grau de ramificação e uma maior massa molecular em relação ao outro.

Segundo Grattepanche et al. (2007), a produção de EPS por culturas combinadas foi 3 vezes menor que em culturas puras. A quantidade obtida por Cerning (1990) de EPS de *L. lactis* subsp. *lactis* foi de 100-600 mg/L e por Savadogo et al. (2004) de EPS de *Streptococcus thermophilus* em meio MRS, substituindo glicose por lactose (75 g/L), foi de 814 mg/L. Macedo

et al. (2002) obtiveram até 2775 mg/L de EPS de *L. rhamnosus* RW-9595M em meio mínimo basal composto por soro e extrato de levedura enriquecido com vitaminas, sais e aminoácidos. No entanto, a comparação desses resultados é difícil, pois diferentes técnicas de extração e quantificação de EPS foram utilizadas em cada um dos casos por cada autor, somado ao fato de que em meios complexos, como o extrato de soja, existe interferência por outros componentes de difícil separação durante a análise (Goh et al. 2005).

Segundo Macedo et al. (2002), a produção de EPS por bactérias lácticas é influenciada pela composição do meio de crescimento, particularmente de aminoácidos, minerais, vitaminas e bases nitrogenadas, a qual está relacionada à produção de biomassa, havendo exceções. Assim, diversas tentativas para aumentar a produção de EPS, como alteração da composição do meio (fontes de carbono, temperatura e pH) têm sido realizadas. Sais de Mg^{2+} e Mn^{2+} são fatores essenciais para o crescimento de lactobacilos e que melhoram a produção de EPS ao menos através da promoção do crescimento. O Mg^{2+} , por exemplo, influencia na atividade da enzima fosfoglucomutase, que participa na biossíntese de EPS, catalisando a transferência de grupos fosfato entre os carbonos C1 e C6 da glicose (Macedo et al., 2002). Assim, o extrato hidrossolúvel de soja, por ser um meio complexo, rico em aminoácidos, vitaminas e sais minerais (~216 mg/L de Mg^{2+} e ~2,68mg/L de Mn^{2+} (NEPA, 2006), poderia ser um meio apropriado para a formação de EPS por bactérias lácticas e superior ao leite bovino integral que possui 100mg/L de Mg^{2+} e traços de Mn^{2+} (NEPA, 2006), quantidades inferiores ao extrato de soja.

1.7. Análise de Exopolissacarídeos

Diferentes métodos para a determinação de EPS têm sido desenvolvidas e utilizadas por muitos pesquisadores nas últimas duas décadas envolvem a combinação de técnicas para isolar, purificar e quantificar os EPS num meio de cultura (Dubois et al. 1956, Cerning 1990, Doco et al. 1991, Azeredo e Oliveira, 1996, Marshall e Rawson 1999, De Vuyst e Degeest, 1999, Tuinier et al. , 2000, Dupont et al., 2000, Gorret et al., 2003, Goh et al., 2005). Algumas das técnicas utilizadas para isolar e/ou purificar EPS incluem cromatografia de exclusão molecular do tipo permeação em gel (GPC), cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, diafiltração, centrifugação, diálise, ultrassom e liofilização.

As técnicas para precipitação de EPS incluem a adição de etanol, acetona, propanol, isopropanol, bromato cetiltrimetilamonio (CTAB) e 3,5,6-trifenil-2,3,5,6-tetraza biciclo-1-hexeno, comercialmente conhecido como Nitron (Azeredo e Oliveira, 1996). Em meios de cultura que contêm proteínas, o ácido tricloroacético (TCA) e tratamentos enzimáticos são empregados comumente para precipitar e hidrolisar as proteínas, respectivamente. Em

seqüência ao isolamento e purificação, a quantificação dos EPS emprega geralmente métodos de determinação de carboidratos totais como o método fenol sulfúrico (Dubois et al. 1956).

Muitas destas análises são suficientes para a determinação dos teores de EPS em meios de cultura quimicamente definidos. Um problema comum na quantificação de EPS é a presença de carboidratos de baixo peso molecular (ex. lactose, glicose, etc.) os quais chegam a ser insolúveis em etanol, e conseqüentemente são incluídos na análise de EPS. Nos meios complexos contendo leite, os valores de EPS são imprecisos, dado que os componentes não-EPS presentes no meio freqüentemente interferem com a análise (Cerning, 1990). Durante a fermentação do leite por BAL, o ácido láctico produzido causa agregação das partículas de caseína levando à formação de uma rede altamente complexa de proteínas e EPS. Este gel apesar de frágil proporciona que células bacterianas, lactose e outros componentes menores fiquem presos (Goh et al. 2005). A separação cuidadosa do EPS dos componentes não-EPS, particularmente, proteínas, lactose e células se faz necessária, já que a inclusão de cada um desses componentes pode influenciar os resultados dos métodos químicos empregados para a total determinação de carboidratos (Cerning, 1990). Entre as dificuldades encontradas, as enzimas proteolíticas que são usadas para a hidrólise de proteínas, algumas dessas enzimas parecem possuir atividade de glucanase e alguns métodos não levam em consideração a contribuição total de carboidratos nas amostras controle (brancos), além das forças G de centrifugação aplicadas em vários estudos não são apropriadas. De forma geral os fatores significativos em cada etapa para a determinação de EPS incluem (Goh et al., 2005): o uso de enzimas proteolíticas em meios de cultura a base de leite ou outras proteínas complexas, a precipitação de EPS com etanol, sendo 70% o ótimo para precipitar o EPS mantendo solúvel a lactose e a implementação de um regime ótimo de centrifugação para o isolamento efetivo do precipitado de EPS.

1.8. Vida-de-prateleira de alimentos processados

Segundo Moura e Germer (2004), muitas são as reações de transformação dos alimentos processados em sua vida útil, ainda que a deterioração microbiana esteja sob controle; há outras reações, tais como alterações de cor, sabor, textura, qualidade nutricional e funcional. Os fatores que influenciam a velocidade das reações são: temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor de oxigênio, estado da matriz sólida, presença de catalisadores entre outros. Além disso, os alimentos, por serem um material biológico, são sistemas extremamente complexos, nos quais as diversas reações de deterioração acontecem paralelamente, com diferentes cinéticas, tornando difícil a previsão da vida-de-prateleira e a precisão dos resultados.

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

Mondragón (2004) observou que, em produtos simbióticos fermentados a base de extrato de soja, as máximas contagens de probióticos foram atingidas na faixa de pH de 4,3 a 5,5. Quando os meios atingem valores de pH inferiores a 5,8-6,0, 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. A interrupção da fermentação geralmente é efetuada em pH entre 4,5 e 5,0, estado no qual as proteínas são mais digeríveis e o produto apresenta consistência de iogurte desejada. Verificou-se que, durante a estocagem, o pH continua decrescendo causando sinérese, além de mudanças no sabor, aparência e consistência.

1.9. Propriedades reológicas de alimentos

Segundo Steffe (1996), a reologia é definida como a ciência de deformação e do escoamento, que estuda a forma como os materiais respondem a uma tensão ou deformação aplicada. A reologia é vastamente usada na indústria de alimentos como, por exemplo, na determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos, controle de qualidade, estudos de vida-de-prateleira, determinação da textura do alimento correlacionando ensaios de análise sensorial com medidas reológicas, entre outros.

Todo material apresenta uma resposta a uma força externa entre duas extremidades do comportamento ideal: um sólido elástico e um líquido viscoso. O primeiro é descrito pela lei de Hooke, enquanto que um líquido viscoso ideal obedece à lei de Newton. A maior parte dos alimentos comporta-se como um material viscoelástico, ou seja, dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo, um corpo sólido pode apresentar propriedades da fase líquida e um material líquido pode mostrar propriedades de um corpo sólido. O comportamento viscoelástico de alimentos estuda-se largamente em reômetros que promovem cisalhamento na amostra (força tangencial). Além disto, é possível a caracterização do produto a baixas ou altas deformações independentemente do tipo de força aplicada.

A maioria das caracterizações reológicas é realizada em escoamento em estado estacionário, já que a viscosidade é considerada a propriedade mais importante do material. A viscosidade representa a medida da resistência ao escoamento quando uma tensão de

cisalhamento é aplicada. Quando um fluido Newtoniano é submetido a um escoamento, a viscosidade, η (Pa.s) é a constante de proporcionalidade entre a tensão, σ (Pa) e a taxa de deformação, γ (s^{-1}), como apresentado na Equação 1.

$$\sigma = \eta \cdot \gamma \quad (\text{eq. 1})$$

Em alimentos, diversos fluidos não seguem a lei de Newton, sendo então chamados de fluidos não-Newtonianos. A constante de proporcionalidade apresentada na Equação 1, é conhecida como viscosidade aparente. No caso de fluidos não-Newtonianos a viscosidade é dependente da taxa de deformação existindo diversos modelos reológicos para caracterizar tal fluido. Os tipos de curvas de escoamento obtidas pelos modelos mais simples e mais difundidos na literatura são apresentados na Figura 3.

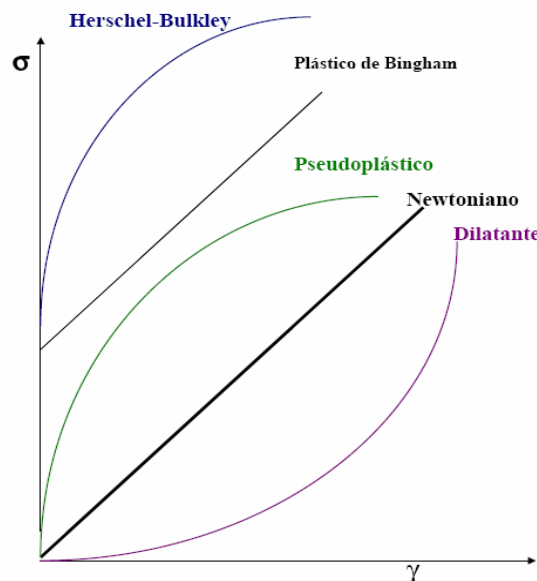


Figura 3. Curvas de escoamento para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

A maioria dos alimentos podem se classificar em duas categorias principais:

1.9.1. Fluidos que não necessitam de tensão inicial de cisalhamento (σ_0) para escoar

Estes fluidos podem ser descritos pela lei da potência ou equação de Ostwald de Waelle:

$$\sigma = k \cdot \gamma^n \quad (\text{eq. 2})$$

onde, k é o índice de consistência ($Pa \cdot s^{-n}$), e n é o índice de comportamento do fluido. Podem ser classificados em pseudoplásticos e dilatantes. O primeiro apresenta n inferior a 1 e a viscosidade aparente decresce com a deformação, sendo o mais comum nos alimentos não-Newtonianos. Os dilatantes são opostos aos pseudoplásticos, sendo que o n é maior que 1.

1.9.2. Fluidos que necessitam de tensão inicial de cisalhamento (σ_0) para escoar

Podem ser Plásticos de Bingham, que mostram relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, porém possuem tensão inicial ou residual para que possa escoar:

$$\sigma = \sigma_0 + k \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 3})$$

Os fluidos Herschel-Bulkley apresentam comportamento do tipo lei da potencia com tensão de cisalhamento inicial:

$$\sigma = \sigma_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{eq. 4})$$

O comportamento físico de fluidos com tensão inicial de escoamento é usualmente explicado em termos de sua estrutura interna, a qual é capaz de impedir o movimento para valores de tensão de cisalhamento menores que um valor σ_0 . Para σ maior que σ_0 a estrutura interna colapsa, permitindo que haja escoamento.

1.10. Interações entre proteínas-polissacarídeos

Segundo Braga (2006), no intuito de melhorar algumas características funcionais das proteínas, as interações que ocorrem entre proteínas e polissacarídeos, sistemas comumente encontrados em alimentos, são de grande interesse. Os sistemas com mais de um biopolímero exibem comportamentos mais complexos do que misturas de polímeros sintéticos, por possuírem um equilíbrio relacionado ao estado de ordem desordem de conformação, além de apresentar transições e separações de fases em determinadas situações. Interações entre polímeros resultam em incompatibilidade e formações complexas.

Estudos sobre interações das proteínas de soja com polissacarídeos têm sido conduzidos por poucos grupos de pesquisa (Braga, 2006; Chang, 2003).

Na presença de polissacarídeos, a temperatura de desnaturação de algumas proteínas é alterada ou a capacidade de formação dos géis é modificada. Em solução, as proteínas podem atrair e repelir os polissacarídeos dependendo da sua origem, do pH, da força iônica, da temperatura, da concentração ou do cisalhamento a que são submetidas.

As propriedades de um gel protéico, como textura e sinérese, podem ser alteradas não só pela adição de polissacarídeos como também pelas variações na força iônica e pH do sistema. A formação de uma rede protéica é o resultado da agregação das moléculas de proteína, a partir da desnaturação prévia destas e/ou da acidificação do sistema, por exemplo, através da ação de cultura bacteriana. Utsumi e Kinsella (1985) relatam que as forças moleculares envolvidas na formação de géis térmicos de isolado protéico de soja são pontes de

hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que o gel é mantido por pontes de hidrogênio e dissulfeto.

1.11. 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 tem-se 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 têm-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; tem a desvantagem de não permitir a otimização do processo. Na otimização do processo deve-se usar uma estratégia seqüencial 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. P-B 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. (Rodrigues e Lemma, 2005).

1.12. Efeitos benéficos dos probióticos

A imagem das companhias que vendem produtos não saudáveis (como os carentes de fibras dietéticas, altamente calóricos e gordurosos, entre outros aspectos), pode ser altamente afetada pela pressão da mídia, segundo a empresa Danisco (2004). A legislação é cada vez mais rigorosa quanto às classificações e uso de alegações, sendo um dos motivos pelos quais os produtos funcionais e *wellness drinks* devem ser desenvolvidos sob pesquisas bem fundamentadas (ANVISA, 1999, Behrens, 2002). Segundo Behrens et al. (2004), é de grande importância que, uma vez comprovada a propriedade funcional de um alimento, a informação desta propriedade seja realizada com ética e objetividade, de forma que não somente promova as vendas do produto, mas que sobretudo, respeite e beneficie o consumidor.

Alguns dos fatores que afetam a composição da microbiota 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. Para serem efetivos, os microrganismos probióticos devem ser capazes de ultrapassar várias barreiras até o lugar em que deverão atuar (Chou et al. 1999). Para uma bactéria ser probiótica, ela deve cumprir certos requisitos como os enumerados na Tabela 1, onde se especificam também os principais efeitos benéficos e terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos. 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 (Salminen et al., 1999).

1.13. Estudos de funcionalidade e aplicações clínicas

Segundo Crittenden et al. (2001) para os probióticos serem efetivos no cólon, eles devem permanecer viáveis tanto no produto quanto durante a passagem através do trato gastrointestinal. O ambiente ácido e rico em protease do estômago e os efeitos inibitórios dos sais de bile secretados dentro do duodeno, são possivelmente os maiores impedimentos para a sobrevivência das bactérias ingeridas durante o trânsito intestinal.

Inúmeras condições simuladas *in vitro* têm sido usadas por pesquisadores para prever a sobrevivência de espécies de *Bifidobacterium* durante o trânsito intestinal (Clark et al., 1993; Clark e Martin 1994; Lankaputhra e Shah 1995; Marteau et al., 1997; Charteris et al., 1998, Chou e Weimer, 1999, Lee e Heo, 2000, Crittenden et al., 2001, Jan et al., 2002, Doyreles, 2003, Morelli, 2007). Diversas caracterizações *in vitro* dos atributos tecnológicos das espécies podem ser usadas para avaliar o potencial de utilização na produção comercial e aplicação em bases alimentícias com sucesso. Segundo Morelli (2007) a seleção de novas bactérias probióticas por meio de testes *in vitro* e relaciones sinérgicas com prebióticos apresenta um desafio para os cientistas assim como para as companhias produtoras de bebidas funcionais. Atualmente, a maioria dos probióticos é analisada usando testes focados na sua habilidade de sobreviver no ambiente do trato gastrointestinal e a subsequente colonização.

A Organização Mundial de Gastroenterologia elaborou em 2008 uma guia prática sobre probióticos e prebióticos onde apresenta um quadro geral sobre as evidências existentes para aplicação clínica de probióticos. A Tabela 1 resume uma série de afecções clínicas com evidencia de que a administração oral de uma cepa específica de probióticos (em alguns casos associadas a prebióticos) demonstrou ser eficaz e benéfica a saúde em pelo menos um ensaio clínico bem desenhado e com potência estatística adequada. Na mesma Tabela 1 no todos os efeitos benéficos podem ser atribuídos a todas as espécies probióticas senão a espécies específicas com evidências clínicas provadas. (Saarela et al., 2000).

Tabela 1. Efeitos benéficos de probióticos em humanos. Critérios de seleção.

Efeitos benéficos*	Alguns critérios para a seleção de microrganismos probióticos
Manutenção da microbiota intestinal normal ^{1* *} Antagonista de crescimento de patógenos ¹ Impedimento da reabsorção de compostos aminados indesejáveis ¹ Desconjugação de ácidos biliares ¹ Diminuição de doenças coronárias ¹ Prevenção de hipercolesterimia ¹ Prevenção contra câncer de colo ¹ Prevenção da osteoporose ¹ Diminuição da atividade enzimática fecal ³ Estimulação do sistema imunológico ^{1,6* *} Redução dos níveis de colesterol ^{1,6* *} Incremento dos ácidos graxos nas fezes ^{3* *} Alívio dos sintomas de alergias como a dermatite atópica em crianças ^{3,5} Manutenção da remissão na doença de Crohn ⁵ Melhora o valor nutricional dos alimentos ¹ -efeitos na absorção de nutrientes(cálcio, magnésio, elementos traça, proteínas) ^{6* *} Atividade antimutagênica ¹ , anticarcinogênica ^{1,6* *} e antitumoral ¹	I) origem humana ² , II) resistência aos sucos gástricos ² , III) capacidade de aderência à mucosa intestinal ² , IV) resistência à bÍlis ² V) resistência à lisozima ² , VI) persistência no trato intestinal humano ³ VII) produção de substâncias antimicrobianas ³ , VIII) Antagonistas de bactérias patogênicas e carcinogênicas ³ , IX) seguros para uso clínico e alimentício ³ , X) validade clínica e com documentação dos efeitos à saúde ³ . XI) números elevados de microrganismos probióticos, no momento de seu consumo ² ,
Evidências de aplicações terapêuticas* Redução da intolerância à lactose ^{1,5} Prevenção de infecção urogenital ¹ Alívio da constipação ^{5* *} Redução, prevenção e tratamento de vários distúrbios diarreicos (associado a antibióticos, viral, associado a <i>Clostridium difficile</i> , diarreia dos viajantes) ⁵ Alívio dos sintomas da síndrome de intestino irritável ⁵ Terapia adjuvante para erradicação de <i>H. pylori</i> ⁵ Manutenção de remissão de colite ulcerativa, na puchite,enterecolite necrosante em lactentes ⁵ Prevenção de infecções pós-operatórias ^{5* *} Tratamento de hepatoencefalopatia ^{5* *}	Aspectos tecnológicos gerais consideram também: XII) Viabilidade durante o processamento ⁴ (desidratação, congelamento, liofilização) ² , XIII) Boas propriedades sensoriais ⁴ XIV) Produtos com aceitável viscosidade ⁴ XV) Estabilidade dos produtos durante estocagem ⁴

¹Fuller, 1989, Lourens-Hattingh et al, 2001. ²Fooks et al., 1999. ³Saarela et al., 2000. ⁴ Mattila-Sandholm et al., 2002. ⁵ OMGE, 2008. ⁶Pineiro, 2008. * Com probióticos e ** com prebióticos ou simbióticos.

Atualmente, vários estudos demonstraram importantes ganhos terapêuticos com probióticos, como por exemplo: Está demonstrado que várias cepas probióticas servem para reduzir a severidade e duração da diarreia infecciosa aguda em crianças e adultos e da associada a antibióticos; em estudos publicados encontra-se consistentemente uma redução da distensão abdominal e da flatulência como resultado dos tratamentos com probióticos em pacientes com síndrome de intestino irritável; também, melhoras na digestão da lactose e

redução dos sintomas relacionados à sua intolerância; e, resultados de um estudo sugerem que uma preparação simbiótica pode diminuir a expressão de biomarcadores de câncer colo-retal, entre outras aplicações terapêuticas. No entanto, existe evidência insuficiente de estudos comparativos para qualificar com eficácia provada alguns benefícios atribuídos aos probióticos, como ocorre com o tratamento da doença de Crohn, aonde recentes pesquisas concluíram que não existe evidência que sugira que sejam benéficos para a manutenção da remissão nessa doença (Kodama e Augusto, 2006, OMGE, 2008), precisando-se de novos estudos mais conclusivos.

A Figura 4 mostra resumidamente em um esquema proposto por Mattila-Sandholm e colaboradores (2002) as características funcionais de probióticos, prebióticos e simbióticos na evolução observada no desenvolvimento de tecnologias e produtos que os contem.

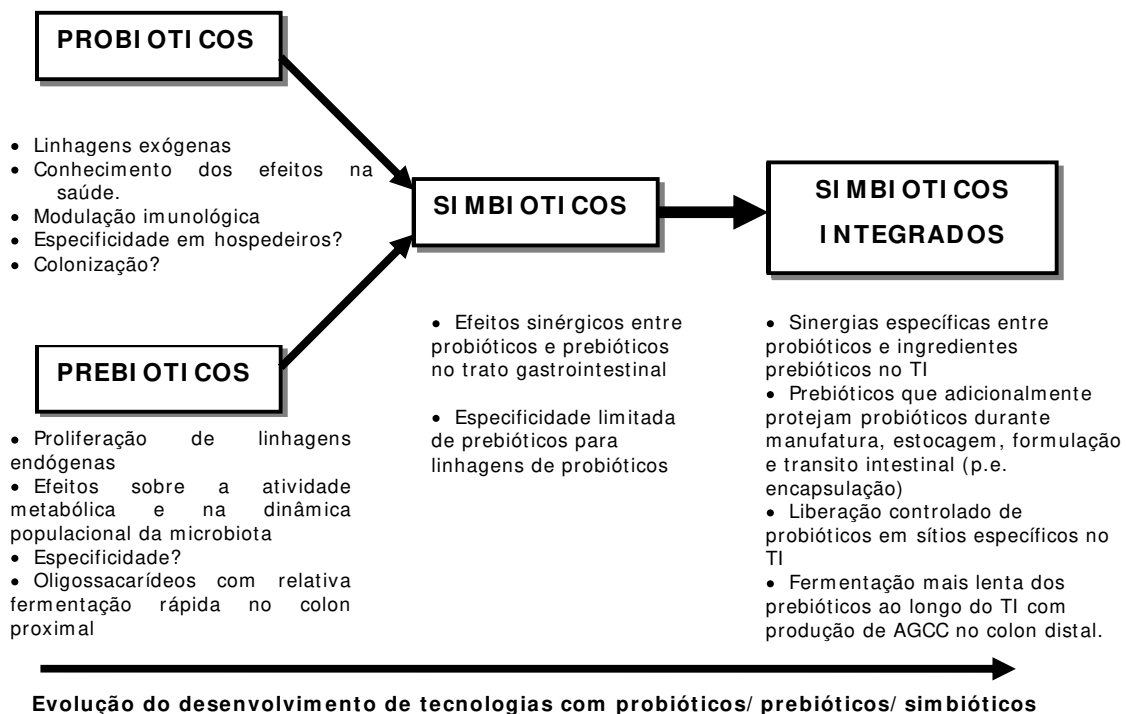


Figura 4. Esquema da evolução no desenvolvimento de tecnologias para produtos envolvendo probióticos, prebióticos e simbióticos (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). TI: trato intestinal. AGCC: ácidos graxos de cadeia curta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA Reports. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of the American Dietetic Association.** v.104, n.5, p.814-826, 2004

-
- 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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Resolução RDC No. nº 18, de 30 de abril de 1999.
- AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. A new method for precipitating bacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n.5, p. 341-344, 1996.
- BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 673-681, 1999.
- BEHRENS, J.H., ROIG, S.M. e SILVA, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, 33(2), 101-109, 2004.
- BEHRENS, J. H. **Aceitação, Atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine Max L-Merril*)**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.
- BERGMAIER D, CHAMPAGNE CP, LACROIX C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal Of Applied Microbiology**. v. 98, p. 272-284, 2005.
- BRAGA, A. L. M. **Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- CARDOSO, J. M. P., BATTOCHIO, J. R., BOLINI-CARDELLO, H. M. A. B. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 24(3): 448-452, jul.-set. 2004.
- CARVALHO, G. Nutrição, probióticos e disbiose. **Nutrição, Saúde & Performance**, ano 3, n.14, p. 36-37, 2001
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 87, p. 113-130, 1990.
- CERNING J, MARSHALL V.M.E. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. **Recent Results and Developments in Microbiol.** v.3, p. 195-209, 1999.
- CHANG, K.L.B.; LIN, Y. S.; CHEN, R.H. The effect of chitosan on the gel properties of tofu (soybean curd). **Journal of Food Engineering**, v.57, p.315-319, 2003.
- CHAMPAGNE, C.P.; BARRETE, J.; ROY, D.; RODRIGUE, N. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. **Food Research International**, v. 39, p. 651-659, 2006.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L. AND COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and

- Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology** 84, 759-768, 1998.
- CHIARELLO, M. D. **Soja e os alimentos funcionais**. Encontro francobrasileiro de biosciência e biotecnologia. Alimentos Funcionais e nutracêuticos (16 p.). Embrapa Documento 85. Editores Jose Manuel de Sousa e Linda Reis. Brasília. 2002.
- 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.
- CHOU, L-S & WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**. v.82 No. 1, p. 23-31, 1999.
- CLARK, P.A., COTTON, L.N. AND MARTIN, J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy **foods**: II - Tolerance to simulated pH of human stomachs. **Cultured Dairy Products Journal**, 28, 11-14, 1993.
- CLARK, P.A. AND MARTIN, J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III - Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. **Cultured Dairy Products Journal**, 29, 18-21, 1994.
- CRITTENDEN, R.G., PLAYNE M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p. 353-261, 1996.
- CRITTENDEN R.G., MORRIS L.F., HARVEY M.L., TRAN L.T., MITCHELL H.L., PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.268-278, 2001.
- CROW, L. Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n.7, p. 1892-1895, 1988.
- DANISCO. **Danisco Sweeteners**. Disponível em <http://www.daniscosweeteners.com/web/dsw/publicsite/presentation/home/home/index.html>. Acessado em novembro de 2004.
- DAVIES GJ, GLOSTER TM, HENRISSAT B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. **Curr Opin Struct Biol**. v. 15, p. 637-645, 2005.
- DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.
- DOCO, T., CARCANO, D., RAMOS, P., LOONES, A., & FOURNET, B. Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. **Journal of Dairy Research**, v. 58, n.1, p. 147-150, 1991.
- DOLEYRES, Yann I. **Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées**. Thèse (Ph. Doctor en sciences et technologie des aliments). Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Laval: 2003.
- DONKOR, O.N. & SHAH, N.P. Production of β -Glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk. **Journal of Food Science M: Food Microbiology and Safety**, 73 (1), M15-M20., 2008.

-
- DUBOIS, M. A., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 251-255, 2000.
- EKHART PF e TIMMERMANS E. Techniques for the production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS). **Bulletin of the IDF**. v. 313, p. 59-64, 1996.
- FERREIRA, C.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.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.
- GIBSON, G R, ROBERFROID M.B. Dietary and modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. **J. Nutr.** v. 125, p.1401-1412, 1995.
- GIBSON, G. R. Non digestible oligosaccharides and bifidobacteria-implications for health. **International Sugar Journal**. v. 96, n.1150, p.381-387, 1994.
- GIBSON, GR, PROBERT, HM, VAN LOO, J, RASTALL, RA, ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr.Res. Rev.** 2004; 17:259-275.
- GOH K.T., HAISMAN D. R., ARCHER R. H., SINGH H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research International**. v.38, p. 605-613, 2005.
- GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELAN, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of de EPS produced by *P. acidici-propionici* on milk microfiltrate. **Carbohydrate polymers**, v. 51, p. 149-158, 2003.
- GRATTEPANCHE F., AUDET P., LACROIX C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, v 17, n. 2, p. 123-132, 2007
- GUARNER F., SCHAAF SMA G. J. Probiotics. **International Journal Of Food Microbiology**. v.39, p. 237-238, 1998.
- HASLER. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**. v. 52, n.11, p. 1998.
- HESS, S. J., ROBERTS, R. F., & ZIEGLER, G. R. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 252-26, 1997.
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento e identificação de leveduras produtoras de oligossacarídeos coletadas em diferentes regiões brasileiras..** Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006

- HERNALSTEENS S. **Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por via enzimática.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp, Campinas, SP, 2002.
- HIDAKA H, HIRAYAMA M, SUMI N. A fructoligosaccharides producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural Biological Chemical.** V. 52 n. 5, p. 1181-1187, 1989.
- HOU, J-W., YU,R-C.,CHOU,C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional.** v.33. p. 393-397. 2000.
- JAN, G., LEVERRIER, P., ROLAND, N. Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: In vivo and in vitro investigations. **Lait.** v.82, p. 31 144, 2002.
- JIE Z, BANG-YAO L, MING-JIE X, HAI-WEI L, ZU-KANG Z, TING-SONG W, CRAIG SA. Estudo sobre os efeitos da ingestão de polidextrose sobre as funções fisiológicas em chineses. **American Journal Of Clinical Nutrition.** v. 72, p. 1503-1509, 2000.
- KODAMA, G. M.; AUGUSTO, R. S. Uso de probióticos no tratamento da doença de Crohn. **Revista Nutrição Profissional,** v. 2, n. 10, p. 38-43, 2006.
- KORAKLI M, GÄNZLE MG, VOGEL RF. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **Journal Of Applied Microbiology.** v. 92, p.958 965, 2002
- KORAKLI M, PAVLOVIC M, GÄNZLE MG, VOGEL RF. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. **Applied and Environmental Microbiology** v. 69, p. 2073 2079, 2003.
- KORAKLI, M., VOGEL, R. F. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycanucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. **Applied Microbiology And Biotechnology,** v. 71, p.790 803, 2006.
- KURMAN J.A. The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. **International Dairy Federation Bulletin.** v.179, p. 16-26, 1994.
- LANKAPUTHRA, W.E.V. AND SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal** 30, 2-7, 1995.
- LEBLANC, J.G., SILVESTRONI, A. CONNES C., JUILLARD V. SAVOY DE GIORI, G., PIARD, J-CH., SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. **Genetics and Molecular Research,** v. 3, n. 3, p. 432-440, 2004.
- LEE, KI-YONG AND HEO, TAE-RYEON. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bilis Salt Solution. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 66, No. 2, p. 869-873, 2000.
- LEVERRIER P., FREMONT Y., ROUAULT A., BOYAVAL P., JAN G. In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. **Food Microbiology.** v. 22, p. 11 18, 2005.
- LOURENS-HATTINGH, A.;VILJOEN,B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal.** v. 11, p. 1-17, 2001.
- LUCEY, J. A. **Acid and acid/ heat coagulated cheese.** In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences.** London, UK: Academic Press, pp. 350 356, 2003.

- MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; GARDNER, N.J.; CHAMPAGNE, C.P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419-426, 2002.
- MAC FIE HJH, THOMSOM DMH. **Preference mapping and multidimensional scaling**. In: PIGGOT J. R, Ed. *Sensory Analysis of foods*, 2nd ed. Elsevier, London, 1988, 389 p.
- MACKELLAR RC, MODLER HW. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 31, p. 537-541, 1989.
- MARSHALL, V. M., & RAWSON, H. L. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 137-143, 1999.
- MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R. AND HUIS IN'T VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Science**. 80, 1031-1037, 1997.
- MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal** 12 173-182, 2002.
- MAUGERI F, MONDRAGON O, MUKUNO, J. **Alimento funcional, composição probiótica, composição alimentícia e processo de produção de alimento funcional fermentado à base de extrato de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. BR. Pedido de patente PI0404152-6, 28 Agosto 2004.
- MODLER HW. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4. p. 383-407, 1994.
- MONDRAGÓN B, O L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos**. Orientador: Francisco Maugeri. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp. Campinas, 2004.
- MONDRAGÓN-BERNAL O., HORITA J., COSTA, F., MAUGERI, F. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharides (EPS) production and growth in soybeans water extract synbiotic beverage. **Journal of Biotechnology**. v.131S, p. S133-S187, 2007.
- MONSAN P, BOZONNET S, ALBENNE C, JOUCLA G, WILLEMOT RM, REMAUD-SIMÉON M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v. 11, p.675-685, 2001.
- MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: Ed. Campinas, Unicamp, 1993, 93p.
- MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**. v.17, p. 1278-1283, 2007.
- MOURA, S. C. S. R., GERMER, S. P. M. **Reações de Transformação e Vida-de-Prateleira de Alimentos processados** - Manual Técnico No. 6. Terceira edição. Campinas: ITAL, 2004, 92 p.
- MURTI MJ, LANDON M.. Croissance des Lactobacilles dans l'extrait de soja. **Science des Aliments** v.13, p. 491-500, 1993.

- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** TACO Versão 2 Segunda Edição. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 2006, 114 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA -OMGE. Probióticos e Prebióticos. Guias Práticas da OMGE. Disponível em http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf. Acessado em Outubro de 2009.
- 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.
- PINEIRO M, ASP NG, REID G, MACFARLANE S, MORELLI L, BRUNSER O, TUOHY K. FAO Technical meeting on prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**. Sep;42 Suppl 3 Pt 2:S156-9, 2008
- PINHEIRO, Andrelina S. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.
- PRODIET. **Prodiet Nutrição Clínica**. Disponível em [http://www.prodietnutricao.com.br/arquivos/fdfe2651b68615b056f7db5776bba064.pps#465,5,Diapositiva 5](http://www.prodietnutricao.com.br/arquivos/fdfe2651b68615b056f7db5776bba064.pps#465,5,Diapositiva%205). Acessado em janeiro de 2009.
- ROBERFROID M.B., VAN LOO J.A.E., GIBSON G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 11-19, 1998.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Ed. Casa do Pão. 326 p., 2005.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.
- RUAS-MADIEDO P., GUEIMONDE M., REYES-GAVILA´N C. G., SALMINEN S. Short Communication: effect of exopolysaccharide isolated from *Villi* on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2355-2358, 2006.
- RYBKA, 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.
- 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.
- SANTOS M., TEIXEIRA J., RODRIGUES A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemical Engineering Journal**. v.4, p. 177-188, 2000.
- SALMINEN S, OUWEHAND A, BENNO Y, LEE Y K. Probiotics: how should they be defined?. **Trend in Food Science & Technology**. v.10 (3), p. 107-110, 1999.
- SAVADOGO, A., OUATTARA, C. A. T., SAVADOGO, P. W., BARRO, N., OUATTARA, A. S., TRAERÉ, A. S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. **African Journal of Biotechnology**. v. 3, n.3, p. 189-194, 2004

-
- SCALABRINI, P, ROSSI, M., SPETTOLI, P., MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* stains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 39. p. 213-219, 1998.
- SMITINONT, T.; TANSAKUL, C.; TANASUPAWAT, S.; KEERATIPIBUL, S.; NAVARINI, L., BOSCO, M., CESCUTTI, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 105-111, 1999.
- STEFFE, J F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing, 1996, p. 1-93.
- STONE, H. S. e SIDEL, J.L.. Descriptive analysis. In: Stone, H.S; Sidel, J.L. Sensory Evaluation Practices. Academic Press. London: 2004, 377 p.
- SUTHERLAND IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol.** v. 16, p.41 46, 1998.
- 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. 368 p.
- TANNOCK GW, MUNRO K, HARMSSEN HJ, WELLING GW, SMART J, GOPAL PK. Analysis of the fecal microbiota of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 2578-88, 2000
- THARMARAJ N., SHAH N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v.14, p. 1055 1066, 2004.
- TIEKING M, KORAKLI M, EHRMANN MA, GÄNZLE MG, VOGEL RF. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 945 952, 2003.
- TIEKING M, GÄNZLE M. Exopolysaccharides from cereal associated lactobacilli. **Trends Food Sci Technol**. v. 16, p. 79 84, 2005.
- TIEKING M, KADITZKY S, VALCHEVA R, KORAKLI M, VOGEL RF, GÄNZLE MG. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. **Journal Of Applied Microbiology**. v. 99, p. 692 702, 2005b.
- TUINIER, R., OOMEN, C. J., ZOON, P., COHEN, M. A. S., KRUIF, C. G. Viscoelastic properties of an exocellular polysaccharide produced by a *Lactococcus lactis*. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 219-223, 2000.
- UTSUMI, S.; KINSELLA, J. E. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. **Journal of Food Science**, v.50, p. 1278-1282, 1985.

WANG, S. H., MARINHO, C. S. e CARVALHO, E.P. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, v.29, n.10, p. 1593-1601, 1994.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. ***Enzyme and Microbial Technology***. v. 19, p. 107-117, 1996.

ZIEMER, C.J. e GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics, and synbiotics, in the functional food concept - Perspectives and future strategies. ***International Dairy Journal***, v.8, p.473-479,1998.

CAPÍTULO 2.

1ª. Parte

2.1. OPTIMIZATION OF SYNBIOTIC FERMENTED FOOD FROM HYDROSOLUBLE SOY EXTRACT APPLYING EXPERIMENTAL DESIGN AND SENSORY ANALYSIS TECHNIQUES

Authors: OLGA MONDRAGÓN-BERNAL; MARIA ISABEL RODRIGUES; HELENA MARIA
ANDRÉ BOLINI; FRANCISCO MAUGERI

Otimização de alimento simbiótico fermentado a base de extrato hidrossolúvel
de soja aplicando técnicas de planejamento experimental e análise sensorial.

Este artigo foi aceito para publicação pelo **Journal of Sensory Studies** -ISSN: 0887-8250-
editado por Wiley Blackwell em 3 de Agosto de 2009.

“Que saberá a mata? Que pedirá a mata? Pedirá água?” (Manoel Bandeira)
“A água deve permanecer fonte abundante de vida para todos” (Karol Wojtyla -João Paulo II)

2.1. OPTIMIZATION OF SYNBIOTIC FERMENTED FOOD FROM HYDROSOLUBLE SOY EXTRACT APPLYING EXPERIMENTAL DESIGN AND SENSORY ANALYSIS TECHNIQUES

ABSTRACT

In this work, a synbiotic food from hydrosoluble soy extract was developed and tested. Food products made from soymilk have frequently been rejected due to their peculiar leguminous flavor. Although lactic fermentation promotes an improvement in final flavor, *Bifidobacterium* produces acetic acid, which renders *off flavor* in the product. To improve sensory features of soymilk s synbiotic beverage, sixteen flavors compounds were evaluated by preliminary affective tests using hedonic scale. The ideal sweetness and flavor were optimized using experimental design and just-about-right scale. Sucrose concentration presented the highest significant effect ($p \leq 0.05$). Products with higher sucrose contents (9.0-11.2g/100mL) and 0.08-0.16g/100mL of flavoring presented ideal sweetness. For ideal flavor, 11g/100mL sucrose content or higher with any amount of flavoring was considered ideal. In conclusion, predictive models for responses with respect to the ideal flavor and sweetness, overall acceptance and purchasing attitude of a soymilk symbiotic food were obtained and validated, with highly accepted and positive purchase intent (70%) by target public.

PRACTICAL APPLICATIONS

The use of the just-about-right scale in sensory test is employed to measure the ideal amount of a determined compound that should be added to promote greater acceptance and preference according to the taste panel. Given that the sensory tests for the choice of the ideal formulations are carried out in a linear manner and with one variable at a time, the present study has innovated in the application of the just-about-right scale, simultaneously evaluating two aspects of the ideal (sweetness and flavor) with a CCRD experimental design (Central Composite Rotatable Design) and using the response surface methodology applied in the optimization of soymilk s symbiotic food. Predictive models for responses could be obtained to different sensorial optimizations in food researches.

Keywords: soymilk; synbiotic food; acceptance test; just-about-right scale; experimental design.

2.1.1. INTRODUCTION

The hydrosoluble soy extract shows good potential for the development of new products with health appeal, as well as being an alternative for people with allergies/eating disorders from the ingestion of human or cow s milk besides naturally containing oligosaccharides regarded as prebiotics to stimulate the growth of probiotics (Hou *et al.* 2000). Recent studies have indicated the beneficial health effects of consuming soy compounds. It is ranked as a functional food, since it includes substances that reduce the chances of certain diseases occurring. Soy may be employed in both preventive and therapeutically manners in the treatment of cardio-vascular diseases, cancer, osteoporosis and menopause symptoms (Donkor and Shah, 2008, Chiarello, 2002; Hasler, 1998). However, it is frequently rejected due to its unfavorable leguminous flavor, mainly caused by the presence of n-hexanal (Hou *et al.*2000, Tamime and Robinson, 2001) a compound derived from the action of lipoxigenases (Ciabotti *et al.* 2007; Evangelista and Regitano-D arce 1997; Murti *et al.* 1993; Okubo *et al.* 1992).

Starting from the fermentation of the soy extract by probiotic lactic bacteria such as *Lactobacilli* and bifid bacteria, and the presence of selected prebiotic agents, a synbiotic product is obtained as a functional food alternative. From the sensory point of view, the lactic fermentation of the soy extract by *L. acidophilus* and *L. casei* contributes to the improvement not only of the product flavor, but also of the aroma. The production of lactic acid and the proteolytic activity of these microorganisms, mainly of *L. casei*, account for the formation of aroma and flavor precursors, contributing to the elimination of undesirable aromas and flavors (Murti *et al.*, 1993; Evangelista and Regitano-D arce, 1997). However, the *Bifidobacterium* also produce acetic acid, which is unfavorable to final product flavor, representing an off flavor (Mondragon 2004; Laurens-Hauttingh and Viljoen, 2001; Cravero, 2000; Chou and Hou, 2000, Wang *et al.* 1994). A variety of technologies have been developed aimed at producing soy extracts and derivatives with a lower intensity of this flavor (Wang *et al.* 1994). It is possible to improve a product in order to meet consumer expectation by employing sensory techniques that adjust to the fundamental characteristics of each type of food (Behrens *et al.* 2004).

The sensory evaluation delivers complete and prompt information about product quality, determines acceptance on behalf of the consumer and consequently, the purchasing intent for that product (Moraes, 1993). Schutz and Cardello (2001) based in early studies of Green *et al.* (1993), developed a labeled affective magnitude scale (LAM) for assessing food liking/disliking, in an attempt to develop a scale showing the advantages provided by the magnitude estimation, but easy-to-use. The hedonic unstructured scale or self-adjusting scale (Villanueva and Da Silva, 2009) is one of the sensory methods available, mostly employed to measure consumer acceptance of a product due to the reliability and validity of its results, as well as its

simplicity for use by the tasters (Schutz and Cardello, 2001; Stone and Sidel 2004). The unstructured scale it is anchored with verbal affective labels in the extreme regions of the scale to offer more consumer-friendly. The capability of the LAM scale to minimize heteroscedasticity problems associated to ANOVA models is not restricted to a limited number of categories, allowing the panelist to use any part of the scale to attribute his/ her hedonic values, it reduces the psychological error of habituation, encouraging the panelist to make his evaluation in the most conscious and discerning way, it reduces or eliminates the numerical and contextual effects (Villanueva and Da Silva, 2009). The use of the just-about-right scale in affective analyses is one of the most applied methods, due to the reliability of its results, and is employed to measure the ideal amount of a determined compound that should be added to promote greater acceptance and preference according to the taste panel. Just-about-right scales measure the appropriateness of the level of a specific attribute, and are used to determine the optimum levels of attributes in a product: is too high, too low, or just-about-right. In this analysis, the tasters evaluate the samples and register their answers on a specific scale, according to how close the samples are to the ideal for the particular attribute under evaluation (sweetness, flavor or others), according to the Vicker s method (1998) (Cardoso *et al.* 2004).

A precise and reliable inference can be reached only through the use of an experimental design for random sampling and data collection (Gacula *et al.* 2009). The factorial design methodology, associated with the analysis of response surfaces, is a tool based on a statistical theory, which conveys safe information about the process, minimizing the empiricism involved in the trial and error techniques (Rodrigues and Lemma 2005; Box *et al.* 1978). More than one response may be optimized at the same time and it is able to maximize or minimize responses such as yield, acceptance or cost, individually or simultaneously. It allows for the evaluation of the experimental error in order to specify the statistical reliability level, which is useful to estimate reproducibility of the desired result (Rodrigues and Lemma 2005; Gacula, 1993).

While there are many variations of just-about-right scales, such scales typically consist of five or seven points, ranging from too little to too much for a given characteristic (Gacula *et al.* 2009; Meullenet *et al.*, 2007; Gacula, 1993). One end point is labeled as much too little , the other end point as much too much and the middle point as just right or just about right . However, an unstructured line scale anchored with the attributes was used to optimize to optimize sweetness in fruit juice (Vickers, 1988). Given that the sensory tests for the choice of the just-about-right scale are carried out in a linear manner and with one variable at a time, the present study has innovated in the application of the just-about-right scale, simultaneously evaluating two aspects of the ideal (sweetness and flavor) from the analysis of the response

surface employing quadratic terms from a CCRD experimental design (Central Composite Rotatable Design).

Different researchers have reported studies concerning the sensory features of traditional cow s milk yoghurts (Santana *et al.* 2006; Fox *et al.* 2004; Saint-Eve *et al.* 2004; Sigman-Grant *et al.* 2003; Ward *et al.* 1999; Penna *et al.* 1997). Shelef *et al.* (1998) stated that the soymilk yoghurt obtained using traditional starter cultures plus 4% sucrose had an improved aroma and flavor, and that the addition of 10% sucrose plus a flavoring agent enhanced preference by the tasters. Wang *et al.* (1994) studied soy yoghurts supplemented with 2% sucrose, 2% lactose or 2% sucrose+lactose (1:1) and fermented by *L. acidophilus*+*S. thermophilus*. They showed that the yoghurt supplemented with 2% sucrose was the one preferred in the pilot test. Behrens *et al.* (2004) studied the acceptance of different flavored soy beverages, fermented by *L. casei*, *L. acidophilus* or a commercial mixture of *S. thermophilus*+*L. acidophilus*+*B. lactis* and supplemented with sucrose and lactose. Their study showed that the nutritional and health features might well be employed in promoting a new product, enhancing its potential success on the consumer market. Behrens (2002) evaluated consumer beliefs and attitudes with respect to soy-derived products, showing that the consumption of soy and soy derived products was still low, and that soy yoghurt was practically unknown. A certain proportion of the interviewees assumed that soy yoghurt would have a bad flavor, but the majority showed a neutral attitude concerning this question, thus indicating a market opportunity. Previous studies have reported on sensory evaluations carried out with samples of milk yoghurt and soy yoghurt prepared using traditional lactic cultures, but nothing has been reported about synbiotic fermented soy beverages, containing a mixture of *L. acidophilus*+*L. paracasei* sp *paracasei*+*B. longum* and supplemented with prebiotic agents.

Thus, the present study aimed to optimize the ideal sweetness and flavor of a synbiotic fermented soy beverage, using the combination of an experimental design and sensory analysis, for a product sweetened with sucrose, applying the ideal scale and determining the models to predict the acceptance and purchasing intention on behalf of potential consumers.

2.1.2. MATERIALS AND METHODS

2.1.2.1 Raw material

Different samples of fermented hydrosoluble soy extract (10g/100mL) beverages (FB Olvebra-Brazil) were evaluated, formulated with standard inoculum of probiotics 5×10^5 - 5×10^7 CFU/mL (*Lactobacillus acidophilus* LAC4, *L. casei* subsp *paracasei* LBC81 and *Bifidobacterium longum* BL04) and 4g/100mL prebiotics (fructooligosaccharides -*Raftilose*®-Orafti-Brazil- and polydextrose -*Litesse*®-Danisco-Brazil); soy masking agent (quantity suggested by the

manufacturer *Duas Rodas*-Brazil); anti-foaming agent (silica 0.005g/100mL *Proceedings*-Brazil); colourings (amounts suggested by the manufacturer *Chr. Hansen*-Brazil) and the following solid flavorings, identical to natural flavors: strawberry, peach, vanilla, cream, condensed milk, yoghurt and cinnamon from the Brazilian brands: *Duas Rodas*, *Firmenish*, *Givaudan*, *Citromax*, *Chr. Hansen* (amounts suggested by the manufacturer); plus sucrose as the traditional sweetener.

2.1.2.2. Sample preparation for sensory tests

The samples were elaborated from mixtures of powdered solid ingredients according to the tests to be carried out, and reconstituted in water. The bottles containing the liquid media were sterilized in an autoclave at 116 °C for 4 minutes and cooled rapidly. The media were then aseptically inoculated with 5×10^5 - 5×10^7 CFU/mL of a standard lactic probiotic culture mixture (*L. acidophilus* sp: *L. paracasei* subsp: *B. longum* sp) and incubated in an incubator at 37 °C, without agitation, until the pH reached 4.5-5.0 with a firm consistency. The fermented products were stored under refrigeration for a maximum of 12 hour before carrying out the sensory tests. The samples were served to the tasters in individual cabins, using white plastic disposable 15 mL recipients coded with three digit numbers. The samples were elaborated in the Bioengineering Laboratory, Sensory laboratory, of the Food Engineering Faculty/UNICAMP.

2.1.2.3. Preliminary affective sensory test for prototypes of flavored fermented soy beverages

Preliminary studies were carried out with 16 flavorings, including 6 commercial flavorings to mask the natural soy flavor (without flavoring, yoghurt, vanilla, cream, condensed milk, cinnamon), 5 brands of peach and 5 of strawberry (A-Givaudan, B-Citromax, C-Firmenish, D-Chr.Hansen, E-Duas Rodas), formulated with fermented soy beverages containing 3g/100mL sucrose and 0.19g/100mL soy masking agent (*Duas Rodas*). The samples were evaluated for flavor by 25 tasters using an unstructured hedonic scale for acceptance. The results were analyzed by the variance analysis and by the HSD type Tukey s means test.

2.1.2.4. CCRD and affective sensory tests for ideal sweetness and flavor, overall acceptance and purchasing intent.

A 2^2 CCRD was carried out with 4 central points and 4 axial points ($\alpha = (2^2)^{1/4} = 1.414$), giving a total of 12 assays, the independent variables being Sucrose (x_1) varying from 7.2-12.8g/100mL and Flavoring (x_2) (condensed milk flavor, randomly selected), varying from 0.08-0.16g/100mL, for the responses of Ideal Sweetness (Y_1), Ideal flavor (Y_2), Global Acceptance (Y_3) and Purchasing Attitude (Y_4), obtaining the first two using the just-about-right scale test, and the last two by affective sensory tests. The scale category or levels and real values of this experimental design can be observed at the Table 2. The samples were tested by

27 potential consumers, verbally recruited, who filled in an appropriate form. In order to determine the ideal or just-about-right formulation, a form was elaborated including an unstructured scale anchored at the extremes by the terms not sweet enough or lack of flavor as compared to the ideal to the left, and far too sweet or far too much flavor as compared to the ideal to the right. The middle mark on the scale, or zero, was the ideal intensity. For the evaluation of sample acceptability, the tasters used an unstructured nine-centimeter scale, with the following terms anchored at the extremes: disliked very much to the left and liked very much to the right. In order to evaluate the attitude with respect to purchasing intent, a five-point structured scale was employed, from 5, meaning I would certainly buy the product, to 1, meaning I would certainly not buy the product (Meilgaard *et al*, 1999).

A second-order model was adopted in order to fit the experimental responses to the 6 parameters: $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + e$; where x_1 and x_2 , stand for the coded variables and β_0 , β_1 , β_2 and β_{12} stand for the regression model parameters, estimated by the least squares method (Rodrigues and Iemma, 2005, Gacula *et al*, 2009).

2.1.2.5. Validation test for the models

The variables showing significant effects ($p \leq 0.05$) were evaluated and the correlation coefficients generated. After analyzing the models by ANOVA, the response surfaces were drawn (Rodrigues and Iemma, 2005). Three treatments with distinct percentages of sucrose and flavoring were selected within the just-about-right range for each of the responses for ideal sweetness and flavor, and these treatments were compared to a control sample C (12g/100mL sucrose and 0.09g/100mL flavoring) that satisfied both responses. For each response four samples were compared amongst themselves on the just-about-right scale by 30 potential consumers. The averages were analyzed by ANOVA and the HSD Tukey means test at 5% significance. The model was validated if the treatments showed no significant difference amongst themselves at the established levels of confidence.

2.1.2.6. Test conditions

The tests were carried out in individual cabins in the sensory analysis laboratory, under controlled conditions (temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and white light). Each taster received 20-30 grams of each sample served in disposable 15 mL plastic cups (temperature close to 12°C), randomly coded with three digit numbers. The samples were served in complete balanced blocks (McFie *et al*. 1989) in a monadic way.

2.1.2.7. Statistical analysis

The results were submitted to a variance analysis (ANOVA), Tukey's Test at 5% significance for the means comparison, response surface analysis and generation of a model. All statistical analyses were carried out using the Statistica software 6.0 (*Statsoft 2001*).

2.1.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.1.3.1. Preliminary tests

Preliminary tests were carried out for the selection of the raw materials in this study, aiming to minimize the number of flavors in order to make the study possible. In general, the flavors were enhanced in the sweetened samples. The masking soy agent ingredient improved the final score of the fermented soy product, and it was added to all the formulations in the amount suggested by the manufacturer, together with the flavors to be optimized. Considerable syneresis occurred for all the formulations after fermentation and during storage. This fault was successfully handled and the results will be published in a separate paper.

Three global acceptance affective tests were carried out with respect to flavor: the first test was to mask the *in nature* soy off flavor; the second was to choose the best commercial brand of strawberry flavor and the third of peach flavor. All the samples contained masking soy agent. The preliminary results are shown in Table 1.

The cream, vanilla, condensed milk, yoghurt and no flavor samples presented no significant statistical difference with respect to overall acceptance ($p \leq 0.05$). The vanilla and no flavor with added masking soy agent samples differed significantly amongst themselves at $p \leq 0.10$. The cinnamon sample differed significantly from all the others at $p \leq 0.05$. There were no significant statistical differences ($p \leq 0.05$) between the commercial brands of strawberry and peach flavors compared in this study. This indicated that despite the flavoring brand, the synbiotic soy products were accepted by the potential consumers to the same degree. The peach flavored samples obtained the best average scores for acceptance, although they were still low, between 4.6 and 5.3, which means the public only slightly liked them. With respect to the strawberry flavored samples, the testers neither liked nor disliked them, assigning average scores of from 4.0-4.6. The remaining flavors were not well accepted, with average acceptance scores from 2.5-4.4, which means that the tasters slightly disliked them. Of all these formulations, the cinnamon flavor obtained the lowest score for acceptance, and was the only one showing a significant difference ($p \leq 0.05$) with respect to the other formulations. The comments made by the tasters indicated an inclination towards sweeter flavors.

Behrens (2002) carried out tests with a variety of flavors in soy beverages and found that the addition of sucrose to all the mixtures gave the best results with respect to acceptance.

The pineapple and guava flavored samples obtained the highest scores for acceptance, indicating good market potential. The strawberry, coconut and kiwi flavors were also well accepted, but the hazelnut flavored product was rejected.

Table 1. Preliminary sensory test for a synbiotic soy beverage with added masking soy agent (E) and flavorings: average overall acceptance scores for flavor.

Flavoring	Average ^a	Flavoring	Average	Flavoring	Average
No flavoring ^b	3.62±2.22 ^{ab}				
Yoghurt (A)	3.86±2.32 ^a	Strawberry (A)	4.19±2.24 ^a	Peach (A)	4.78±2.25 ^a
Vanilla (A)	4.40±1.96 ^a	Strawberry (B)	4.02±1.94 ^a	Peach (B)	4.63±2.10 ^a
Cream (C)	4.41±1.88 ^a	Strawberry (C)	4.55±2.12 ^a	Peach (C)	5.19±2.18 ^a
Condensed milk (E)	4.02±2.03 ^a	Strawberry (D)	4.26±2.63 ^a	Peach (D)	4.95±2.24 ^a
Cinnamon** (E)	2.49±1.74 ^b	Strawberry (E)	4.58±2.33 ^a	Peach (E)	5.32±2.04 ^a

^aAverages with the same letters in the same columns do not differ significantly amongst themselves at $p \leq 0.05$. ^bNo flavoring and cinnamon differed significantly at $p \leq 0.1$. Capital letters indicate the flavoring brand: A (Givaudan), B (Citromax), C (Firmenish), D (Chr. Hansen) and E (Duas Rodas).

2.1.3.2. CCRD experimental design to determine the just-about-right sweetness and flavor and affective sensory tests for acceptance and purchasing intent

The need to implement appropriate sensory techniques in order to ascertain product sensory optimization was thus proven. After analyzing the preliminary results, optimization of the formulations was carried out in order to obtain fermented soy beverages with ideal flavor and sweetness, masking the soy *off flavor* and with good acceptance by the target public varying the concentrations of sweetener and flavor.

Table 2 shows the results for the tests to determine the ideal sweetness intensity (y_1), the ideal flavor (y_2), overall acceptance responses (y_3) and purchasing attitude (y_4) for a synbiotic fermented soy beverage, sucrose-sweetened and condensed milk flavored, using a 2^2 CCRD, 27 potential consumers of the product, showing the outlined matrix, the values of the levels, the variables and the averages obtained for the four responses. Although researchers in this field consider that results for purchasing attitude should be analyzed according to the percentage of consumers assigning each score for purchasing intent on the scale for each sample evaluated in the present study, considering that a category scale was used and not a linear scale (Meilgaard et al. 1999), the average of the scores assigned by the tasters for each sample evaluated was used, so that this response could be used in the CCRD experimental design technique applied.

According to the evaluation scale applied, zero stands for the ideal or just-about-right. Therefore, the samples that most closely approximated the just-about-right were: assay 10 for ideal sweetness, with an average response of 0.09 (10g/100mL sucrose and 0.16g/100mL flavoring), followed by assay 4 with an average response of 0.21 (12g/100mL sucrose and 0.15g/100mL flavoring), assay 7 with an average response of -0.30 (10g/100mL sucrose and 0.12g/100mL flavoring -central point) and assay 2 with an average response of 0.32 (12g/100mL sucrose and 0.09g/100mL flavoring). Assay 4 showed the flavor closest to the just-about-right, with an average of -0.20 (12g/100mL sucrose and 0.15g/100mL flavoring, followed by assays 11, with an average response of -0.52 (12.8g/100mL sucrose and 0.12g/100mL flavoring), 2 with an average response of -0.58, and 6 with an average response of -0.79 (10g/100mL sucrose and 0.12g/100mL flavoring).

Table 2. Coded and real levels, variables and responses in the 2² CCRD for the sensory responses of ideal flavor, ideal sweetness, overall acceptance and purchasing attitude of a condensed milk flavored fermented synbiotic soy beverage.

Assay	x_1	x_2	Sucrose (g/100mL)	Flavor (g/100mL)	Ideal Sweetness Y_1	Ideal Flavor Y_2	Overall Acceptance Y_3	Purchasing Attitude Y_4
1	-1	-1	8.0	0.09	-1.36	-2.12	3.42	2.56
2	1	-1	12.0	0.09	0.32	-0.58	5.21	3.48
3	-1	1	8.0	0.15	-1.17	-1.63	3.56	2.63
4	1	1	12.0	0.15	0.21	-0.20 ^a	5.41 ^b	3.63 ^b
5	0	0	10.0	0.12	-0.53	-1.13	4.31	3.15
6	0	0	10.0	0.12	-0.38	-0.79	4.31	2.93
7	0	0	10.0	0.12	-0.30	-0.99	4.50	3.11
8	0	0	10.0	0.12	-0.65	-1.39	4.12	2.93
9	-1.41	0	7.2	0.12	-1.38	-1.95	3.08	2.41
10	0	1.41	10.0	0.16	0.09 ^a	-0.85	4.78	3.41
11	1.41	0	12.8	0.12	0.37	-0.52	5.13	3.56
12	0	-1.41	10.0	0.08	-0.54	-1.24	4.78	3.33

^a Closest to the ideal responses. ^b Greater acceptance and purchasing intent response.

In the determination of the ideal sweetness and flavor, the analysis of the effects showed that the sucrose concentration was the independent variable with the highest positive effect ($p \leq 0.05$) within the limits of this study. Thus the linear term for the flavoring concentration was included in the variance analysis, since it was still significant at $p \leq 0.15$, due to the experimental conditions of this study.

The sucrose concentration (x_1) also presented a significant positive effect ($p \leq 0.05$) in the affective global acceptance tests (Y_3) and purchasing attitude (Y_4), while the quadratic term of the flavoring concentration (x_2^2) had a positive effect on both responses. Statistically, the non-significant parameters were eliminated from the model and added to the residues for the ANOVA calculation (Table 3).

Table 3. ANOVA, coefficient of determination (R^2), and the calculated and tabulated F values for the evaluation of the models used

Response	R^2 (%) ^a	Calculated F ^b	Tabulated F ^c	p value
Ideal sweetness (Y_1)	92.13	52.69	4.26	< 0.001
Ideal flavor (Y_2)	90.25	41.65	4.26	< 0.001
Overall acceptance (Y_3)	95.67	99.39	4.26	< 0.001
Purchasing attitude (Y_4)	94.25	73.76	4.26	< 0.001

^a R^2 (%): % of variation explained. ^bCalculated F = $MS_{\text{regression}} / MS_{\text{residue}}$. (MS= mean square)

^cAt significance of 5%, $F_{0.05, 2, 9}$.

After carrying out the ANOVA (Table 3), it was possible to validate the models for ideal sweetness, ideal flavor and purchasing attitude, since the calculated F values were higher than the tabulated F values, and also highly significant ($p \leq 0.001$), and the percentages of variation explained were higher than 90%. Therefore, the regression coefficients for the models were generated, and their corresponding response surfaces and contour plots drawn. Linear first-order models were obtained for ideal flavor and sweetness as well as nonlinear second-order models for Overall Acceptance and Purchasing Attitude for the fermented soy beverages studied. The coded and fitted models are depicted in equations 1, 2, 3 and 4.

$$\text{Ideal sweetness} = -0.445 + 0.691(x_1) + 0.121(x_2) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Ideal flavor} = -1.114 + 0.626(x_1) + 0.178(x_2) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Overall acceptance} = 4.221 + 0.817(x_1) + 0.246(x_2)^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Purchasing attitude} = 2.989 + 0.444(x_1) + 0.156(x_2)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

where x_1 stands for the coded value of sucrose concentration and x_2 for flavoring concentration.

Figure 1abcd indicates good agreement between the experimental values and those predicted by the model for the responses concerning ideal sweetness, ideal flavor, overall acceptance and purchasing attitude, respectively.

The models were highly significant, so it was possible to construct response surfaces and to define regions of interest. The interaction amongst the variables can be clearly seen on the response surfaces and contour plots, for the ideal flavor and sweetness tests (Figure 2abcd) and for the overall affective acceptance and purchasing attitude tests (Figure 2efgh).

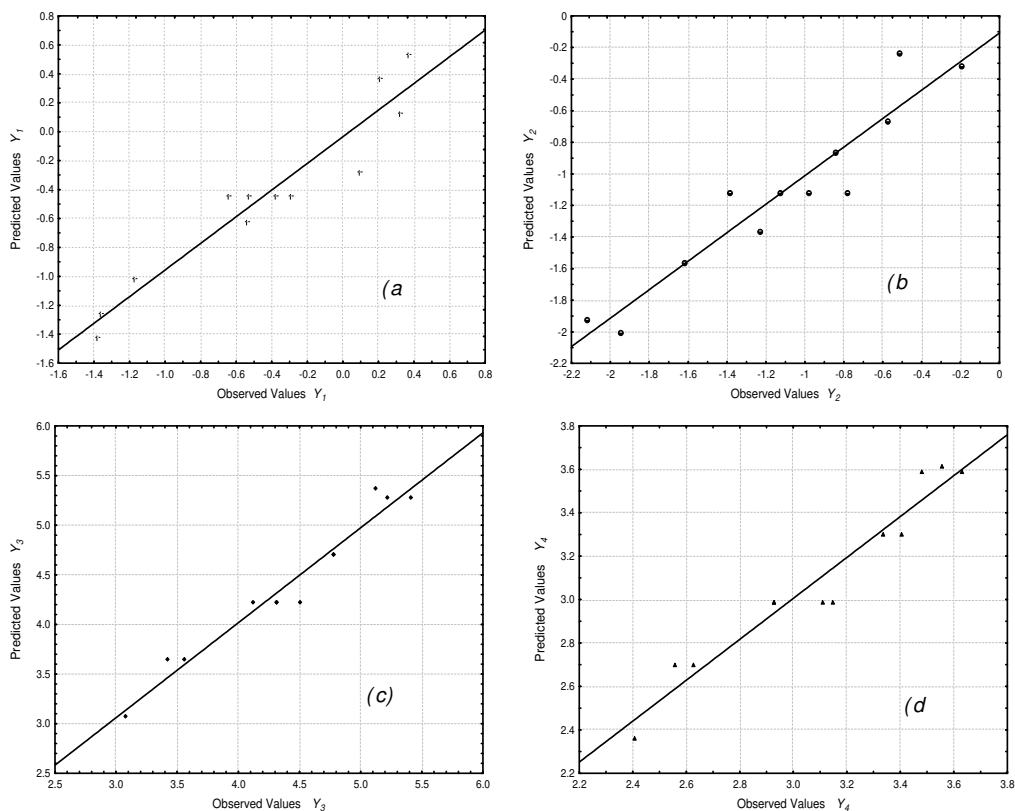


Figure 1. Experimental values to ideal sweetness (a), ideal flavor (b), overall acceptance (c) and purchasing attitude (d) in function of predicted values by the adjusted models.

It can be seen at response surfaces and contour plots that the ranges closest to the ideal sweetness were between 9.0 11.2 g/100mL of sucrose for any flavoring concentration (0.08 0.16 g/100mL) (Figure 2ab). For flavor (Figure 2cd) the just-about-right range extended from 10.9 13.0 g/100mL of sucrose or higher, observing a tendency for the higher the sucrose concentration, the closer it was to the ideal flavor, regardless of the amount of flavoring (0.08 0.16 g/100mL), within the boundaries established by the experimental design.

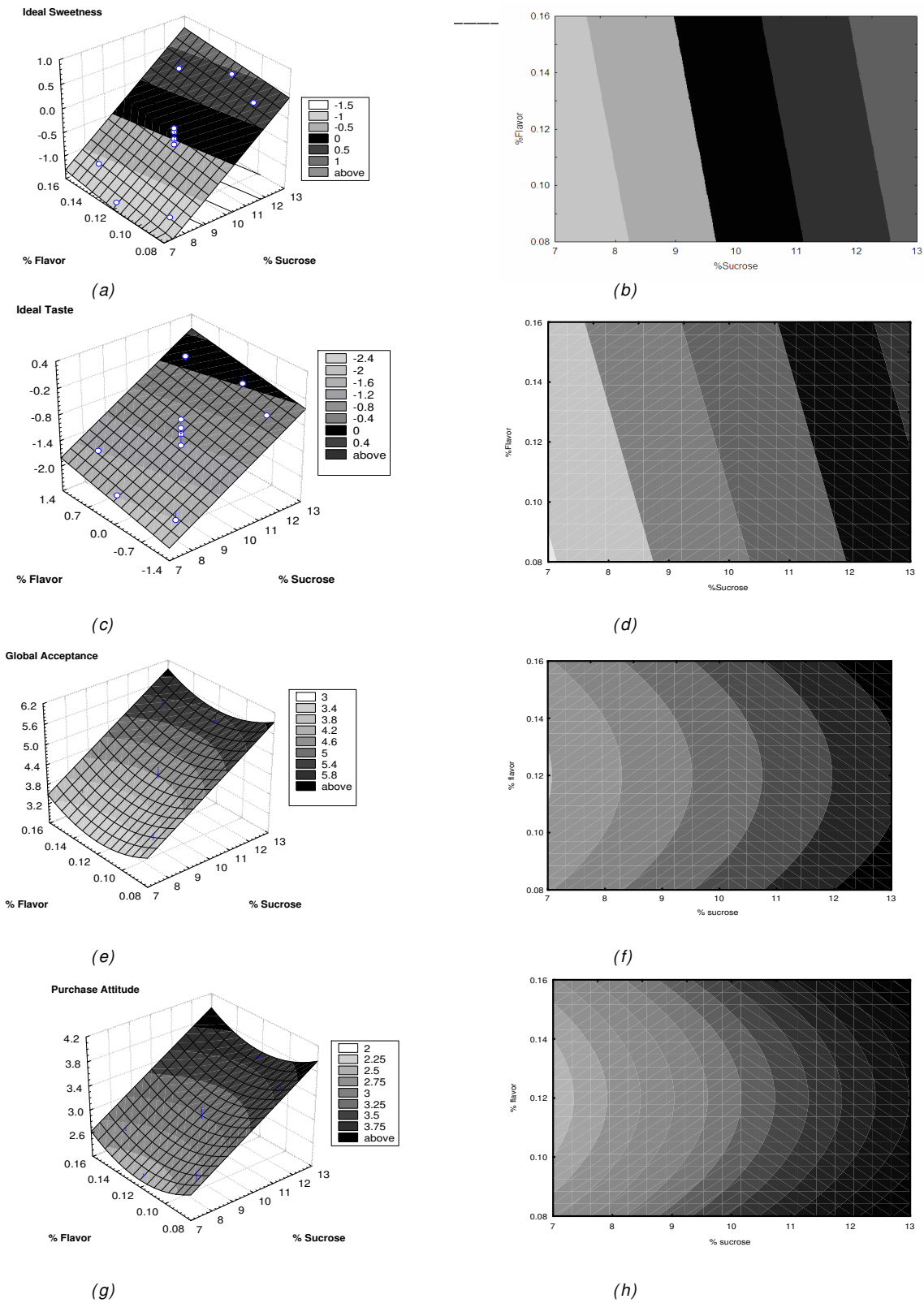


Figure 2. Response surfaces and contour plots for (a) and (b) ideal sweetness; (c) and (d) ideal flavor; (e) and (f) overall acceptance; (g) and (h) purchasing attitude.

The average values for overall acceptance of the products showed that the tasters liked the products from assays 4, 2 and 11 slightly, assay 4 obtaining the highest score with an average of 5.41; assays 12, 10 and the central points (5 to 8) were neither liked nor disliked; and assays 3, 1 and 9 were slightly disliked. As a matter of fact, it must be emphasized that the averages did not indicate a regular behavior, and were as much the result of the high scores as of the low ones given to each sample by the tasters.

The averages for purchasing attitude presented a similar behavior to that of overall acceptance (Table 2). Values above 3.5 indicate that the potential consumers would probably purchase the product (assays 4, 2 and 11). The highest average was found for assay 4 (3.63). Averages between 3 and 3.5 mean the consumers are in doubt regarding their purchasing intent. The averages for assays 3, 1 and 9 indicate they would be unlikely to purchase them.

From an analysis of the response surfaces and contour plots in Figure 2efgh, it can be seen that the results showed parallel behavior for overall acceptance and purchasing attitude. The responses in these affective tests showed a tendency to increase with increase in sucrose concentration, and showed little influence of the flavoring, which means that within the boundaries established for this study, with high or low concentrations of flavorings, product acceptance, and therefore its purchasing intent, increased with increase in sucrose. Thus higher sucrose concentrations generated better overall acceptance responses and consequently increased the purchasing intent, although there is a tolerance constraint or limit for this kind of ingredient on behalf of the tasters and the fermentation, which ought to be taken into consideration.

With respect to the purchasing attitude, assays 4, 2 and 11 obtained the highest percentages from the population, between those who probably would and those who certainly would purchase the product, with values of 66.7%, 66.7% and 51.9%, respectively. The percentages obtained by the population who were between doubts and certainly in purchasing the product were 74.1%, 85.2% and 85.2%, respectively, for these assays, as shown in Figure 3.

Thus the present study showed that the sensory features of the synbiotic fermented beverage obtained from hydrosoluble soy extract were improved, as also the acceptance and purchasing intent on behalf of the target public, as a result of the optimization carried out, applying the combined techniques of sensory analysis and experimental design. In addition, it was possible to predict the acceptance and purchasing attitude according to the product formulation, using the mathematical models obtained.

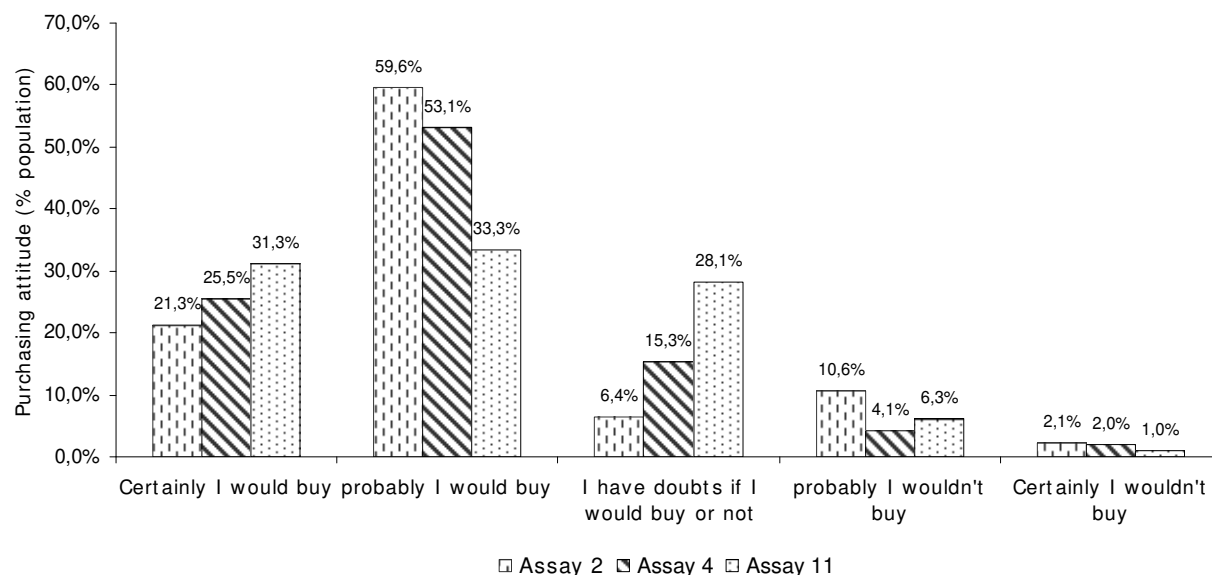


Figure 3. Distribution of the percentages in the population from purchasing attitude to CCRD s assays 4, 2 and 11 for synbiotic fermented beverage of soymilk.

2.1.3.3. Verification of the CCRD under the conditions that satisfied the responses

Verification of the models obtained was carried out by applying the Tukey s HSD test under the conditions that fulfilled each of the responses for ideal flavor and ideal sweetness . Three treatments were elaborated with different sucrose and flavoring concentrations, chosen within the ideal range for the ideal sweetness response. With respect to flavor, another three different conditions were chosen, within the range of the just-about-right for this response. In addition, each individual group was compared to a control C sample, containing 12g/100mL sucrose and 0.09g/100mL flavoring (determined with the intent of obtaining an intermediate product as much in ideal sweetness as in ideal flavor). The treatments and results obtained from the responses of 30 potential consumers in the comparative sensory test, applying the just-about-right scale, are shown in Table 4.

From the ANOVA result (Table 5), the calculated F was found to be lower than the tabulated F ($p \leq 0.01$), showing that there were no significant differences between the treatments. The Tukey s test confirmed that the four samples compared for each response showed no significant differences amongst themselves at 5% significance, verifying the validity of the models generated by the CCRD. There were significant differences amongst the tasters for the two responses (Table 5), as confirmed by ANOVA, although such differences are usually derived from the fact that the tasters employ different parts of the scale to express their impressions.

Table 4. Average responses to verification of the models using unstructured just-about-right scale with 0 as the middle category.

		Treatment	(g/ 100mL) Sucrose	(g/ 100mL) flavoring	Average Response **
Ideal Sweetness		1	10.5	0.15	-0.08 ^a ± 1.18
		2	11.5	0.10	-0.06 ^a ± 1.35
		3	11.0	0.08	-0.26 ^a ± 1.35
		C*	12.0	0.09	-0.53 ^a ± 1.56
Ideal flavor		1	12.8	0.12	-0.43 ^a ± 1.61
		2	12.0	0.16	-0.25 ^a ± 1.60
		3	12.5	0.15	-0.05 ^a ± 1.14
		C*	12.0	0.09	-0.65 ^a ± 1.55

* Control treatment (C) that satisfies the responses for both the ideal flavor and sweetness.

** Averages with the same letters in the same columns do not differ significantly ($p \leq 0.05$) by the HSD Tukey test.

Table 5. Verification of models by ANOVA with respect to ideal sweetness and flavor as generated by CCRD

		Variation source	D.F.	SS	MS	Calculated F	Tabulated F ^a
Ideal Sweetness		Treatments	3	10.07	3.36	3.47	4.04
		Taster	29	132.39	4.57	4.71	1.49
		Residue	87	84.28	0.97		
		Total	119	226.74			
							Tabulated F ^b
Ideal flavor		Treatments	3	5.79	1.93	1.49	2.73
		Taster	29	143.12	4.94	3.81	1.32
		Residue	87	112.62	1.29		
		Total	119	261.54			

^a $F_{0.01; 3; 87}$ at 1% level. ^b $F_{0.05; 3; 87}$ at 5% level.

2.1.4. CONCLUSIONS

Predictive models for responses with respect to the ideal flavor and sweetness, overall acceptance and purchasing attitude of a fermented functional food (synbiotic) from hydrosoluble soy base extract with condensed milk flavor were obtained by means of the CCRD. The models were validated by ANOVA and verified by the Tukey test with a just-about-right scale ($p \leq 0.05$),

since it was possible to predict the acceptance and purchasing attitude according to the product formulation. With respect to the totality of the responses, the sucrose concentration presented the highest significant effect ($p \leq 0.05$). Greater acceptance and purchasing intent by potential consumers was found for higher sucrose concentrations, within the boundaries of this study. These responses have concordance with the preliminary tests, where it was observed that regardless the flavoring brand, the synbiotic soy fermented product showed the same level of acceptance among the potential consumers, and that they preferred a product with more intense sweetness. Products elaborated with higher sucrose contents of between 9.0 and 11.2g/100mL and 0.08-0.16g/100mL of flavoring presented ideal sweetness, whereas for flavor, 11g/100mL sucrose content or higher with any amount of flavoring was considered ideal, within the boundaries of the study. As confirmed by the Tukey test, the product elaborated with 12g/100mL of sucrose and the lowest flavor content (0.09g/100mL), fulfilled both the responses for ideal sweetness and flavor. The present study showed that a fermented synbiotic beverage obtained from hydrosoluble soy extract, improved its sensory features after optimization of the sucrose and flavoring concentrations. Products with acceptance and purchasing intent improved by more than 70% were obtained on behalf of the target public, by applying the combined techniques of experimental design and a sensory affective analysis as just-about-right scale.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq/PEC-PG, Proceedings Ltda. for the support granted and the flavoring and ingredients companies for the free samples and strains employed in this study.

2.1.5. REFERENCES

- BEHRENS, J.H., ROIG, S.M. and SILVA, M.A.A.P. 2004 Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Aliment.** 33(2), 101-109.
- BEHRENS, J. H. 2002. ***Aceitação, Atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja (Glycine Max L-Merril)***. Campinas. These (PhD in Food Engineering). Food Engineering Faculty. University of Campinas.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. and HUNTER, J.S. 1978. ***Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building***. Wiley. New York.
- CARDOSO, J. M. P., BATTOCHIO, J. R. and BOLINI-CARDELLO, H. M. A. B. 2004. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo

-
- em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24(3), 448-452.
- CIABOTTI, S., BARCELOS, M. F. P., PINHEIRO, A. C. M., CLEMENTE, P. R. and LIMA, M. A. C. 2007. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27(3), 643-648.
- CHIARELLO MARILEUSA D. 2002. **Soja e os alimentos funcionais**. Encontro francobrasileiro de biosciência e biotecnologia. Alimentos Funcionais e nutraceuticos (16 p.). Embrapa Documento 85. Editores Jose Manuel de Sousa e Linda Reis. Brasília.
- CHOU, C. and HOU, J. 2000. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **Intern. J. Food Microbiol.** 56, 113-121.
- CRAVERO, RICARDO ALBERTO. 2000. **Process for manufacturing a biologically active fermented milk product and product obtained by the process**. USPatens 6,033,691, 17 sept. 1998, 7 mar. 2000. Sancor Cooperativas Unidas Limitada.
- DONKOR, O.N. and SHAH, N.P. 2008. Production of β -Glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk. **J. Food Sci. M: Food Microb. Saf.** 73 (1), M15-M20.
- EVANGELISTA, C. M. and REGITANO-D'ARCE, M. A. B. 1997. Spectrophotometric analysis of the lipoxigenase action on soybeans soaked at different temperatures. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 17(3), 270-274.
- FOX, M., PAC, S., DEVANEY, B. and JANKOWSKI, L. 2004. Feeding infants and toddlers study: what foods are infants and toddlers eating?. **J. Am. Diet. Assoc.** 104(2), 22-30.
- GACULA JR. M. and JAGBIR SINGH. 2009. **Statistical Methods in Food and Consumer Research**, 2nd edition. Academic Press Inc..
- GACULA JR. M. 1993. **Design and Analysis of Sensory Optimization**, Wiley-Blackwell Publishing.
- GREEN, B. G., SHAFFER, G. S., and GILMORE, M. M. 1993. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. **Chem Sens.** 18, 683 702
- HASLER, C. M. 1998. Funtional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technol.** 52(11), 63 70.
- HOU, J-W., YU, R-C. and CHOU, C-C. 2000. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Res. Intern.** 33, 393-397.
- LOURENS-HATTINGH, A. and VILJOEN, B.C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. **Int Dairy J.** 11, 1-17.

-
- MACFIE, H. J., BRATCHELL, N., GREENHOFF, K. and VALLIS, L. V. 1989. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effect in halls tests. **J Sens Stud.** 4, n.2, p.129-148.
- MEILGAARD, M., CIVILLE, G. V. and CARR, B. T. 1999. **Sensory Evaluation Techniques.** CRC Press, 387 p.
- MEULLENET JF, XIONG R AND FINDLAY C. 2007. **Multivariate and probabilistic analyses of sensory science problems.** IFT Press. Blackwell Publishing, Ames, IA. 256p.
- MONDRAGÓN B., O. L. 2004. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos.** Campinas. These of Master Degree in Food Engineering. Food Engineering Faculty. University of Campinas.
- MORAES, M. A. C. (1993). **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos.** Ed. Campinas (93 p.). University of Campinas. Campinas.
- MURTI T. W. ; LAMBERET G. ; BOUILLANNE C. ; DESMAZEAUD M. J. and LANDON M. 1993. Croissance des lactobacilles dans l'extrait de soja. **Sci Aliment** 13(3), 491-500.
- OKUBO, K., IJIMA, M., KOBAYASHI, Y., YOSHIKOSHI, M., UCHIDA, T. and KUDOU, S. 1992. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. **Biosci. Biotech. Bioch.**56(1), 99-103.
- PENNA, A.L.B.; OLIVEIRA, M. and BARUFFALDI, R. 1997. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**17(2), 98-101.
- RODRIGUES, M.I. and IEMMA, A.F. 2005. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** Ed. Casa do Pão. (first ed, 326 p). Campinas.
- STATSOFT, INC. 2001. **STATISTICA** (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- SAINT-EVE, A.; PAÇI KORA, E. and MARTIN, N. 2004. Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavoring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies. **Food Qual Prefer.** 15(3), 655-668.
- SANTANA, L. R. R., SANTOS L. C. S., NATALICIO, M.A., MONDRAGON-BERNAL, O. L., ELIAS, E. M., SILVA, C. B., ZEPKA, L.Q., MARTINS, I. S. L., VERNAZA, M.G., CASTILLO-PIZARRO, C. and BOLINI-CARDELLO, H. M. A. 2006. Perfil Sensorial de Iogurte Light, Sabor Pêssego. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 26(3): 619-625.
- SCHUTZ, H. G., and CARDELLO, A. V. 2001. A labeled affective magnitude (LAM) scale for assessing food liking/disliking. **J Sens Stud.** 16, 117 159.

-
- SHELEF, L.A., BAHNMILLER, K.R., ZEMEL, M.E.B. and MONTE, L.M. 1998 Fermentation of soymilk with commercial freeze-dried starter lactic cultures. **J Food Process Pres.** 12(3), 187-195.
- SIGMAN-GRANT, M., WARLAND, R. and HSIEH, G. 2003. Selected lower-fat foods positively impact nutrient quality in diet so free-living Americans. **J. Am. Diet. Assoc.** 103(1), 570-576.
- STONE, H. and SIDEL, J.L. 2004. Descriptive analysis. In: Stone, H.; Sidel, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. Academic Press. (377 p.). London.
- TAMIME Y. and ROBINSON, R. 2001. **Yogurt science and technology**. Woodhead Publishing Limited (Second edition, p.358-359,366-367). Cambridge.
- VICKERS, Z. 1988. Sensory specific satiety in lemonade using a just right scale for sweetness. **J Sens Stud.** 3(1), 1-8.
- VILLANUEVA, N. D. M., and DA SILVA, M. A. A. P. 2009. Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps. **Food Qual Prefer.** 20, 1-12.
- WANG, S. H., MARINHO, C. S. and CARVALHO, E.P. 1994. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. **Pesqui Agropecu Brás.** 29(10), 1593-1601.
- WARD, C.D.W., STAMPANONI-KOEFERLI, C., PICCINALI-SCHWEGLER, P., SCHAEPPPI, D. and PLEMMONS, L.E. 1999. European strawberry yogurt market analysis with a case study on acceptance drivers for children in Spain using principal component analysis and partial least squares regression. **Food Qual Prefer.** 10(4), 387-400.

CAPÍTULO 2.

2ª. Parte

2.2. EQUIVALENCIA DE DOÇURA PARA UMA MISTURA DE EDULCORANTES HIPOCALÓRICOS E SACAROSE EM ALIMENTO SIMBIÓTICO FERMENTADO A BASE DE EXTRATO DE SOJA

Autores: Olga Mondragón-Bernal, Maria Isabel Rodrigues, Francisco Maugeri e Helena Maria André Bolini

Este artigo foi submetido no periódico **CIÊNCIA E AGROTECNOLOGIA** ISSN: 1413-7054 editado pela Editora UFLA- Lavras em 15 de janeiro de 2009.

*"Quem busca a verdade, quem obedece a lei do amor,
não pode estar preocupado com o amanhã." (Gandhi)*

2.2. EQUIVALENCIA DE DOÇURA PARA UMA MISTURA DE EDULCORANTES HIPOCALÓRICOS E SACAROSE EM ALIMENTO SIMBIÓTICO FERMENTADO A BASE DE EXTRATO DE SOJA

RESUMO

A preocupação com a saúde estimula a pesquisa e o desenvolvimento de alimentos com baixas calorias e adoçantes não calóricos. O objetivo deste estudo foi o de obter funções para equivalência de doçura para produto simbiótico fermentado a base de extrato hidrossolúvel de soja adoçado com a mistura de edulcorantes hipocalóricos Acesulfame-k:sucralose, em relação a um produto tradicional adoçado com sacarose na doçura ideal pré-estabelecida. As funções de potência para equivalência de doçura foram $S=69,37C^{(1,14)}$ para a mistura de edulcorantes Acesulfame-k:sucralose e para sacarose $S=0,042C^{(1,28)}$, onde S é a sensação percebida e C a concentração do edulcorante (% m/v) na sobremesa funcional de soja.

Palavras-chave: equivalência de doçura, potência edulcorante, alimentos simbióticos, extrato de soja, análise sensorial.

EQUI-SWEETNESS TO MIXTURE OF SWEETENERS AND SUCROSE IN THE SYMBIOTIC FERMENTED FOOD BASED IN SOYMILK

ABSTRACT

The concerns with health stimulates the search and development of low-carb and light foods, including non-caloric sweeteners. The aim of this work was to get equi-sweetness functions for products with mixture of the low-caloric sweeteners Acesulfame-k:Sucralose compared to traditional product sweetens with sucrose in the ideal sweetness and flavor pre-identified. Through the Potency law it has been shown that the model for magnitude estimation to equi-sweetness mixture of acesulfame-k:sucralose related to an ideal sweetness of sucrose in the symbiotic fermented beverage of soymilk was $S=69,37.C^{(1,14)}$ for mixture of sweeteners and $S=0,042.C^{(1,28)}$ for sucrose, when S is the stimulation detected and C is the concentration of sweetener

Key words: equi-sweetness, law potency sweetness, symbiotic food, soymilk, sensory analysis.

2.2.1. INTRODUÇÃO

Diversas forças motivadoras têm fundamentado o crescente interesse no uso da alimentação como determinante importante da saúde e existe um consenso da estreita relação

entre alimentação, saúde e doença. Com o objetivo da manutenção de boa saúde ao longo da vida, prevenindo o aparecimento de doenças crônicas, como desordens gastrointestinais, cardiovasculares, câncer, osteoporose, assim como a procura de promotores de saúde para a população da terceira idade, recentes pesquisas contribuem na compreensão do tema saúde/dieta, aumentando a demanda de alimentos saudáveis e estimulando a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos, como são os derivados da soja, de baixas calorias e aplicações com adoçantes não calóricos (SIGMAN-GRANT *et al.*, 2003) .

Segundo Marcellini (2005) o gosto doce da sacarose tem alta aceitação entre os consumidores, mas por razões de dieta e saúde são procuradas substâncias alternativas hipocalóricas que a substituam. Para obter êxito na substituição de açúcares por edulcorantes hipocalóricos é necessário que estes sejam seguros à saúde, possuam características sensoriais agradáveis e doçura semelhante à da sacarose. A análise sensorial é a melhor ferramenta para avaliar a aceitação de um edulcorante (Cardello, 2003).

A sucralose (1,6-dicloro-didesoxi- β D frutofuranosil 4 cloro-deoxi- α -D-galactopiranosídeo) é obtida pela cloração da sacarose, de forma seletiva nas posições 1, 4 e 6 da molécula (Marcellini, 2005). Tem um poder edulcorante 600 vezes maior que a sacarose em solução a 5% e não é absorvida pelo organismo, sendo assim isenta de calorias. A sucralose teve seu uso aprovado no Brasil em 1995; é considerada um edulcorante de alta qualidade, com alta potência, de extraordinária estabilidade e com boas características físico-químicas, que permitem sua aplicação em uma grande variedade de alimentos e bebidas. Além disso, foi considerada segura para consumo humano, após inúmeros estudos clínicos (Jenner, 1989). Existem poucas diferenças organolépticas significativas no gosto doce entre a sucralose e a sacarose em bebidas e alimentos, essas pequenas diferenças costumam aparecer em equivalências de doçura mais altas. Tanto a sucralose como o acessulfame K possuem uma ingestão diária aceitável (IDA) de 15 mg/Kg de peso corpóreo (Umbrelino, 2005). O limite máximo para adição de sucralose estabelecido no Brasil em bebidas e alimentos para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares e com informação nutricional complementar, é de 0,045 g/100 g em alimentos e 0,025 g/100mL em bebidas (Brasil, 2001).

Acessulfame-K é quimicamente o sal potássico da sulfonamida cíclica 6-metil,1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido. O potencial do uso do Acessulfame-K é ilimitado, podendo ser utilizado como adoçante de mesa, em bebidas semi-doces, e em bebidas carbonatadas em mistura com outros edulcorantes, para conferir estabilidade e qualidade de doçura. Devido a sua estabilidade à pasteurização, o acessulfame-K é indicado para produtos lácteos e é cerca de 200 vezes mais doce que a sacarose e apresenta gosto amargo residual em altas concentrações

(Moraes, 2008). Seu uso é aprovado em mais de 100 países incluindo os Estados Unidos e a União Européia (Kemp, 2006).

Cada adoçante possui características específicas de intensidade e persistência do gosto doce e presença ou não de gosto residual. Esses fatores são determinantes na aceitação, preferência e escolha por parte dos consumidores (Higginbotham, 1983). Porém, o poder edulcorante teórico estabelecido para cada substância, dificilmente se ajusta à realidade, dado que a sensação doce de cada um, em relação à sacarose, depende de diversos fatores como a composição do alimento que o transporta, a temperatura, o pH, o teor do adoçante, tal como foi comprovado por Tunaley *et al.* (1987). Estes autores avaliaram a doçura equivalente de nove diferentes adoçantes, comparando-os a um padrão de glicose em solução a 5% e houve muita variação nos dados obtidos, em relação aos provadores. Os autores concluíram que esta variação é dependente do tipo do adoçante, pois quanto mais complexa a percepção total, maior é a variação nos resultados.

Alimentos ou bebidas com edulcorantes podem ser rotulados como *light, sugar-free, low-calorie ou reduced-calorie* (Nabors, 2002). Para o seu desenvolvimento é preciso realizar estudos que permitam o conhecimento prévio das concentrações dos adoçantes a serem utilizados e suas doçuras equivalentes em sacarose. O método de estimação da magnitude é muito aplicado nesses casos. Através da representação gráfica dos resultados normalizados e da Lei da potência de Stevens são obtidos modelos de potência edulcorante para diferentes substâncias em relação à sacarose (Moskowitz, 1970, Stone & Oliver, 1969, Cardoso *et al.*, 2004). No método de estimação de magnitude, descrito por Stone & Oliver (1969), os provadores selecionados devem receber uma amostra referência com uma intensidade designada com um valor arbitrário, seguida por uma série de amostras em ordem casualizada, com intensidades maiores ou menores que a referência. Os provadores deverão estimar o poder edulcorante das amostras desconhecidas e atribuir notas a elas, em relação à referência, não se podendo atribuir valor zero a nenhuma amostra.

O dobro de uma determinada concentração de sacarose ou de cloreto de sódio, não vai produzir a sua percepção em dobro, precisando quantificar estas medidas da forma como ela é percebida sensorialmente. Os valores obtidos dos resultados dos provadores e os valores das concentrações avaliadas são normalizados, calculados os logaritmos desses resultados e colocados em um gráfico em coordenadas logarítmicas. Para o adoçante (ou outro composto) é obtida uma reta, a qual obedece à lei de Stevens, ou *power function*: $S = aC^n$, onde **S** é o estímulo percebido, **C** é a concentração do estímulo, **a** é antilog do valor de Y na intersecção, e **n** é o coeficiente angular da reta. Regiões das retas dos adoçantes que estão em mesmo nível, paralelo ao eixo da abscissa, possuem poder edulcorante equivalentes (Moskowitz, 1970).

A soja é reconhecida como um alimento funcional e pode ser usada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa. (Donkor & Shah, 2008, Ciabotti *et al.* 2007, Behrens *et al.*, 2004, Chiarello, 2002). A partir da fermentação do extrato de soja com bactérias lácticas probióticas, como lactobacilos e bifidobactérias, e a presença de agentes prebióticos selecionados, obtém-se um produto simbiótico e uma alternativa de alimento funcional (Mondragón, 2004, Hasler, 1998). Segundo o estudo de Mondragón-Bernal *et al.* (2005), foram determinadas faixas ideais de teor de sacarose em relação à doçura (9,2-11,8%) e ao sabor (11,2-13%) de um alimento simbiótico a base de soja saborizado.

O objetivo do presente estudo foi determinar o poder edulcorante em relação à sacarose de uma mistura de edulcorantes composta por acessulfame-k e sucralose para promoverem a mesma doçura em comparação ao uso da sacarose em uma bebida simbiótica fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja que satisfaça a doçura ideal da bebida.

2.2.2.MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas amostras de bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja (10% m/v - FB Olivebra) formuladas com probióticos (*Lactobacillus acidophilus* sp, *L. casei* subsp *paracasei* sp e *Bifidobacterium longum* SP - Danisco) e prebióticos 4% (m/v) (frutooligossacarídeos -Raftilose®-Orafti e polidextrose -Litesse®-Danisco), mascarante do sabor de soja (quantidade sugerida pelo fabricante Duas Rodas), antiespumante (sílica 0,005% (m/v) - Proceedings) e saborizante leite condensado idêntico ao natural em forma sólida (Duas Rodas), sacarose como adoçante tradicional, edulcorantes hipocalóricos: acessulfame-K e sucralose (Proceedings).

2.2.2.1. Preparação das amostras para testes sensoriais

As amostras foram elaboradas a partir da formulação de misturas de ingredientes sólidos (pó) reconstituídas com água, os frascos com a base líquida foram pasteurizados em autoclave a 116 °C durante 4 minutos e resfriados rapidamente. Os meios foram inoculados assepticamente com 5×10^5 - 5×10^7 UFC/mL de uma mistura padronizada de cultura láctica probiótica (*L. acidophilus* sp:*L. paracasei* subsp:*B. longum* sp). Os meios inoculados foram incubados em estufa a 37 °C, sem agitação, até atingir pH 4,5-5,0 e uma consistência firme. Os produtos fermentados foram estocados sob refrigeração até a realização dos testes sensoriais por no máximo 12 horas. As amostras foram servidas aos provadores em cabines individuais codificadas com números de três dígitos, cada um recebeu 10-15 gramas de cada amostra em recipientes plásticos brancos descartáveis com capacidade para 15 mL. Os testes foram

realizados em laboratório, em condições controladas (temperatura das amostras 12°C, luz branca nas cabines individuais de prova). As amostras foram servidas em blocos casualizados e foi pedido aos provadores que enxaguassem o palato com água à temperatura ambiente, entre uma amostra e outra.

2.2.2.2. Pré-seleção dos provadores para escala de magnitude

Foram pré-selecionados 14 indivíduos, consumidores potenciais de sobremesa fermentada funcional de extrato de soja, cujo poder discriminativo foi avaliado utilizando-se testes triangulares aplicados à análise seqüencial de Wald (Meilgaard *et al.*, 1999). Foram pré-fixados os seguintes parâmetros para a análise da capacidade discriminatória: p_0 = máxima habilidade aceitável= 0,33; p_1 = mínima habilidade aceitável= 0,70; α = probabilidade de aceitar candidato sem acuidade= 0,05; β = probabilidade de rejeitar candidato com acuidade= 0,05. Foram utilizadas amostras de bebida de soja adoçadas com sacarose 3% (m/v) e com edulcorante hipocalórico em proporção 1:1 de sucralose:acesulfame-K, segundo o poder edulcorante teórico de 200 e 600 vezes maior que a sacarose, respectivamente, reportado pela United States Recommended Daily Allowance USRDA (INMETRO, 2008), apresentando diferença significativa entre si em nível de 1%. Foram selecionados os provadores que seqüencialmente diferenciaram três blocos de amostras. O teste também foi utilizado para determinar a similaridade entre amostras adoçadas com sacarose e com mistura edulcorante. Foram elaborados 3 grupos de bebida simbiótica de soja nos sabores leite condensado, morango e pêssego sendo adoçadas com sacarose ou com a mistura edulcorante acesulfame-k:sucralose.

2.2.2.3. Teste de diferença do controle para escolha da amostra referência a ser utilizada na determinação da equivalência de doçura entre sacarose e associação de edulcorantes

Foram selecionados 3 tratamentos com porcentagens de sacarose e de saborizante dentro das faixas do ideal para sabor e doçura ideal obtidas por Mondragón Bernal *et al.* (2005). Os tratamentos foram comparados com uma amostra padrão P formulada com 12% (m/v) de sacarose e 0,09% (m/v) de sabor idêntico ao natural de leite condensado, para satisfazer tanto a doçura ideal quanto o sabor ideal, através do teste de diferença do controle, com 24 provadores. Foi elaborada uma ficha com escala estruturada de nove pontos para indicar o quanto a amostra difere do controle, sendo que o zero indicava nenhuma diferença e nove extremamente diferente. Foi realizada a análise de variância e teste de Dunnett (Dunnett, 1955) para as médias das respostas.

2.2.2.4. Teste de escala de magnitude para equivalência de doçura de uma mistura de edulcorantes em relação a sacarose

Foi utilizado o método de Lei da Potência de Stevens ou de escala de magnitude edulcorante. Foram elaboradas duas séries de 5 amostras, uma com a mistura de edulcorantes hipocalóricos (sucralose e acessulfame-K) e outra com sacarose, utilizando fator de multiplicação de 1,6 (Cardoso *et al.*, 2004.) e foram apresentadas em blocos casualizados a 14 provadores pré-selecionados. Foram comparadas com uma amostra de referência R (amostra P na concentração de sacarose ideal, 12% (p/v), sendo testadas as concentrações de 5, 8, 12, 19 e 31 % (p/v) de sacarose, e 0,009; 0,015; 0,024; 0,038 e 0,061 % (p/v) de mistura acessulfame-K:sucralose (proporção 25:75 w:w).

Neste teste, os provadores selecionados receberam uma amostra referência, R, com intensidade designada por um valor arbitrário de doçura 100, seguida de várias amostras codificadas e casualizadas, com intensidades maiores ou menores que a referência. Foi solicitado aos provadores que estimassem as intensidades de doçura das amostras codificadas em relação à referência. Por exemplo, se a amostra apresentava o dobro da doçura da referência, deveria receber valor 200, se apresentava a metade da doçura, 50 e, assim sucessivamente.

2.2.2.5. Análise Estatística

Os resultados do teste de diferença do controle foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Dunnet a 5% de significância para a comparação entre as médias e o controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 6.0 (Statsoft 2001).

2.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.3.1. Teste triangular para determinar a similaridade entre amostras adoçadas com sacarose e com edulcorantes no teor teórico (mistura de acessulfame-k:sucralose 1:1).

As amostras adoçadas com sacarose e as adoçadas com uma mistura em proporção 1:1 de acessulfame-k:sucralose, foram comparadas através de testes triangulares para três diferentes sabores: leite condensado, morango e pêssego. Houve diferença significativa ($p \leq 0,1$) entre as amostras adoçadas com sacarose e as adoçadas com acessulfame-k+ sucralose para todos os sabores e comentários de um alto sabor residual amargo, causado provavelmente pelo acessulfame-k. Os provadores acharam as amostras adoçadas com acessulfame-k:sucralose muito doces comparadas com as de sacarose. No entanto, observaram que as amostras

adoçadas com sacarose foram mais saborosas e sem sabor residual amargo. Assim, optou-se por realizar um teste de potência edulcorante, ou escala de magnitude com nova proporção dos edulcorantes baseada nos produtos de soja semelhantes do mercado, sendo de 1:9 (segundo a potência edulcorante teórica) ou sua equivalente em massa de 25:75 m/m de acessulfame-K:sucralose, respectivamente.

2.2.3.2. Escolha da amostra referência a ser utilizada na determinação da equivalência de doçura entre sacarose e associação de Acessulfame-K e Sucralose

Os resultados do teste de diferença do controle aparecem na Tabela 1 e a análise de variância na Tabela 2. O tratamento controle C (12% (m/v) sacarose e 0,09% (m/v) saborizante), foi comparado com três tratamentos elaborados dentro das faixas do ideal para sabor e para doçura reportadas por Mondragón-Bernal *et al.* (2005).

Tabela 1. Teste de Dunnet da análise sensorial de diferença do controle, para sabor e doçura de sobremesa fermentada de extrato hidrossolúvel de soja, sabor leite condensado.

Tratamento	% Sac	% Sabor	Média na escala de diferença em relação à amostra controle	MDS= 0,86*
Diferença do controle em relação à doçura				
A	10,5	0,15	2,10± 2,04	0,05 ns
B	11,5	0,10	2,39± 2,27	0,24 ns
C	11,0	0,08	2,33± 1,95	0,18 ns
Controle	12,0	0,09	2,15± 2,13	
Diferença do controle em relação ao sabor				MDS= 0,82*
A	12,8	0,12	2,63± 2,51	0,05 ns
B	12,0	0,16	2,53± 2,35	0,05 ns
C	12,5	0,15	2,53± 2,03	0,04 ns
Controle	12,0	0,09	2,57± 2,40	

* MDS: Mínima Diferença Significativa pelo Teste de Dunnet para estabelecer diferença significativa entre o padrão e a amostra analisada. % Sac= percentagem de sacarose. ns = diferença não significativa ($p < 0,05$).

De acordo com o teste de médias de Dunnet não foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos e o controle tanto para sabor como para doçura, o que significa que a formulação do controle poderia ser utilizada para o teste de escala de magnitude de doçura, pois não alteraria significativamente o gosto e satisfaria tanto o sabor quanto a doçura

ideal. A porcentagem de sacarose de referência (R) para o teste de escala de magnitude foi estabelecida após realização do teste de diferença do controle.

Observa-se na Tabela 2 que o F calculado foi menor que o F tabelado para os tratamentos indicando que não existem diferenças significativas entre os tratamentos e o controle a 5 % de significância em ambas as respostas Doçura e Sabor. O F calculado foi maior que o F tabelado para os provadores indicando que há diferença significativa entre eles a 5% de significância, isso decorre do fato que os provadores utilizam diferentes partes da escala para descrever suas apreciações.

Tabela 2. ANOVA para teste de diferença do controle das amostras de sobremesa funcional fermentada de soja no sabor leite condensado.

	Fonte de Variação	Graus de Liberdade	SQ	SQ Médio	F calculado
Doçura	Tratamentos	3	1,35	0,45	0,22
	Provadores	23	267,89	11,65	5,82
	Resíduo	69	137,97	2,00	
	Total	95	407,21		
Sabor	Tratamentos	3	0,15	0,05	0,03
	Provador	23	370,70	16,12	8,68
	Resíduo	69	128,13	1,86	
	Total	95	498,98		

F tabelado tratamentos = $F_{0,05;3;69} = 2,75$. F tabelado provadores = $F_{0,05;23;69} = 1,69$.

2.2.3.3. Determinação da estimação de magnitude para análise da equivalência de doçura de uma mistura de edulcorantes em relação à sacarose

Foi realizado teste sensorial com uso de escala de magnitude para o produto *light* através do método de Lei da potência, para se determinar a concentração da mistura edulcorante acessulfame-k:sucralose. Com a proporção de acessulfame-k:sucralose previamente estabelecida e aplicando a Lei da Potência, determinou-se o modelo para estimativa da magnitude para a mistura acessulfame-k e sucralose em relação à sacarose e saborizante ideal na sobremesa fermentada de soja natural (12% (m/v) de sacarose e 0,09% (m/v) de saborizante).

Os valores de magnitude de doçura dados pelos provadores foram convertidos para valores logarítmicos e expressos usando media geométrica. As curvas para concentração versus resposta sensorial, foram correspondentes a uma função de potência com a seguinte característica $S = aC^b$, onde S é a sensação percebida, C é a concentração do estímulo, a é o anti-logaritmo do valor do interseção na ordenada e b é o coeficiente angular da reta, segundo a Figura 1.

Assim, a função de potência determinada para equivalência de doçura da mistura acessulfame-K e sucralose em relação à porcentagem de sacarose ideal numa bebida fermentada de soja, foi $S = 69,37C^{(1,14)}$. No mesmo produto, foi obtido modelo para sensação percebida para sacarose como uma função de potência do tipo $S = 0,042.C^{(1,28)}$.

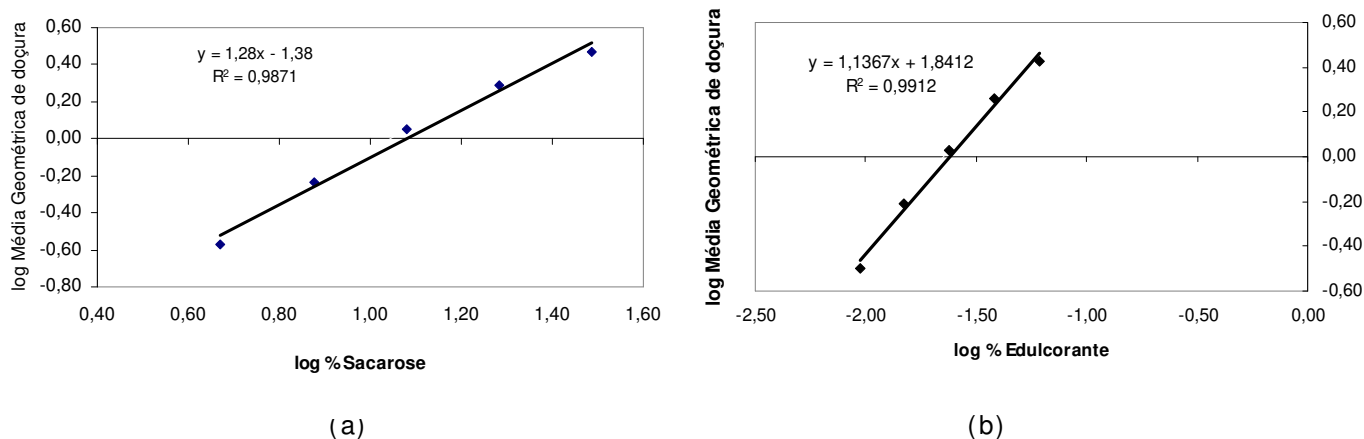


Figura 1. Determinação dos coeficientes da lei de potencia para: (a)sacarose (b) edulcorantes.

Sendo assim para se obter a mesma sensação a 12% de sacarose ($S = 1,011$), deve-se utilizar 0,024% da mistura de acessulfame k e sucralose (25:75 w:w). A potência foi definida como sendo o número de vezes em que um composto ou mistura de compostos é mais doce que sacarose, baseado em sua doçura equivalente, assim, a potência edulcorante da mistura corresponde a 490,01.

2.2.4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que para obtenção de uma bebida simbiótica fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de leite condensado na versão *diet* (sem sacarose) e, portanto redução calórica, em doçura equivalente à ideal para o consumidor (12% de sacarose) é necessária a adição de 0,024 % da associação de acessulfame k e sucralose (25:75 w:w) no produto, sendo que, essa associação de edulcorantes utilizados é 490,01 vezes mais doce que a sacarose no produto estudado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq/PEC-PG e a Proceedings Ltda. pelo auxílio concedido e às companhias de ingredientes OLVEBRA, DANISCO, Duas Rodas e Proceedings forneceram gratuitamente as matérias primas para realizar este estudo.

2.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHRENS, J.H., ROIG, S.M. & SILVA, M.A.A.P. (2004) Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. *Acta Alimentaria*, 33(2), 101-109.
- BRASIL (2001). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/Min. da Saúde. Resolução n. 3 de 2 de Janeiro de 2001. **Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos edulcorantes estabelecendo seus limites máximos para alimentos**. Diário oficial da União, Brasília.
- CARDELLO, H. M. A. B., TASHIMA E.H. (2003). Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine Max*, L. Merrill) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. *Boletim CEPPA*, 21(2), 409-428.
- CARDOSO, J. M. P., BATTOCHIO, J. R., CARDELLO, H. M. A. B. (2004). Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(3): 448-452.
- CIABOTTI, S., BARCELOS, M. F. P., PINHEIRO, A. C. M., CLEMENTE, P. R., LIMA, M. A. C. (2007). Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* v 27, n.3, p.643-648,
- CHIARELLO M. D. (2002) **Soja e os alimentos funcionais**. Encontro francobrasileiro de biosciência e biotecnologia. Alimentos Funcionais e nutraceuticos. Embrapa Documento 85. Editores Jose Manuel de Sousa e Linda Reis. Brasília, , 16 p.
- DONKOR, O.N. & SHAH, N.P. (2008). Production of β -Glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science M:Food Microbiology and Safety*, 73 (1), M15-M20.
- DUNNET CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association* 50:1096-1121
- HASLER. (1998). Funtional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*. v. 52, n.11, p. 63 70
- HIGGINBOTHAM, J. D. (1983). Recent developments in non-nutritive sweeteners. In: GREMBY,T. H.; PARKER, K. J.; LINDLEY, M. G. **Developments in sweeteners-2**. London: Applied Science. p. 119-55.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL INMETRO (2008). **Edulcorantes e suas características**. Disponível em:

-
- < <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/adocantes.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2008.
- JENNER, M.R. (1989). Unveiling its properties and applications. In: GREMBY T.H. **Progress in sweeteners**. New York: Elsevier Applied Science, p.121-142.
- KEMP, S.E. (2006). **Low calorie sweeteners. Optimising sweet taste in foods**. Kemps Research Solutions Ltda, U K.
- MARCELLINI, P.S. (2005). **Caraterização sensorial por perfil livre e análise tempo-intensidade de suco de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) reconstituído e adoçado com diferentes edulcorantes**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimetnos. Universidad Estadual de Campinas. Campinas.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. (1999). **Sensory Evaluation Techniques**. BOCA RATON, Florida: CRC Press,. 387p.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O. L., COSTA, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. (2005). **Escolha da doçura e sabor ideal de um alimento fermentado de soja**. Anais do congresso 6º SLACA, Campinas, 09 novembro de 2005.
- MONDRAGÓN B., O. L. (2004). **Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e probióticos**. Orientador: Francisco Maugeri. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- MORAES, P. C. B. T. (2008). **O impacto do uso de edulcorantes em bebidas de café solúvel e café torrado/ moído como substitutos da sacarose**. Tese doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- MOSKOWITZ, H.R. (1970). Ratio scales of sugar sweetness. **Perception & psychophysics**, v.7, p.315-20.
- NABORS, L.O. (2002). Sweet choices: Sugar replacements for foods and beverages. **Food Technology**. v. 56, n.7, p.28-34.
- SIGMAN-GRANT, M.; WARLAND, R.; HSIEH, G. (2003). Selected lower-fat foods positively impact nutrient quality in diet so free-living Americans. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103, n.1, p.570-576.
- STONE, H. & OLIVER, S.M. (1969). Measurement of the relative sweetness of selected sweeteners and sweetener mixtures. **Journal of Food Science**, v.34, p.215-22.
- TUNALEY, A., THOMSON, D.M.H., McEWAN, J.A. (1987). Determination of equi-sweet concentrations of nine sweeteners using a relative rating technique. **International Journal of Food Science and. Technology**, v. 22, p. 627-351.

UMBRELINO, D.C. (2005). **Caracterização sensorial por análise descritiva quantitativa e análise tempo-intensidade de suco e polpa de manga (Mangifera indica L.) adoçados com diferentes edulcorantes.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas-SP, 190 p.

CAPITULO 3.

3. ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DE ALIMENTOS SIMBIÓTI COS A BASE DE EXTRATO DE SOJA

Parte dos resultados deste capítulo foram apresentados como:

Reologia e composição probiótica de alimentos simbióticos de soja adoçados com sacarose ou edulcorantes durante a vida-de-prateleira. Autores: Olga L. Mondragón-Bernal; Fátima A. A. Costa; Maria Isabel Rodrigues; Francisco Maugeri. Apresentado como resumo e pôster no **XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Curitiba, 8 a 11 de Outubro de 2006

“Se o amor não fosse maior que o ódio, de há muito o mundo e o homem já teriam deixado de existir” (Arthur de Távola)

3. ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DE ALIMENTOS SIMBIÓTICOS A BASE DE EXTRATO DE SOJA

RESUMO

Com a crescente demanda de alimentos funcionais, o extrato hidrossolúvel de soja tem sido amplamente estudado para elaboração de bebidas fermentadas. Para se obter um produto com qualidade, é necessário que as características funcionais, físico-químicas e sensoriais pré-estabelecidas se conservem durante a vida de prateleira. Neste estudo foram acompanhados durante 50 dias de estocagem as contagens individuais de probióticos, o pH, características reológicas, mudanças na cor e sinérese de sobremesas simbióticas fermentadas (contendo probióticos e prebióticos) a base de soja, adoçadas com sacarose ou com edulcorantes hipocalóricos (*light*). Verificou-se que os produtos oscilam entre fluidos do tipo Herschel-Bulkley e pseudoplásticos. Os simbióticos elaborados com sacarose apresentam menor sinérese, viscosidade aparente e maior contagem da bifidobactéria, porém, a queda mais acentuada do pH que os produtos elaborados com edulcorante. Nos produtos sem sacarose o desenvolvimento dos lactobacilos foi favorecido. As populações de probióticos mantiveram-se em níveis aceitáveis, no entanto apresentam maior variabilidade nos produtos *light*. Os produtos elaborados com preparados de frutas comerciais (morango e pêssego) apresentaram maior viscosidade aparente, mas, também instabilidade quanto à sinérese e cor, provavelmente causado pela sensibilidade dos corantes à acidez e à oxidação.

Palavras-chave: vida de prateleira, reologia, probióticos, alimento simbiótico, extrato de soja.

3.1. INTRODUÇÃO

A soja é uma boa fonte de proteínas, lipídeos e outros nutrientes, e devido a sua grande abundância no Brasil, tem sido feitos importantes esforços para o seu aproveitamento na fabricação de produtos apetecíveis e por tanto de maior aceitação.

A presença de fatores bifidogênicos no extrato de soja, como os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, assim, como a presença de outros açúcares (sacarose, frutose, glicose, galactose), vitaminas do complexo B e fontes de nitrogênio das proteínas hidrossolúveis da soja, fazem do extrato hidrossolúvel de soja um meio complexo e ótimo substrato para crescimento das bifidobactérias (Chiarello, 2002, Chou *et al.*, 2000, Hou *et al.*, 2000, Scalabrini *et al.* 1998) e alguns lactobacilos (Mondragón, 2004).

Alimentos que contêm probióticos e prebióticos são denominados simbióticos (Mattila-Sandholm et al 2002, Crittenden et al 2001, Ferreira e Teshima, 2000, Roberfroid et al, 1998, Ziemer e Gibson, 1998). O principal objetivo de utilizar prebióticos é favorecer o desenvolvimento de probióticos do gênero *Bifidobacterium* (Crittenden e Playne, 1996). Os frutooligossacarídeos (FOS) cumprem com as condições dos prebióticos (Fooks,1999), sendo que recentemente, tem-se atribuído à polidextrose também efeitos prebióticos (Jie *et al.*, 2000).

O extrato de soja e os isolados protéicos possuem diversas propriedades funcionais como emulsificantes, espumantes e espessantes e também como agentes gelificantes. As frações protéicas da soja são caracterizadas de acordo com as suas propriedades de sedimentação ou massa molecular. Os componentes de baixa massa molecular (2S) são compostos inibidores de tripsina, citocromo e outras globulinas. As duas frações principais possuem pesos moleculares elevados, sendo que 20-35% (m/m) das proteínas são referenciadas como globulina 7S (β -conglucininina) e 25-35% (m/m) como globulina 11S (glicinina), essas últimas são as que precipitam a pH 4,5. Ambas são muito complexas, consistindo de diversas subunidades que facilmente se associam e dissociam sob diferentes condições de pH, força iônica e tratamento térmico (Braga, 2006).

Mondragón 2004, observou que em produtos simbióticos fermentados a base de extrato de soja as máximas contagens de probióticos foram atingidas na faixa de pH de 4,3 a 5,5, em todas as fermentações. Além disso, quando os meios atingiram valores de pH inferiores ou iguais a 5,8-6,0, ocorreu a desnaturação das proteínas solúveis da soja e observou-se uma mudança na consistência e na cor da bebida pela formação de um coágulo, estado no qual as proteínas são mais digeríveis e com consistência de iogurte. Porém, observou-se que o pH das amostras estocadas sob em refrigeração por vários dias decrescia e causava sinérese, além de mudanças no sabor, aparência e consistência.

Segundo Moura e Germer (2004), os alimentos processados sofrem diversas reações de transformações no período de vida útil, tais como alterações na cor, sabor, textura, qualidade nutricional e funcional, mesmo tendo a deterioração microbiana sob controle. Os fatores que influenciam a velocidade das reações de transformação são vários: temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor de oxigênio, estado da matriz sólida, presença de catalisadores e outros. Além disso, os alimentos, por advirem de material biológico, são sistemas extremamente complexos, nos quais as diversas reações de deterioração acontecem paralelamente, com diferentes cinéticas, sendo difícil a previsão com precisão da vida-de-prateleira.

Segundo Teixeira-Neto & Moura (*apud* Moura e Germer, 2004) durante a formulação dos produtos alimentícios, normalmente, são agregadas substâncias químicas que visam controlar as reações de deterioração, além de conferir certas características funcionais a esses alimentos, ou mesmo melhorar o seu conteúdo nutricional. Do ponto de vista de conservação dos alimentos, esses aditivos são muito importantes e devem ser considerados na avaliação da vida-de-prateleira dos produtos.

A reologia é amplamente usada na indústria de alimentos como, por exemplo, na determinação da funcionalidade de ingredientes, no desenvolvimento de produtos, controle de qualidade, estudos de vida-de-prateleira, determinação da textura do alimento correlacionando análise sensorial e medidas reológicas, entre outros. Todo material apresenta uma resposta a uma força externa entre duas extremidades do comportamento ideal: um sólido elástico e um líquido viscoso. Um líquido viscoso ideal obedece à lei de Newton. A maior parte dos alimentos comporta-se como um material viscoelástico, ou seja, dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo, um corpo sólido pode apresentar propriedades da fase líquida e um material líquido pode mostrar propriedades de um corpo sólido (Steffe, 1996). O comportamento viscoelástico de alimentos é estudado largamente em reômetros que promovem cisalhamento na amostra (força tangencial). Além disto, é possível a caracterização do produto a baixas ou altas deformações, independentemente do tipo de força aplicada. A maioria das caracterizações reológicas é realizada em escoamento em estado estacionário, já que a viscosidade é considerada a propriedade mais importante do material. A viscosidade representa a medida da resistência ao escoamento quando uma tensão de cisalhamento é aplicada (Braga, 2006).

O fenômeno chamado sinérese é causado pela liberação espontânea de água do gel acompanhada pela redução do seu volume e intensificado por mudanças na temperatura, valor de pH e fatores mecânicos. Os rearranjos na rede produzidos por forças atrativas entre as moléculas de proteína ou micelas agrupadas podem levar à formação de ligações intermoleculares adicionais e, conseqüentemente, à contração do gel com expulsão de líquido. A suscetibilidade à sinérese tende a diminuir com o aumento da matéria sólida do iogurte. A sinérese embora comum em produtos fermentados ainda é considerada um defeito pelos consumidores (Jaros *et al.*, 2002, Antunes *et al.*, , 2004, Haberbek *et al.*, 2007)

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento durante a vida-de-prateleira de diferentes formulações de sobremesas simbióticas fermentadas, a base de extrato de soja, contendo ou não preparados de fruta e sacarose. Foram observadas as mudanças que aconteceram nas propriedades microbiológicas e físico-químicas após 50 dias de estocagem.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Preparação das amostras para estudo da vida-de-prateleira

Foram avaliadas amostras de bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja 10% (m/v - FB Olivebra) formuladas com os probióticos *L. acidophilus* sp, *L. casei* subsp *paracasei* sp e *B. longum* sp., prebióticos 4% (m/v) (frutooligossacarídeos -Raftilose®- e polidextrose -Litesse®), mascarante de soja (quantidade sugerida pelo fabricante Duas Rodas) e antiespumante (sílica 0,005% m/v - Proceedings). Foram elaborados 2 grupos de bebida: um adoçado com sacarose e outro adoçado com associação dos edulcorantes acessulfame-K e sucralose, sendo que para cada grupo foram preparadas 3 bebidas: uma sem saborizante (*in natura*), uma no sabor morango e uma no sabor pêssego, sendo estas duas últimas elaboradas com preparados contendo pedaços de fruta (fabricados por Cargill). Os preparados de frutas são constituídos de: água, polpa de morango ou pêssego, fibras insolúveis (fibra de trigo), edulcorantes artificiais como ciclamato de sódio e aspartame, aroma artificial de pêssego ou morango, espessante goma guar, amido modificado, corante natural urucum ou artificial vermelho ponceau e conservante sorbato de potássio.

Foi analisada amostra comercial Biosoja (Batavo) para efeitos comparativos. Os produtos contem proteína isolada de soja, fermento lácteo e culturas probióticas de *Lacobacillus lactis* e *Bifidobacterium lactis*, além de preparado de coco e pêssego constituídos de: fruta desidratada, água, açúcar, amido, aroma idêntico ao natural de pêssego ou coco, urucum como corante natural, edulcorantes, sorbato de potássio, gelatina como estabilizante. I

A nomenclatura adotada para este estudo foi:

- Natural *Light* (N-L): simbiótico elaborado sem saborizante, sem sacarose, adoçado com edulcorantes hipocalóricos.
- Natural Sacarose (N-S): simbiótico elaborado sem saborizante e adoçado com sacarose.
- Morango *Light* (P-L): simbiótico elaborado com preparado de morango contendo pedaços de fruta, sem sacarose, adoçado com edulcorantes hipocalóricos.
- Morango Sacarose (M-S): simbiótico elaborado com preparado de morango contendo pedaços de fruta, adoçado com sacarose.
- Pêssego *Light* (P-L): simbiótico elaborado com preparado de pêssego contendo pedaços de fruta, sem sacarose, adoçado com edulcorantes hipocalóricos.
- Pêssego Sacarose (P-S): simbiótico elaborado com preparado de pêssego contendo pedaços de fruta, adoçado com sacarose.

As misturas dos ingredientes em pó, de acordo com a formulação a ser testada, foram reconstituídas com água, adicionaram-se os preparados de fruta (quantidade sugerida pelo fabricante); sendo posteriormente os frascos com a base líquida pasteurizados em autoclave a

116 °C por 4 minutos e resfriados rapidamente. Os meios foram inoculados assepticamente com 5×10^5 - 5×10^7 UFC/mL de uma mistura padronizada de cultura láctica probiótica (*L. acipophilus* sp : *L. paracasei* subsp:*B. longum* sp) e incubados a 37 °C, sem agitação, até atingir pH 5,0-5,5 e uma consistência firme. Os produtos fermentados foram mantidos sob refrigeração a 3-8 °C. Foram retiradas amostras a 0, 10, 20, 30, 45 e 50 dias de vida-de-prateleira e congeladas para posteriores análises em triplicata.

3.2.2. Metodologia analítica

3.2.2.1. Determinação do pH

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

3.2.2.2. Medida de Sinérese

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

3.2.2.3. Contagem de colônias

Foi feito plaqueamento em profundidade em meio Agar MRS com 0,01% azul de anilina, incubação por 72h a 37°C em aerobiose e anaerobiose (Mondragón *et al.*, 2005).

3.2.2.4. Determinação das propriedades reológicas

As propriedades reológicas das amostras foram analisadas através do reômetro Carri-Med Rheometer CSL² TA Instruments com prato cônico 4 cm, 1,58^º com controle de tensão. fator de tensão: 0,0597, fator de deformação: 29,0 e truncamento: 53 microns. Os testes realizados em triplicata e os modelos reológicos foram ajustados e selecionados pelo coeficiente de correlação (R^2) e teste de Qui² (valor da dispersão para duas variáveis de escala nominal), com os dados das segundas subidas. Os modelos utilizados estão na Tabela 1.

Tabela 1. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada

Tipo de Modelo	Replicatas Ajuste ao Modelo	μ_{ap}
Newtoniano	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma}$, $\tau_0 = 0$	$\mu = \tau / \dot{\gamma} = k$
Pseudoplástico	Ajuste lei da potência $\tau = k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$	$\mu_{ap} = k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$
Plástico de Bingham	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma} + \tau_0$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (to / \dot{\gamma}) + k$
Herschel-Bulkley	Ajuste $\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (to / \dot{\gamma}) + k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$

k= índice de consistência, n= índice de escoamento ou fluência, τ_0 = Tensão inicial de deformação. (*), μ_{ap} = viscosidade aparente (Pa.s) calculada a 100 s^{-1} de esforço de deformação, sendo este o valor médio utilizado para mastigação de alimentos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para este estudo, quando o pH atingiu valores inferiores a 5,5, o produto foi resfriado e mantido a 3-10 °C. Fez-se então o acompanhamento das propriedades reológicas, contagem de células, pH e sinérese das formulações durante 50 dias de armazenamento. Observou-se que,

em todos os casos aconteceram mudanças no comportamento reológico, as contagens, a sinérese e o pH relacionadas com o tempo de estocagem e o pH de interrupção da fermentação.

Os modelos ajustados para os produtos simbióticos Natural *Light* (N-L) e Natural-Sacarose (N-S) são mostrados nas Tabelas 2 e 3. Observa-se que os produtos N-L (Tabela 2) apresentaram característica de fluidos pseudoplásticos, porém após 45 dias de estocagem se comportaram como Herschel-Bulkley. Isso aconteceu quando atingiram pH inferior a 4,1. Já os produtos elaborados com sacarose (Tabela 3) apresentaram comportamento de fluidos Herschel-Bulkley ao longo dos 50 dias de vida-de-prateleira e tiveram as menores porcentagens de sinérese (16-33%) em relação aos produtos light (28-52%). Quando o pH abaixa os parâmetros reológicos τ_0 , k e μ_{ap} aumentam tanto para os produtos *light* quanto com sacarose.

Tabela 2. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Natural Light (N-L) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (PA)	k (s^{-1})	n	μ_{ap}^{**} (Pa.s)	pH	Sinérese %
Pseudoplástico	0		0,121 ^b	0,857 ^a	0,063	5,62	51,7%
Pseudoplástico	10		0,182 ^b	0,795 ^a	0,071	4,63	47,3%
Pseudoplástico	20		0,154 ^b	0,800 ^a	0,061	4,35	29,8%
Pseudoplástico	30		0,159 ^b	0,811 ^a	0,067	4,24	28,9%
Herschel-Bulkley	45	0,755 ^a	0,182 ^b	0,843 ^a	0,096	4,09	28,3%
Herschel-Bulkley	50	1,100 ^a	1,313 ^a	0,584 ^a	0,205	4,07	26,6%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a $100 s^{-1}$, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Tabela 3. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Natural Sacarose (N-S) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	k (s^{-1})	n	μ_{ap}^{**} (Pa.s)	pH	Sinérese %
Herschel-Bulkley	0	0,945 ^{bcd}	0,160 ^b	0,839 ^a	0,086	5,58	21,6%
Herschel-Bulkley	10	0,440 ^{cd}	0,261 ^b	0,761 ^{ab}	0,091	4,47	33,1%
Herschel-Bulkley	20	1,357 ^{ab}	0,509 ^{ab}	0,749 ^{ab}	0,174	4,18	24,3%
Herschel-Bulkley	30	0,438 ^d	1,101 ^a	0,562 ^b	0,151	3,99	19,2%
Herschel-Bulkley	45	1,404 ^{ab}	0,676 ^{ab}	0,688 ^{ab}	0,174	3,91	17,9%
Herschel-Bulkley	50	1,562 ^a	0,610 ^{ab}	0,684 ^{ab}	0,158	3,89	15,9%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a $100 s^{-1}$, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Segundo Braga (2006) a formação de uma rede protéica é o resultado da agregação das moléculas de proteína, a partir da desnaturação previa destas e/ou da acidificação do sistema,

como ocorre durante a fermentação láctica por culturas bacterianas. As interações complexas entre proteínas e polissacarídeos são o resultado das propriedades físicas de cada biopolímero puro em solução. Comumente em produtos alimentícios, as soluções de proteína seguem comportamento Newtoniano, enquanto que os polissacarídeos apresentam comportamento newtoniano em baixas concentrações e pseudoplástico com o aumento desta. Pelos resultados encontrados neste estudo, o comportamento reológico do tipo Herschel-Bulkley é devido às interações existentes entre as proteínas da soja, os polissacarídeos (FOS e polidextrose) e à presença ou não da sacarose nas amostras fermentadas.

Segundo Neves (2008) a rede formada em géis de proteína é resultante do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, bem como das forças repulsivas e de atração entre cadeias próximas. Entre as forças atrativas se encontram fundamentalmente as interações hidrofóbicas (maximizadas por temperaturas elevadas), forças eletrostáticas entre grupos com cargas contrárias na mesma proteína, pontes de Ca^{++} e outros íons divalentes, ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto, todas estas interações presentes nas proteínas da soja (Torrezan, 2007). O grau de distribuição de todas essas forças varia em função da natureza da proteína, do solvente e de várias etapas do processo de gelificação (Clark & Lee-Tuffuel, 1986). A presença de outros co-solutos, como os açúcares, também influencia as interações biopoliméricas, uma vez que estes também modificam a qualidade do solvente como a presença de sais, devido à modificação do balanço hidrofóbico-hidrofílico na superfície da proteína e, conseqüentemente, da afinidade destas pelo meio (Belyakova *et al.*, 2003, Dickinson, 2003).

Quanto ao pH nota-se que a queda foi mais acentuada nos produtos com sacarose, iniciando em 5,58 e atingindo 3,89, valor que pode afetar negativamente o sabor do produto. A disponibilidade do substrato sacarose aumenta a atividade metabólica dos probióticos.

Quando os pH foram inferiores a 4,35, próximo do ponto isoelétrico das proteínas da soja -pH 4,5- (Sgarbieri, 1996), a porcentagem de sinérese diminuiu consideravelmente em ambos os produtos: *light* e com sacarose. Este fenômeno poderia ser explicado pela queda do pH que modifica a solubilidade das proteínas da soja e a retenção de água do gel. O pH e a força iônica do meio modificam a qualidade do solvente e, conseqüentemente, afetam as interações proteína-proteína, proteína-polissacarídeo e biopolímero-solvente, exercendo influência direta sobre a estrutura da rede polimérica (Belyakova *et al.*, 2003). Na presença de polissacarídeos (como os oligossacarídeos e polidextrose presentes nas sobremesas simbióticas) as propriedades de desnaturação de algumas proteínas são alteradas ou a capacidade de formação dos géis modificada. Segundo Braga (2006), em solução as proteínas podem atrair e repelir os polissacarídeos dependendo da sua origem, do pH, da força iônica, da temperatura,

da concentração ou do cisalhamento a que são submetidas. As propriedades do gel protéico, como textura e sinérese, podem ser alteradas não só pela adição de polissacarídeos como por variações na força iônica e pH do sistema.

Em sistemas contendo sacarose, a adição do açúcar promove o fortalecimento da rede do gel, com uma malha mais firme e coesa e aumentando a capacidade de retenção de água (Neves, 2008), o que explica o fato de as amostras elaboradas com sacarose apresentarem menores porcentagens de sinérese em relação às amostras *light*.

Comparando os resultados de sinérese com os obtidos por outros autores, há semelhança com os observados por Antunes *et al.* (2004) nos que o armazenamento proporcionou maior estabilidade à dessoragem de iogurtes elaborados com leite em pó desnatado, sendo que um iogurte elaborado com *S. thermophilus*, *L. delbruekii ssp bulgaricus* e *L. acidophilus* e *B. longum* obteve no início e final da estocagem 11% e 7% (m/v) de sinérese respectivamente. No estudo de Saxelin *et al.* (1999) foi observada maior sinérese nos leites fermentados por cepas probióticas. Já Haberbeck (2007) encontrou que a sinérese durante 14 dias foi de 47% (m/v) para iogurte de soja probiótico (sem adição de sacarose), valor bem próximo aos obtidos neste estudo para os simbióticos N-L (Tabela 2) e P-L (Tabela 4) entre 0 e 20 dias de estocagem, sendo também as maiores porcentagens observadas.

Nas Tabelas 4 e 5, para os simbióticos Pêssego *light* (P-L) e Pêssego-Sacarose (P-S) observam-se comportamentos similares a N-L e N-S em relação ao pH. O comportamento reológico foi igual para P-L e N-L, porém para P-S é diferente, pois iniciou como fluido Herschel-Bulkley e a partir do 10^o dia tornou-se pseudoplástico, até que no 50^o dia voltou a ser Herschel-Bulkley, quando o pH atingiu 3,9, sendo que houve também um incremento do índice de consistência k.

Em relação à sinérese, as amostras com preparado de pêssego e de morango iniciaram a vida-de-prateleira com baixa ou nula sinérese, mas ao longo do tempo aumentou notoriamente, contrario ao observado nas amostras *in natura*. No entanto, P-S foi o simbiótico com menor sinérese, que aumentou ao longo da estocagem de 1,5% até 13% no 50^o dia, sendo os menores valores de sinérese entre os tratamentos estudados. Acredita-se que essa porcentagem tão menor em relação às outras amostras, deve-se às características próprias da fruta e/ou à composição do preparado de pêssego (contendo diversos ingredientes gelificantes e espessantes), que alterou a retenção de umidade do meio e mostrou uma melhor interação com o sistema proteínas da soja - polissacarídeos. Diferente às interações das amostras com preparado de morango e natural.

Tabela 4. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Pêssego Light (P-L) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	K (s^{-1})	N	μ_{ap}^{**} (Pa)	pH	Sinérese (s^{-1})
Pseudoplástico	0		0,090 ^b	0,892 ^a	0,055	5,67	25,9%
Pseudoplástico	10		0,148 ^a	0,828 ^a	0,067	4,81	44,2%
Pseudoplástico	20		0,108 ^b	0,901 ^a	0,069	4,64	45,8%
Pseudoplástico	30		0,106 ^b	0,877 ^a	0,060	4,40	47,3%
Herschel-Bulkley	45	0,3636 ^a	0,149 ^{ab}	0,873 ^a	0,087	4,21	25,6%
Herschel-Bulkley	50	0,7260 ^b	0,229 ^a	0,759 ^a	0,083	4,17	24,0%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a $100 s^{-1}$, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Tabela 5. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Pêssego Sacarose (P-S) durante a vida-de-prateleira sob refrigeração.

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	k (s^{-1})	N	μ_{ap}^{**} (Pa)	pH	Sinérese (s^{-1})
Herschel-Bulkley	0	0,744 ^a	0,510 ^b	0,730 ^a	0,154	5,10	1,5%
Pseudoplástico	10		0,654 ^b	0,674 ^a	0,146	4,29	5,0%
Pseudoplástico	20		0,592 ^b	0,682 ^a	0,137	4,18	9,5%
Pseudoplástico	30		1,177 ^b	0,663 ^a	0,249	4,09	8,2%
Pseudoplástico	45		1,096 ^b	0,660 ^a	0,229	3,96	10,9%
Herschel-Bulkley	50	1,927 ^a	3,645 ^a	0,486 ^b	0,361	3,90	13,2%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a $100 s^{-1}$, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Nas Tabelas 6 e 7 mostram-se os resultados de vida-de-prateleira para Morango *Light* (M-L) e Morango-Sacarose (M-S) respectivamente. Observa-se que o pH decresceu rapidamente nos dois produtos até atingir valores próximos a 3,8. O comportamento reológico é anormal para M-L, já que iniciou a vida-de-prateleira como pseudoplástico, aos 10 e 20 dias se comportou como Herschel-Bulkley e a partir de 30 dias voltou a ser pseudoplástico. M-L foi o simbiótico com menor sinérese, quase nula no início da estocagem (0,4%), porém aumentou rapidamente a partir do 10^o dia atingindo 36%, ainda em valores de pH superiores a 4,0. M-S também teve aumento na sinérese atingindo um máximo de 26% porém somente no 50^o dia, quando o pH atingiu 3,8, contrário ao comportamento dos outros simbióticos com sacarose e *light*. Este comportamento foi devido provavelmente ao tipo de preparado de fruta e sua composição, interagindo de um modo diferente com as proteínas da soja e formando um gel menos estável.

De acordo com os resultados obtidos parece existir relação entre o tipo de fluido, o pH e a sinérese, sendo que em fluidos Herschel-Bulkley quanto maior é o τ_0 , menor é a sinérese e isto acontece principalmente em valores de pH mais baixos e nos produtos contendo sacarose.

Os parâmetros reológicos e seu comportamento em relação ao tempo de estocagem e ao pH do meio também podem ser analisados através dos gráficos do Apêndice 2.

Tabela 6. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Morango Light (M-L) durante a vida-de-prateleira

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	k (s^{-1})	n	μ_{ap}^{**} (Pa.s)	pH	Sinérese (%)
Pseudoplástico	0		0,360 ^a	0,710 ^{bc}	0,095	5,43	0,4%
Herschel-Bulkley	10	0,364 ^a	0,130 ^{bcd}	0,893 ^a	0,083	4,45	27,1%
Herschel-Bulkley	20	0,261 ^a	0,181 ^b	0,852 ^a	0,094	4,15	35,6%
Pseudoplástico	30		0,165 ^{bc}	0,837 ^{ab}	0,078	3,98	35,4%
Pseudoplástico	45		0,323 ^a	0,727 ^{bc}	0,092	3,89	35,8%
Pseudoplástico	50		0,264 ^{abcd}	0,741 ^b	0,080	3,83	34,3%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a 100 s⁻¹, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Tabela 7. Modelos reológicos ajustados ($R^2 > 0,9999$) para simbiótico Morango Sacarose (M-S) durante a vida-de-prateleira

Modelo	Tempo (dias)	τ_0 (PA)	k (s^{-1})	n	μ_{ap}^{**} (PA.s)	pH	Sinérese (%)
Herschel-Bulkley	0	0,645	0,719 ^b	0,671 ^a	0,164	5,09	0,9%
Pseudoplástico	10		1,439 ^a	0,589 ^a	0,217	4,26	12,8%
Pseudoplástico	20		1,333 ^a	0,613 ^a	0,225	4,11	17,8%
Pseudoplástico	30		1,118 ^a	0,641 ^a	0,214	3,99	18,7%
Pseudoplástico	45		1,139 ^a	0,636 ^a	0,213	3,87	10,2%
Pseudoplástico	50		1,060 ^a	0,599 ^a	0,167	3,79	26,4%

* letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

** Calculado a 100 s⁻¹, taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

Observa-se que n é maior que k nos produtos light, demonstrando uma tendência de menor viscosidade e maior escoamento. Já para produtos com sacarose k e n são da mesma ordem de grandeza. A constante k apresenta um aumento brusco aos 50 dias de estocagem para N-L e P-S. Observa-se que na faixa de pH de 3,7 a 4,3 o índice de consistência, k, apresenta os maiores valores e o índice de escoamento ou fluência, n, apresenta os menores valores. Pode-se então esperar que os produtos fermentados nesta faixa de pH durante a vida-de-prateleira provavelmente serão produtos com melhores e maiores consistências e viscosidades aparentes.

Segundo Neves (2008) as propriedades físicas das soluções de biopolímeros parecem ser altamente dependentes da presença de um co-soluto como a sacarose e do processamento térmico, sendo relacionada, segundo Braga (2006), à conformação molecular apresentada em

solução, como formação de duplas hélices, de ultra-agregados e desordenamento molecular, este também pode alterar as características do gel. Em estudos verificou-se que a adição de sacarose em soluções tratadas termicamente na presença de alguns polissacarídeos como a goma xantana, afetou as propriedades reológicas de soluções anisotrópicas ou bifásicas. Foi observado também que o comportamento de misturas de polissacarídeos e proteínas depende do tipo de cada um, como por exemplo, a adição de goma xantana enfraqueceu geis térmicos de proteína isolada de soja (SPI), aumentando a tensão e deformação de ruptura em géis de SPI acidificados. Também foi observada por esta autora a formação de uma estrutura esponjosa com o aumento do conteúdo de proteína, sendo observada incompatibilidade em concentrações de SPI maiores do que 5%. Esta incompatibilidade também foi observada em outras soluções mistas de proteína e polissacarídeo, como jataí e gelana (Braga, 2006).

Neste estudo o co-soluto é a sacarose que se mostra como o ingrediente que mais afeta positivamente o produto simbiótico quanto à estabilidade durante vida-de-prateleira, proporcionando menores porcentagens de sinérese, maiores viscosidades aparentes, comportamento Herschel-Bulkley e favorecendo a viabilidade da bifidobactéria. No entanto, parece que o sistema proteínas da soja-frutooligosacarídeos/polidextrose (proteína-polissacarídeos) do simbiótico não possui a capacidade suficiente, sem ser incompatível, para formar um gel mais firme que proporcione características reológicas ideais e retenção de umidade satisfatórias.

Teles e Flôres (2007) encontraram comportamento tanto de fluido Herschel-Bulkley em iogurtes elaborados com leite em pó, quanto pseudoplásticos quando adicionados com diferentes espessantes, onde os parâmetros reológicos oscilaram entre 0,12 e 2,27 Pa para τ_0 , 0,04 e 2,57 para k e 0,19 e 0,73 s⁻¹ para n, os iogurtes não continham sacarose. Neste estudo o τ_0 oscilou entre 0,44 e 1,93 Pa, k entre 0,09 e 3,64 s⁻¹ e n entre 0,49 e 0,90.

Na Figura 1 apresenta-se a viabilidade dos probióticos durante a vida-de-prateleira durante o período de 50 dias de estocagem sob refrigeração. Observou-se que as contagens totais são superiores a 10⁷ UFC/mL chegando a atingir 10¹⁰ UFC/mL em todos os simbióticos. Em relação às contagem de bifidobactérias, estas se mantiveram entre 10⁶ e 10⁹ UFC/mL, sendo o produto pêssego-sacarose (P-S) o que atingiu as maiores contagens durante toda a vida-de-prateleira. Em geral as bifidobactérias são mais viáveis nos produtos com sacarose do que nos *light*. Os lactobacilos comparados às bifidobactérias competem favoravelmente pelo substrato e atingem contagens bem superiores.

Os simbióticos com sacarose apresentaram maior contagem da bifidobactéria, cujo crescimento é fortalecido pela maior disponibilidade dessa fonte de carbono, o que também

explica a queda do pH mais rápida em relação aos produtos elaborados com edulcorante. Nos produtos com edulcorante, o desenvolvimento dos lactobacilos foi favorecido.

Para efeito de comparação com os produtos formulados foi utilizado um produto comercial fermentado a base de soja (Biosoja-BATAVO) nos sabores pêsego e coco (com pedaços de fruta) contendo *Bifidobacterium* e *Lactobacillus lactis*, e os ingredientes amido modificado e gelatina (espessantes e agentes anti-sinérese). No produto comercial foi observada mínima sinérese (<0,5%) após 20 dias de vida-de-prateleira e valor de pH de 4,3.

Os resultados das propriedades reológicas dos produtos com 20 dias de vida-de-prateleira são apresentados na Tabela 8. Observou-se que o produto comercial tem comportamento de fluido Herschel-Bulkley, sendo que o τ_0 , k e μ_{ap} apresentaram valores bem maiores e o parâmetro n valor menor que os tratamentos realizados neste estudo, explicado pelo fato de os produtos comerciais possuírem amido modificado e gelatina.

Em relação às populações de lactobacilos, o produto comercial teve contagens de 8,3 logUFC/mL e as amostras N-S, N-L, P-S, P-L, M-S e M-L, em média de 9,5 logUFC/mL. As contagens de bifidobactérias foram semelhantes para todos os produtos comparados, sendo de aproximadamente 7,5 logUFC/mL.

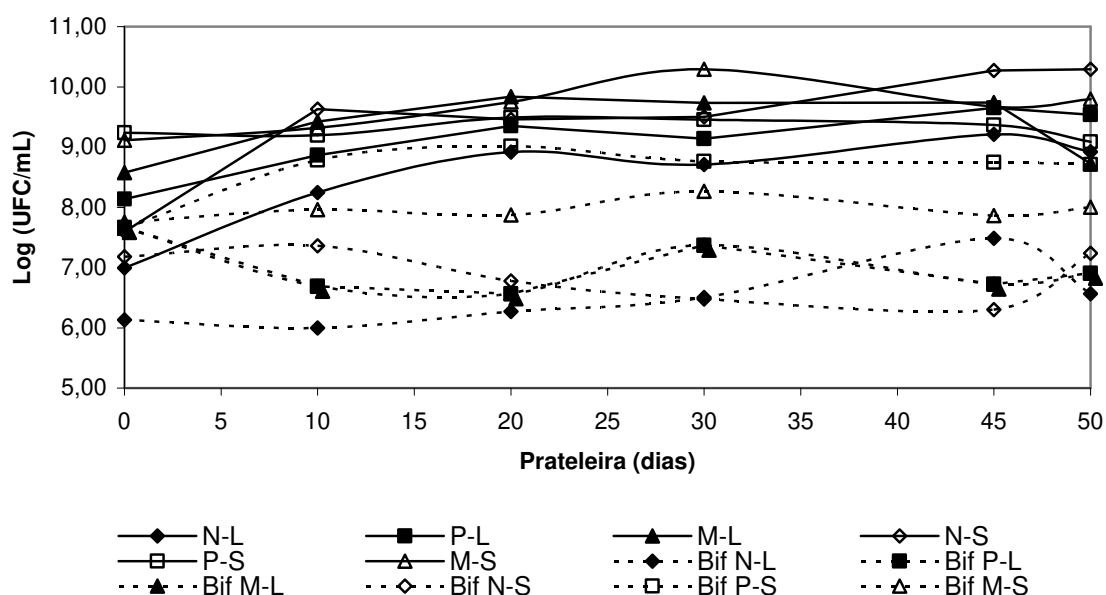


Figura 1. Viabilidade de bactérias probióticas lactobacilos e bifidobactérias (Bif) em UFC/mL nas bebidas de soja adoçadas com sacarose (S= sacarose) ou com edulcorantes hipocalóricos (L= light) nos sabores: natural (N), morango (M) e pêsego (P) (contendo pedaços de fruta).

Tabela 8. Modelos e parâmetros reológicos para amostra comercial e para as amostras N-S, N-L, P-S e P-L após 20 dias de vida-de-prateleira.

Amostra	Modelo reológico	Tempo (dias)	Média			μ_{ap} (Pa.s) (100 s ⁻¹)*
			τ_0 (Pa)	K	N	
C-Pêssego**	Herschel-Bulkley	20	3,231	2,169	0,495	0,338
C-Coco*	Herschel-Bulkley	20	3,948	2,525	0,501	0,293
N-S	Herschel-Bulkley	20	1,506	0,265	0,833	0,137
N-L	Pseudoplástico	20		0,154	0,800	0,061
P-S	Pseudoplástico	20		0,592	0,682	0,137
P-L	Pseudoplástico	20		0,110	0,901	0,069

* Taxa média de deformação para mastigação de alimentos.

** Amostras Comerciais (Biosoja-BATAVO). N-S= Natural com sacarose, N-L= Natural *light*, P-S= Pêssego com sacarose e P-L= Pêssego *light*.

Na Figura 2, são mostradas algumas imagens das mudanças que aconteceram na cor e a sinérese nos simbióticos submetidos a 50 dias de vida de prateleira.

Nos produtos elaborados com preparado de fruta sabor morango as mudanças na cor foram mais perceptíveis ao longo da estocagem, porém os produtos com preparado de pêssego também sofreram modificações na cor, principalmente nos primeiros 10 dias de vida-de-prateleira. Observa-se a separação da cor do produto em duas fases, sendo que a parte superior mantém cor rosa entre 10 e 50 dias, enquanto na fase inferior dos frascos tonalidade bege clara (semelhante aos produtos *in natura*). Provavelmente a causa seja a presença de oxigênio que reduz o desenvolvimento dos cultivos na parte superior. Não foi feita medida do pH em cada fase, porém acredita-se que a massa probiótica tenha precipitado ao longo do tempo de estocagem para o fundo dos frascos aumentando a acidez na fase inferior causando alteração do pigmento, já que alguns corantes, como o ponceau, são sensíveis à presença de agentes redutores como os ácidos orgânicos e o SO₂ (BASF, 2009).

Segundo Prado e Godoy (2003) a principal reação que ocorre no extrato de urucum (presente nos preparados de fruta) é a oxidação, particularmente importante quando o pigmento é adicionado em matriz alimentícia. A velocidade em que ocorre a perda de cor devido à oxidação depende da temperatura, da luminosidade e, principalmente, da disponibilidade de oxigênio no meio. Segundo a Sociedade Brasileira de Corante Naturais (Ghiraldini, 2009) o urucum entre pH 1 e 3 apresenta cor vermelho alaranjado e entre pH 3 e 7 cor laranja/tangerina. Outra possibilidade é que os corantes contenham frações lipossolúveis (BASF, 2009) sendo menos densos que outros componentes do produto e com o tempo de estocagem

ficarem suspensos na fase superior. Sugere-se realizar novos estudos para identificar as causas do problema, como determinações de pH, solubilidade dos corantes e análise quantitativa da cor em cada etapa.

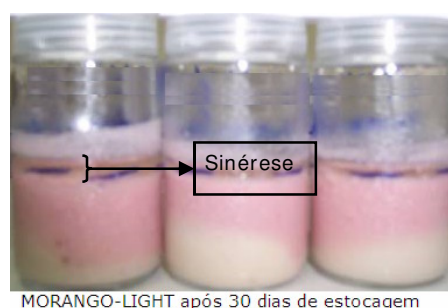


Figura 2. Mudanças na cor e presença de sinérese em simbiótico morango light durante vida-de-prateleira.

3.4. CONCLUSÃO

A sacarose foi o ingrediente que afetou mais positivamente os produtos simbióticos quanto à estabilidade durante vida-de-prateleira, proporcionando menores porcentagens de sinérese, maiores viscosidades aparentes, comportamento de fluidos do tipo Herschel-Bulkley e favorecendo a viabilidade da bifidobactéria. A sinérese foi muito maior nos produtos *light* em geral. Nas amostras elaboradas com preparados de fruta a sinérese foi consideravelmente menor, pela presença de outros agentes espessantes e antisinérese. Os produtos elaborados com sacarose apresentam maior viscosidade aparente e a presença dos preparados de morango e pêssigo também teve influência positiva na medida μ_{ap} . Houve tendência em todas as amostras pelo aumento da μ_{ap} durante vida-de-prateleira. Os índices de escoamento (n) foram maiores que os índices de consistência (k) em produtos *light*. Os parâmetros k e n apresentam grandezas semelhantes em produtos com sacarose porem muito inferiores quando comparados aos produtos comerciais. Os maiores índices de consistência (k) foram obtidos quando o pH atingiu entre 4,3 e 3,7. A queda de pH é eminente em todos os tratamentos principalmente nos

produtos com sacarose. Durante os primeiros 10 dias e nos últimos 10 dias de estocagem ocorrem as maiores mudanças em todos os aspectos estudados. A bifidobactéria teve maiores contagens em produtos com sacarose, e foram mantidas durante a vida-de-prateleira (6-7 log UFC/mL em produtos *light* e entre 7 e 9 log UFC/mL em produtos com sacarose), no entanto, lactobacilos continuaram aumentando (7-10 log UFC/mL) ao longo da estocagem. Os produtos elaborados com preparados de frutas comerciais (morango e pêsego) apresentaram maior instabilidade quanto à cor, provavelmente causado pela susceptibilidade dos corantes e pedaços de fruta à oxidação. A presença de polissacarídeos como os frutooligosacarídeos e a polidextrose adicionados junto com o co-soluto sacarose no sistema proteínas de soja-água, fermentado por bactérias lácticas probióticas, é compatível, mas não o suficiente para formar sistemas proteína-polissacarídeos-solvente satisfatórios que mantenham a estabilidade dos produtos durante toda a vida-de-prateleira em relação à sinérese e características reológicas. Porém foi confirmado que a presença de outros agentes antisinérese e espessantes, como os encontrados nos produtos comerciais analisados, fornece melhor estabilidade. Por isso, os teores de polissacarídeos-proteína, a substituição da sacarose em produtos *light*, a adição de outros polissacarídeos como agentes de corpo e antisinérese, a estabilidade do pH, a melhora das características reológicas e a manutenção da viabilidade dos probióticos, precisam ser estudados e melhorados nos produtos simbióticos a base de soja.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq/PEC-PG e a Proceedings Ltda. pelo auxílio concedido e às companhias de ingredientes OLVEBRA, DANISCO, Duas Rodas e Proceedings que forneceram gratuitamente as matérias primas para realizar este estudo.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A. E. C., CAZETTO, T. F., BOLINI, H. M. A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2004
- BASF Nutrição. **Os corantes alimentícios**. http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/119.pdf . Acessado em outubro de 2009.
- BELYAKOVA, L. E., ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., Dickinson, E., MERINO, L. M., TSAPKINA, E. N. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 31, p. 31-46, 2003.

-
- BRAGA, A. L. M. **Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos**. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- CHIARELLO, M. D. **Soja e os alimentos funcionais**. Encontro francobrasileiro de biosciência e biotecnologia. Alimentos Funcionais e nutraceuticos (16 p.). Embrapa Documento 85. Editores Jose Manuel de Sousa e Linda Reis. Brasília, 2002
- 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.
- CLARK, A.H., LEE-TUFFUEL, C.D. **Gelation of globular proteins**. Em Functional Properties of Food Macromolecules. JR. Mitchell and D.A. Ledward (ED). Elsevier Applied Sci., New York., 1986
- CRITTENDEN, R.G., PLAYNE M. J. Production, properties and applications or food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p. 353-261, 1996.
- CRITTENDEN R.G., MORRIS L.F., HARVEY M.L., TRAN L.T., MITCHELL H.L., PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.268-278, 2001.
- FERREIRA, C.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.
- GHIRALDINI, E. **Corantes naturais mais comumente usados na indústria de alimentos**. Sociedade Brasileira de Corantes Naturais. <http://www.uesb.br/sbcn/comumente.html>, acessado em outubro de 2009.
- HABERBECK L. U., SANT`ANNA, E. S., PRUDÊNCIO, E. S., CUNHA, T. M., CASTRO, F. P.. **Avaliação do índice de sinerese de iogurte de soja probiótico mantido sob refrigeração**. Anais da 6ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis: 16 a 19 de Maio de 2007.
- HOU, J-W., YU,R-C.,CHOU,C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**. v.33. p. 393-397. 2000.
- JAROS, D., ROHM, H., HAQUE, A., BONAPARTE, C., KNEIFEL, W. Influence of the starter culture on the relationship between dry matter content and physical properties of set-style yogurt. **Milchwissenschaft**, v. 57,n. 6, p. 325-327, 2002

-
- JIE Z, BANG-YAO L, MING-JIE X, HAI-WEI L, ZU-KANG Z, TING-SONG W, CRAIG SA. Estudo sobre os efeitos da ingestão de polidextrose sobre as funções fisiológicas em chineses. **American Journal of Clinical and Nutrition**. v. 72, p. 1503-1509, 2000.
- NEVES, E. S. **Efeito da adição de co-solutos na reologia de géis lácteos acidificados** Orientador: Rosiane Lopes da Cunha. Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos Campinas, 2008.
- MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, 12, 173-182, 2002.
- MONDRAGÓN B, O L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos**. Orientador: Francisco Maugeri. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp. 2004.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; COSTA, F.; RODRIGUEZ, M.I.; MAUGERI, F. **Metodologia para Contagem Diferenciada de Lactobacilos e Bifidobactérias em Mistura**. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Recife, PE, Brasil, 2005.
- MOURA, S. C. S. R., GERMER, S. P. M. **Reações de Transformação e Vida-de-Prateleira de Alimentos processados**. Manual Técnico No. 6. Terceira edição. Campinas: ITAL, 2004, 92 p.
- PRADO, M. A., GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**., v.14, n.2, p. 237-250, 2003
- SAXELIN, M., GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Food Science and Technology**. v. 10, n.12, p. 387-392, 1999.
- SCALABRINI, P, ROSSI, M., SPETTOLI, P., MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 39. p. 213-219, 1998.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.
- STEFFE, J F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing, 1996, p. 1-93.
- TELES, C. D., FLÔRES, S. H. Influência da adição de espessantes e leite em pó nas características reológicas do iogurte desnatado. **B.CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 247-256 jul./dez. 2007.
- TORREZAN, R. **Efeito do processamento à alta pressão nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos**. Campinas: 2007.

Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos).Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

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

ZIEMER, C.J. e GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics, and synbiotics, in the functional food concept - Perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, 8, 473-479, 1998.

CAPÍTULO 4.

4. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM EXTRATO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO - ESTUDOS CINÉTICOS.

Parte dos resultados deste capítulo foram publicados como:

1) *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharides (EPS) production and growth in soybeans water extract synbiotic beverage. Authors: Olga Mondragón-Bernal, Juliana Horita, Fatima Costa, Francisco Maugeri. 13th European Congress on Biotechnology, in Barcelona, Spain, the 16-19 September 2007. Abstracts / **Journal of Biotechnology**, v.131S, S133 S187, 2007.

2) Estabilidade de bebida fermentada de soja na presença de exopolissacarídeo produzido por *L. Rhamnosus* durante vida-de-Prateleira. Autores: Horita, Juliana; Mondragón-Bernal, Olga; Costa, Fátima; Maugeri, Francisco. Publicado como trabalho completo nos anais do **XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos** SINAFERM Curitiba 2007.

“O Homem é do tamanho do seu sonho” (Fernando Pessoa)

4. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM EXTRATO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO - ESTUDOS CINÉTICOS.

RESUMO

Produtos lácticos ou a base de soja, fermentados com bactérias lácticas, apresentam problemas de estabilidade durante a vida de prateleira, causados pela atividade dos microrganismos vivos ali presentes. Os exopolissacarídeos produzidos por algumas bactérias lácticas têm sido recentemente estudados como uma solução alternativa a problemas como a sinérese e para melhorar propriedades sensoriais como textura, viscosidade e consistência. Após triagem, em meio MRS e extrato de soja, de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos, o *Lactobacillus rhamnosus* LR32 foi escolhido e seu crescimento estudado em cultura pura e mista. Durante 25 dias de vida de prateleira foram realizadas análises de viabilidade das bactérias, sinérese, pH, consumo de açúcares, viscosidade e teor de exopolissacarídeos em bebidas fermentadas de soja. Não foi observada relação direta entre o teor de EPS, a redução da sinérese e/ou aumento da viscosidade dos fermentado por *L. rhamnosus* LR32. No entanto, a presença desse lactobacilo junto à sacarose no simbiótico, não só melhora as características funcionais do produto pela presença de uma nova linhagem probiótica, mas também favorece a estabilidade do produto em relação à sinérese e comportamento reológico especialmente, porém, os produtos possuem consistência e viscosidade inferiores.

4.1. INTRODUÇÃO

Tem-se demonstrado que probióticos, prebióticos (como os oligossacarídeos) e simbióticos modificam a composição da microbiota intestinal, restaurando o balanço microbiano e, conseqüentemente, o potencial benéfico à saúde, sendo considerados alimentos funcionais. As substâncias prebióticas são ingredientes alimentícios não digeríveis, fermentados por grupos selecionados de bactérias benéficas; sua influência positiva na microbiota intestinal tem sido testada em vários estudos, em que o uso de espécies probióticas, junto com substâncias prebióticas, fornece um efeito combinado, chamado "simbiótico" (Roberfroid *et al.*, 1998).

Um grande número de novas espécies de lactobacilos e bifidobactérias têm sido isolados de amostras fecais de grupos etários, identificadas geneticamente, visando à aplicação como probióticos. Desde a década de 1980 tem-se observado, em muitos países, um incremento de marcas com produtos (fermentados ou não) que contêm bifidobactérias originárias de humanos, usando um único gênero ou uma combinação com outras bactérias lácticas, como *Lactobacillus*

spp, e culturas de iogurte em forma de misturas de cultivos *starter* na preparação de produtos funcionais (Tamime *et al.*, 1995).

As culturas *starter* fermentam açúcares para produzir ácido láctico, que serve para acidificar o produto, preservá-lo, e conferir-lhe sabor. Também hidrolisam proteínas, alterando a textura do produto (Batt, 1999) e algumas possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS) quando fermentadas em meios apropriados (Tuinier *et al.*, 2000, Gorret *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007).

Diversos autores reportam que espécies produtoras de EPS são utilizadas na produção de leites fermentados para melhorar suas propriedades reológicas (de Vuyst *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002; Shihata & Shah, 2002; Champagne *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007). De fato, em vez de usar aditivos como melhoradores da textura, estabilizantes, emulsificantes, gelificantes ou agentes anti-sinérese em alimentos fermentados, pode ser conveniente usar bactérias lácticas produtoras de EPS como culturas *starter* (Smitinont *et al.*, 1999). No concernente à segurança alimentar, pode ser interessante eliminar o uso desses aditivos e substituí-los por EPSs produzidos por BAL nas culturas *starter*, e, dado que os EPSs são produzidos *in situ* durante o processamento do produto, estes não são considerados como ingredientes (Turnier *et al.*, 2000, Tiekling *et al.*, 2003).

Tem sido atribuído a algumas bactérias lácticas produtoras de EPS efeito benéfico à saúde (Chabot *et al.*, 2002). Os lactobacilos são comumente empregados como *starters* na fabricação de produtos lácteos, entre estes *Lactobacillus rhamnosus ssp* é uma espécie reconhecidamente produtora de EPS com potencial probiótico (Dupont *et al.*, 2000, Macedo *et al.*, 2002, Champagne *et al.*, 2006). Outras espécies com potencial de produção de EPS são *Lactococcus lactis ssp* (Turnier *et al.*, 2000, Champagne *et al.*, 2006, Grattepanche *et al.*, 2007); *Leuconostoc ssp.*, *Leuconostoc fructosum*, *Leuconostoc mesenteroides ssp* (Santos *et al.*, 2000, Hernalsteens, 2002, Champagne, *et al.*, 2006); *Pediococcus acidilactici* var (Smitinont *et al.*, 1999); e *Propionibacterium* como *Propionibacterium freudenreichii ssp* (Jan *et al.*, 2000, Gorret *et al.*, 2003, Tharmaraj e Shah, 2004, Leverrier *et al.*, 2005), tendo este último um crescente interesse pelos seus efeitos estimulantes sobre probióticos e por ser também produtores de vitamina B12 (Tharmaraj e Shah, 2004).

Segundo Grattepanche e colaboradores (2007), a produção de EPS por culturas em misturas de lactobacilos foi 3 vezes menor que em cultura pura de *L. rhamnosus* RW-9595M. Os EPS interagem com as micelas de caseína, melhorando a textura de iogurte, incrementando a viscosidade e diminuindo a suscetibilidade à sinérese (Hess *et al.*, 1997; Grattepanche *et al.*, 2007).

Durante a fermentação de meios complexos, como o extrato de soja e leite, por bactérias lácticas, o ácido láctico produzido causa agregação das partículas de proteínas (globulinas) levando à formação de um gel frágil. O gel no qual as células bacterianas, lactose e outros componentes menores ficam retidos, é uma estrutura de rede altamente complexa de proteínas e EPS (Goh *et al.*, 2005). A separação cuidadosa do EPS dos componentes não-EPS, particularmente, proteínas, lactose e células se faz necessária (Cerning, 1990), já que a inclusão de cada um desses componentes pode influenciar os resultados dos métodos químicos empregados para a total determinação de carboidratos (Goh *et al.*, 2005).

Bebidas fermentadas de soja contendo probióticos e prebióticos (alimento simbiótico) apresentam, após a fermentação pelas bactérias lácticas, queda do pH que lhes confere características sensoriais como viscosidade e acidez. É necessário que os produtos fermentados conservem suas características sensoriais durante a vida de prateleira, mas tem-se observado que o pH continua decrescendo, com conseqüente sinérese (Mondragón-Bernal, 2004).

Pelas razões anteriormente expostas, este trabalho teve por objetivo estudar alguns microrganismos produtores de EPS e selecionar microrganismos com melhores características de crescimento no meio extrato de soja enriquecido com agentes prebióticos e adoçado ou não com sacarose para produção de EPS, visando obter produtos simbióticos mais estáveis durante a estocagem sem requerer do uso de aditivos químicos para esse fim.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Culturas Lácticas e Probióticas

Foram estudadas as linhagens de bactérias lácticas:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRRL B-1821 USDA Agricultural Research Service-USA
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL B-634- USDA Agricultural Research Service-USA
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD88 Danisco - Brasil
- *Pediococcus acidilactici* NRRL B-1117.- USDA Agricultural Research Service-USA
- *Pediococcus acidilactici* FLAV43 Danisco - Brasil
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* NRRL B-4327 USDA Agricultural Research Service-USA
- *Leuconostoc lactis* NRRL B-3468 - USDA Agricultural Research Service-USA
- *Leuconostoc fructosum* NRRL B-2041 - USDA Agricultural Research Service-USA
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* NRRL B-3252 - USDA Agricultural Research Service-USA
- *Lactobacillus rhamnosus* LR32 Danisco-Brasil

- *Lactobacillus acidophilus* LA 5 Chr. Hansen - Brasil
 - *Bifidobacterium lactis* Bb12 Chr Hansen - Brasil
- E as linhagens probióticas padrão (Mondragón-Bernal, 2004):
- *Lactobacillus acidophilus* LAC 4 Danisco - Brasil
 - *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LBC 81 Danisco- Brasil
 - *Bifidobacterium longum* BL04-300B Danisco - Brasil

4.2.2. Meio de cultura

Agar MRS + 0,01% azul de anilina elaborado segundo (Mondragón-Bernal, 2004 e 2005, De Man *et al.*,1960) e modificado com adição de sacarose 120 g/L e 60g/L de extrato hidrossolúvel de soja.

4.2.3. Propagação, preparação do inóculo e determinação da concentração de células

Foram realizadas segundo metodologia adaptada e meios sugeridos da ATCC (2006), como representado na Figura 1 e Tabela 1.

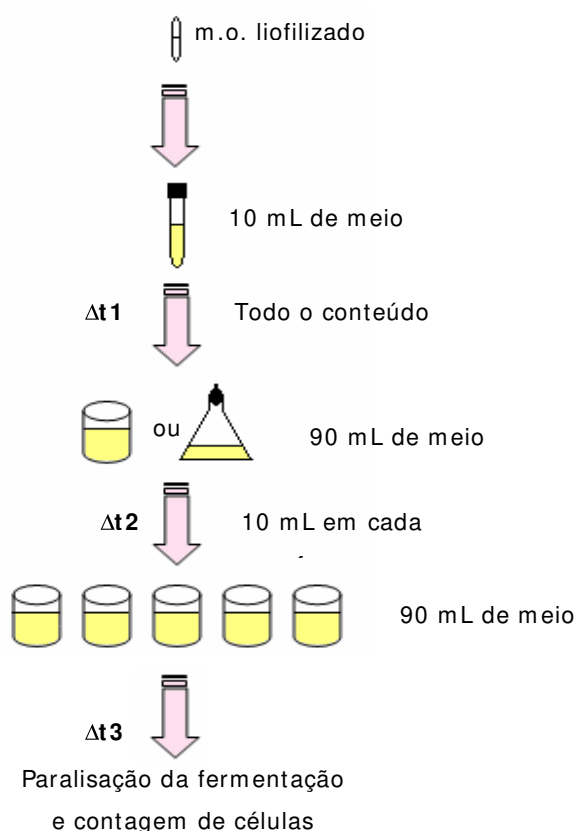


Figura 1. Esquema da propagação e contagem de células dos microrganismos puros.

A linhagem liofilizada foi suspensa em 10 mL do meio de propagação, após um intervalo de tempo (Δt_1), foi adicionada a mais 90 mL de meio e incubado por um intervalo de tempo (Δt_2), 10 mL deste cultivo foram repicados em 5 frascos contendo 90 mL de meio de propagação e incubados por intervalo de tempo (Δt_3) até observação de turbidez no meio. No Δt_3 a fermentação foi paralisada e foi realizada contagem de células. Estes propagados foram utilizados posteriormente como inóculo para fermentação em extrato de soja. A turbidez foi determinada por comparação visual com o meio de propagação sem fermentar e com o meio fermentado pela linhagem *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LBC81, pela sua conhecida capacidade de crescimento nesse meio (Mondragón-Bernal, 2004).

Tabela 1. Condições e tempo total de propagação individual das linhagens de bactérias lácticas

Linhagem	Meio	Temperatura (°C)	Condições de oxigênio	0,3% ác	Δt_1 (h)	Δt_2 (h)	Δt_3 (h)
				ascórbico* (17,5%)			
NRRL B-1821	MRS + L-cisteína	37	Aerobiose	Não	20	72	48
NRRL B-634	MRS + L-cisteína	37	Aerobiose	Não	72	72	72
MD88	MRS + L-cisteína	30	Aerobiose	Não	20	72	48
NRRL B-1117	MRS + L-cisteína	37	Anaerobiose Facultativa	Sim	20	24	24
FLAV43	MRS + L-cisteína	37	Anaerobiose Facultativa	Sim	20	24	24
NRRL B-4327	CMM	30	Anaerobiose	Sim	120	168	72
NRRL B-3468	MRS + L-cisteína	30	Aerobiose	Não	24	48	48
NRRL B-2041	MRS + L-cisteína	30	Aerobiose	Não	24	48	72
NRRL B-3252	MRS + L-cisteína	30	Aerobiose	Não	24	48	96
LR32	MRS + L-cisteína	37	Micro aerobiose	Sim	24	36	24
LAC4	MRS + L-cisteína	37	Micro aerobiose	Sim	48	48	48
LBC81	MRS + L-cisteína	37	Micro aerobiose	Sim	48	48	48
LA5	MRS + L-cisteína	37	Micro aerobiose	Sim	48	48	48
BL04	MRS + L-cisteína	37	Anaerobiose	Sim	48	48	48
Bb12	CMM	37	Anaerobiose	Sim	72	72	72

* Adicionado para diminuir o potencial de oxi-redução do meio, favorecendo o crescimento dos microrganismos anaeróbios, anaeróbios facultativos e micro-aeróbios.

4.2.4. Triagem para bactérias produtoras de hidrocolóides

A triagem foi realizada seguindo a metodologia de Peixoto (2006), modificando os meios para plaqueamento. As linhagens foram cultivadas em meio MRS, substituindo-se a glicose por 120 g/L de sacarose e adicionando-se 0,01% de azul de anilina e 6% de extrato hidrossolúvel de soja (esterilizados separadamente). Foi feito esgotamento em placa, e

observação da presença colônias gomosas características semelhantes às de *Xantomonas campestris*, indicadoras de produção de EPS.

4.2.5. Crescimento da linhagem *L. rhamnosus* LR32 e ou mistura de probióticos padrão em extrato hidrossolúvel de soja

Ao extrato hidrossolúvel de soja (EHsoja- PROVESOL FV Olivebra) 10% (m/v), adicionou-se sílica como antiespumante (5 ppm-Proceedings), FOS (2%(Raftilose-95®-Orafti) e polidextrose (2%- Litesse ®-Danisco), com e sem sacarose (12%), foi reconstituído com água, pasteurizado a 116 °C por 4 min, resfriado, inoculado com *Lactobacillus rhamnosus* LR32 e/ou mistura padrão de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC81, *L. acidophilus* LAC 4, *B. longum* BL04, incubado, sem agitação, por 16 h a 37 °C, em triplicata, retirando-se amostras a cada 4 h. As amostras foram congeladas para posteriores análises.

Para a realização de análises de vida de prateleira, o EHsoja foi incubado (em triplicata) a 37 °C até atingir pH 5,0-5,5 (aproximadamente 16 h), coletando-se ao término da fermentação uma amostra (0 dia). Outras amostras foram armazenadas em geladeira e retiradas após 10 e 25 dias. Todas as amostras coletadas foram congeladas para posterior análise.

As fermentações em EHsoja foram assim denominadas neste trabalho: *L. rhamnosus* sem sacarose (LR light), *L. rhamnosus* + 12% sacarose (LR+ 12% sac), *L. rhamnosus* + Mistura probióticos + 12% sacarose (LR+ Mix+ 12%), Mistura de probióticos + 12% sacarose (Mix+ 12% sac), Mistura dos probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *B. longum* (Mix).

4.2.6. Metodologia analítica

As amostras foram analisadas seguindo o esquema da Figura 2.

4.2.6.1. Determinação do pH

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

4.2.6.2. Medida de Sinérese

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

4.2.6.3. Contagem de colônias

Foi feito plaqueamento em profundidade em meio ágar MRS com 0,01% azul de anilina, incubação por 72h a 37°C em aerobiose e anaerobiose gerada por meio de câmara e geradores de anaerobiose Anaerobac-Probac. Quando presentes as 3 linhagens de lactobacilos não foi realizada contagem individual, porem foi realizado reconhecimento da presença de *L. rhamnosus* (Figura 3) e outros lactobacilos por colônias características segundo Mondragón-Bernal (2005).

4.2.6.4. Determinação das propriedades reológicas

As propriedades reológicas das amostras foram analisadas através do reômetro Carri-Med Rheometer CSL² TA Instruments com prato cônico 4 cm, 1,58^º com controle de tensão, fator de tensão: 0,0597, fator de deformação: 29,0, truncamento: 53 micron. Foram realizadas em triplicata e os modelos reológicos foram ajustados e selecionados pelo coeficiente de correlação e teste de Qui² (valor da dispersão para duas variáveis de escala nominal), com os dados das segundas subidas. Os modelos utilizados estão na Tabela 2.

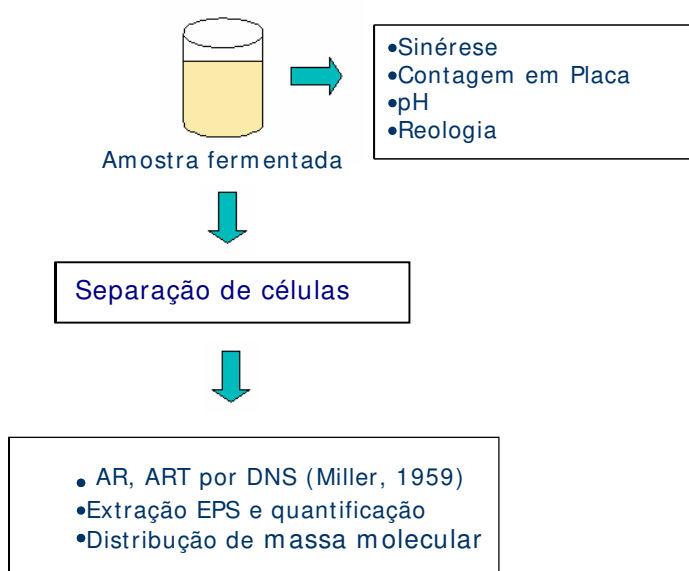


Figura 2: Esquema das análises realizadas

Tabela 2. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada

Tipo de Modelo	Replicatas	
	Ajuste ao Modelo	μ_{ap}
Newtoniano	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma}$, $\tau_0 = 0$	$\mu = \tau / \dot{\gamma} = k$
Pseudoplástico	Ajuste lei da potência $\tau = k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$	$\mu_{ap} = k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$
Plástico de Bingham	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma} + \tau_0$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\tau_0 / \dot{\gamma}) + k$
Herschel-Bulkley	Ajuste $\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\tau_0 / \dot{\gamma}) + k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$

k = índice de consistência, n = índice de escoamento ou fluência, τ_0 = Tensão inicial de deformação. (*), μ_{ap} = viscosidade aparente (Pa.s) calculada a 100 s^{-1} de esforço de deformação, sendo este o valor médio utilizado para mastigação de alimentos.

4.2.6.5. Separação de células

Para cada mL de amostra, foi adicionado 0,01 mL de ácido cítrico 1M, centrifugada a 9640 g durante 10 min/5 °C para remoção de células e proteínas. O sobrenadante foi dividido para análise de açúcares e EPS

4.2.6.6. Determinação de Açúcares Redutores (AR), Açúcares Redutores Totais (ART), Açúcares Não Redutores (ANR)

Após a diluição adequada do sobrenadante, foi feita a determinação de AR, ART pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 a 540 nm. Os ANR foram calculados pela diferença entre os resultados de ART e AR.

4.2.6.7. Determinação de Exopolissacarídeos (EPS)

Extração do EPS Bruto.

O sobrenadante obtido anteriormente foi aquecido a 100 °C por 10 min para inativação das enzimas presentes e foi centrifugado 907 g por 10 min. Os EPSs foram precipitados do sobrenadante adicionando-se 5 volumes de etanol absoluto resfriado, e mantido durante 12 h a 4°C. Centrifugou-se a 907 g por 20 min e o precipitado foi re-dissolvido em água destilada. Adicionaram-se mais 2 volumes de álcool resfriado e deixou-se por mais uma noite a 4°C. Centrifugou-se a 907 g por 20 min, retirando-se o sobrenadante. Em seguida, evaporou-se o álcool residual à vácuo durante 2 horas a 60 °C e o EPS bruto foi re-dissolvido em água para posteriores análises (Metodologia adaptada de Savadogo *et al.*, 2004; Goh *et al.* 2005, Ruas-Madiedo *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007)..

Quantificação de EPS pelo método de Antrona.

Em tubo de ensaio, adicionaram-se 4 mL do reativo de Antrona (0,2 g/100 mL de H₂SO₄) e 1 mL de amostra previamente diluída (0,01-0,1 g/L). Incubaram-se os tubos em banho-maria em ebulição durante 10 minutos e resfriaram-se em banho com gelo. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 a 600nm (Silva, 2003). A curva padrão foi feita utilizando-se dextrana de massa molecular 9300 Da.

Foram preparados brancos de EPS de todos os componentes presentes no meio e a somatória dos não-EPS, foi subtraída no resultado final (Goh *et al.*, 2005).

4.2.6.8. Identificação de açúcares e polissacarídeos em HPLC

Os polissacarídeos e açúcares foram identificados qualitativamente por tamanho molecular em HPLC modelo Varian 9010, através das colunas de permeação em gel em série GPC6000, GPC4000 e GPC3000, usando água como eluente, fluxo de 1,0 mL/min e detector por índice de refração. Os padrões injetados foram: dextranas de 165KDa, 79KDa e 43KDa (American Polymer Standards Corporation), polidextrose (Litesse II®-Danisco),

frutooligosacarídeos (Raftilose95®-Orafti), estaquiase (ICN Biomedicals Inc.), rafinose (Aldrich), sacarose (Merck), glicose (Merck), frutose (Merck) e galactose (Aldrich).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens *Leuconostoc lactis* NRRL B-3468, *Leuconostoc fructosum* NRRL B-2041 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* NRRL B-3252 que são considerados produtores de EPS segundo diversos autores (Sutherland, 1998, Santos *et al.*, 2000, Hernalsteens, 2002, Champagne *et al.*, 2006), não foram selecionados para contagem nem triagem, pois não atingiram atividade de dextrana-sacarase necessária para a sua aplicação. Estas linhagens apresentam outras desvantagens pois precisam de um processo complexo de propagação, cujas temperaturas de incubação e condições de oxigênio são diferentes às da mistura de probióticos e do processo de elaboração do alimento simbiótico a base de soja (Mondragón-Bernal, 2004).

Na Tabela 1 estão apresentadas as condições de propagação das linhagens e os tempos necessários até o meio de cultura atingir turbidez em relação ao meio sem fermentar, para sua possível aplicação como inóculo nos meios seletivos.

A maioria das linhagens de bactérias lácticas (BAL) estudadas apresentou crescimento muito fraco no meio MRS enriquecido com extrato de soja 6%, adicionado de 12% de sacarose e incubado sem agitação a 37°C, condições requeridas para elaboração do alimento simbiótico a base de soja. A Tabela 3 ilustra o crescimento das bactérias lácticas em meio MRS modificado em aerobiose e anaerobiose, a turbidez e a viscosidade. Somente *Pediococcus acidilactici* FLAV43, *L. rhamnosus* LR32 e *B. lactis* Bb12 apresentaram altas contagens nas condições de seleção, superiores a 8 log UFC/mL. Destas três linhagens, *L. rhamnosus* LR32 foi a única que visivelmente mostrou alta turbidez e viscosidade final no meio de fermentação.

Dentre estas três linhagens, foi selecionada a linhagem *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (Figura 3), já que apresentou colônias com melhores características gomosas e meio de fermentação turvo e viscoso, indicando maior capacidade de produção de EPS, além do seu potencial probiótico (Dupont *et al.*, 2000, Macedo *et al.*, 2002, Champagne *et al.*, 2006). Apesar de *Pediococcus acidilactici* FLAV43 apresentar altas contagens no meio, não foram observadas mudanças na viscosidade do meio e as colônias não apresentaram característica gomosa, o que indicou *a priori* sua baixa capacidade de produzir EPS nas condições de estudo desejadas. No entanto, tanto esta linhagem quanto as que não se desenvolveram de forma adequada merecem ser pesquisadas mais profundamente em estudos futuros de cinética de produção de EPS no extrato de soja, cujas qualidades fermentativas têm sido estudadas por outros autores (Smitinont *et al.*, 1999).

Tabela 3. Crescimento celular das bactérias lácticas durante fermentação em meio MRS modificado em condições de aerobiose, anaerobiose, turbidez e viscosidade

Linhagem BAL	Log UFC/ mL		Turbidez e viscosidade
	Aerobiose	Anaerobiose	
<i>Pediococcus acidilactici</i> FLAV43	9,8±0,1	9,7±0,1	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-1117	3,7±0,8	3,8±1,0	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> MD88	s.c.	1,8±0,4	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRRL B-634	3,1±0,1	3,8±0,4	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NRRL B-1821	3,7±0,4	4,1±1,1	+
<i>Propionibacterium freundereechii</i> subsp <i>shermanii</i> NRRL B-4327	s.c.	1,1±0,6	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC4 ⁺	9,0±0,0	s.c.	+++
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC81* ⁺	7,0±0,0	s.c.	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 5	s.c.	s.c.	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR32	8,0±0,3	8,3±0,5	++++
<i>Bifidobacterium longum</i> BL04 ⁺	s.c	7,9±0,4	++
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	s.c	7,8±0,0	+

- Meio sem ou mínima turbidez; + Meio levemente turvo; ++ Meio turvo; +++ Meio com alta turbidez ++++ Meio com alta turbidez e viscoso. * Controle. ⁺ Linhagens presentes no mix de probióticos padrão. S.C.=sem contagem (< 1 log UFC.mL⁻¹)



Figura 3. Colônias de *Lactobacillus rhamnosus* LR32 em meio MRS, substituindo-se glicose por 120 g/L de sacarose e adicionado de 0,01% de azul de anilina e 6% de EHsoja.

4.3.1. Resultados dos estudos cinéticos

A Tabela 4 apresenta os valores médios das cinéticas das contagens e pH durante 16 horas de fermentação de *L. rhamnosus* LR32 em extrato de soja e a Tabela 5 das fermentações de *L. rhamnosus* LR32 e/ou mix de probióticos. Como se pode observar, o crescimento de *L. rhamnosus* como inóculo puro em extrato hidrossolúvel de soja é fraco, atingindo máximo de

7,65 log UFC/mL em 16 horas de fermentação, sendo as contagens menores em 1,44 log na presença de 12% sacarose. Isso indica que o crescimento de *L. rhamnosus* apresenta provável inibição pela sacarose na concentração estudada. Foi também observada menor variação de pH ao longo da fermentação, sendo que a diferença de contagens de *L. rhamnosus* praticamente não afetou o pH. Nas culturas puras ocorreu menor queda, pois a diferença entre pH inicial e final foi de 1,3, em relação a 1,8 na fermentação com *L. rhamnosus* com mix e 1,5 só com mix de probióticos (Figura 4a). Já no *L. rhamnosus* com o mix de probióticos, observou-se um aumento considerável na contagem total e individual de colônias. Isso mostra que ocorre simbiose entre as linhagens, pois as contagens alcançaram mais que 9 log UFC/mL em 16 horas, sendo que a presença das outras linhagens ajudou no desenvolvimento de *L. rhamnosus* no meio, como pode ser observado na Tabela 5, onde a diferença entre as contagens inicial e final dos lactobacilos no fermentado com *L. rhamnosus* e mix de probióticos é de 2,72 log UFC/mL enquanto que para o fermentado só com o mix é de 1,87 log UFC/mL, portanto a diferença entre as fermentações é de 0,85 log UFC/mL, onde a presença das colônias características de *L. rhamnosus* nas placas foi observada.

Tabela 4. Cinéticas de crescimento celular de *L. rhamnosus* e variação de pH durante fermentação de EHsoja com e sem adição de sacarose.

Tempo (horas)	<i>L.rhamnosus</i> Aerobiose log UFC/ mL	<i>L.rhamnosus</i> Anaerobiose log UFC/ mL	MédiaTotal log UFC/ mL	pH
<i>L. rhamnosus</i> LR32 light				
0	4,04 ± 0,66	3,98 ± 0,68	4,01 ± 0,63	6,8
4	5,09 ± 0,39	5,09 ± 0,23	5,09 ± 0,30	6,8
8	5,45 ± 0,29	5,40 ± 0,29	5,43 ± 0,27	6,8
12	5,73 ± 0,46	5,82 ± 0,66	5,78 ± 0,54	6,0
16	7,65 ± 0,30	7,14 ± 0,53	7,39 ± 0,49	5,5
<i>L. rhamnosus</i> LR32 + 12% Sacarose				
0	3,85 ± 0,31	3,91 ± 0,12	3,87 ± 0,23	6,8
4	4,39 ± 0,13	4,42 ± 0,24	4,40 ± 0,18	6,7
8	5,10 ± 0,21	5,11 ± 0,24	5,10 ± 0,21	6,7
12	5,68 ± 0,27	5,71 ± 0,51	5,70 ± 0,38	5,7
16	5,46 ± 0,28	6,03 ± 0,87	5,81 ± 0,74	5,5

Tabela 5. Cinética das contagens e pH de fermentados de EHsoja com mistura de probióticos adicionados ou não de *L. rhamnosus* com adição de sacarose.

Tempo (horas)	Contagem total <i>Lactobacillus</i>		Contagem total <i>Bifidobacterium</i>		MédiaTotal log UFC/mL	pH
	UFC/mL	log	UFC/mL	log		
<i>L. rhamnosus</i> LR32 + Mix probióticos + 12 % Sacarose						
0	6,55 ± 0,06		6,45 ± 0,50		6,92 ± 0,26	6,8
4	6,61 ± 0,13		6,43 ± 0,47		6,84 ± 0,25	6,7
8	6,84 ± 0,59		6,95 ± 0,23		7,19 ± 0,32	6,6
12	7,68 ± 0,50		7,83 ± 0,02		8,14 ± 0,31	5,7
16	9,27 ± 0,16		8,31 ± 0,18		9,30 ± 0,09	5,0
<i>Mix de probióticos</i> + 12% Sacarose						
0	5,74 ± 0,19		5,77 ± 0,11		5,99 ± 0,16	6,9
4	5,80 ± 0,07		5,59 ± 0,27		6,02 ± 0,13	6,9
8	5,40 ± 0,24		6,11 ± 0,23		5,94 ± 0,52	6,9
12	6,41 ± 0,57		6,98 ± 0,50		7,00 ± 0,35	6,2
16	7,61 ± 0,32		7,70 ± 0,28		7,79 ± 0,22	5,4

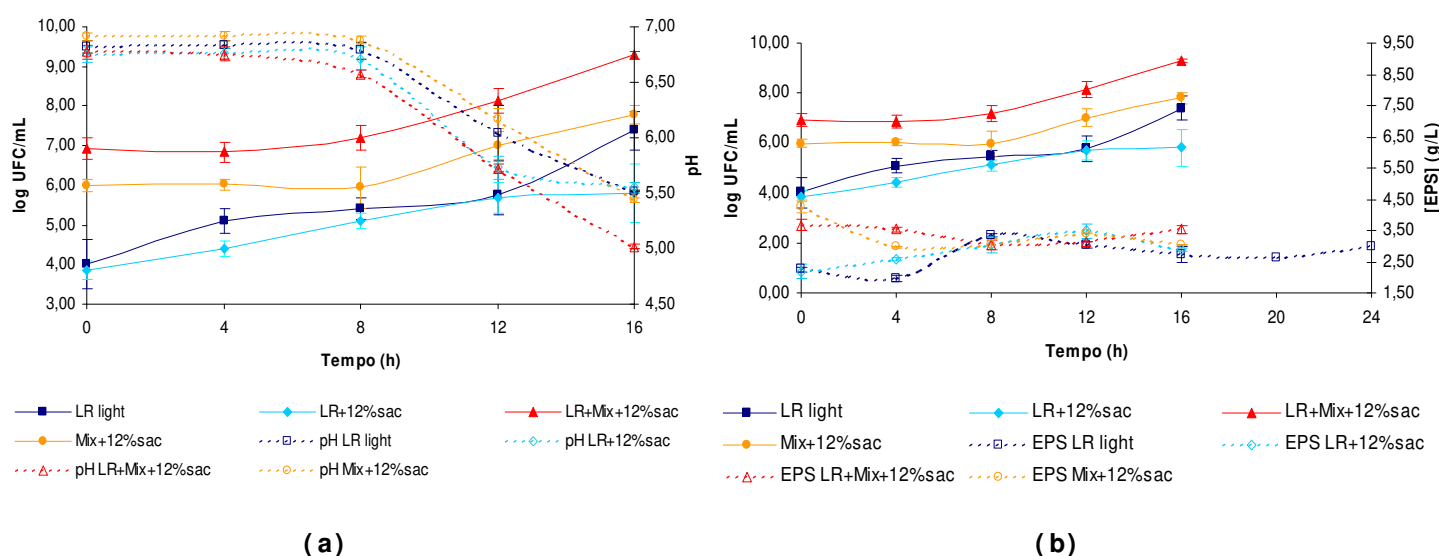


Figura 4. Cinética da fermentação em EHsoja (a) Contagem (logUFC/mL) pH e (b) Contagem EPS (g/L) de LR light (*L. rhamnosus* sem sacarose), LR+ 12% sac (*L. rhamnosus* + 12% sacarose), LR+ Mix+ 12% (*L. rhamnosus* + Mistura de probióticos + 12% sacarose), Mix+ 12% sac (Mistura de probióticos + 12% sacarose)

A Tabela 6 apresenta as cinéticas de AR, ART, ANR e EPS dos fermentados de soja, Pode-se observar que na faixa de tempo estudada, ocorre pouca produção de EPS tanto na presença quanto na ausência de sacarose. As mudanças no teor de AR, ART e EPS são pouco

notadas, especialmente para *L. rhamnosus* em cultura pura, necessitando-se maior tempo de fermentação para analisar seu comportamento durante a fermentação em EHsoja.

Tabela 6. Teor de açúcares AR, ART e ANR, EPS e sinérese durante fermentação de EHsoja por *L. rhamnosus* e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose.

Tempo (horas)	ART (g/ L)	AR (g/ L)	ANR (g/ L)	EPS (g/ L)
<i>L. rhamnosus LR32 light</i>				
0	63,9 ± 2,1	0,7 ± 0,0	63,2 ± 2,1	2,2 ± 0,1
4	66,7 ± 2,7	0,6 ± 0,0	66,0 ± 2,7	2,0 ± 0,1
8	72,5 ± 2,7	0,6 ± 0,0	71,9 ± 2,7	3,3 ± 0,0
12	65,7 ± 1,7	0,5 ± 0,0	65,2 ± 1,7	3,0 ± 0,1
16	66,4 ± 0,7	0,5 ± 0,0	66,0 ± 0,7	2,7 ± 0,3
20				2,6 ± 0,2
24				3,0 ± 0,3
<i>L. rhamnosus LR32 + 12% Sacarose</i>				
0	224,4 ± 36,8	12,9 ± 0,1	211,4 ± 36,7	2,2 ± 0,2
4	240,7 ± 20,5	13,8 ± 0,7	227,0 ± 19,9	2,6 ± 0,0
8	228,0 ± 28,1	13,4 ± 0,9	214,6 ± 28,0	3,0 ± 0,2
12	228,8 ± 13,6	13,2 ± 1,4	215,6 ± 13,3	3,5 ± 0,2
16	208,4 ± 18,0	12,2 ± 0,2	196,1 ± 17,9	2,9 ± 0,1
<i>L. rhamnosus LR32 + Mix probióticos + 12 % Sacarose</i>				
0	262,3 ± 40,2	15,0 ± 0,8	247,3 ± 40,9	3,7 ± 0,2
4	274,2 ± 41,3	15,0 ± 0,7	259,2 ± 40,7	3,5 ± 0,1
8	283,9 ± 30,7	15,5 ± 0,6	268,4 ± 31,2	3,0 ± 0,2
12	279,1 ± 42,4	15,2 ± 0,4	263,9 ± 42,1	3,1 ± 0,0
16	303,9 ± 34,9	15,2 ± 0,4	288,7 ± 34,6	3,5 ± 0,1
<i>Mix de probióticos + 12% Sacarose</i>				
0	255,2 ± 30,2	15,3 ± 0,9	239,9 ± 29,6	4,3 ± 0,2
4	251,7 ± 22,7	15,6 ± 0,3	236,1 ± 22,4	3,0 ± 0,0
8	268,4 ± 10,9	15,4 ± 0,7	253,0 ± 11,3	3,1 ± 0,2
12	253,7 ± 1,6	15,5 ± 0,6	238,2 ± 1,8	3,4 ± 0,0
16	288,8 ± 21,9	14,5 ± 0,5	274,3 ± 21,8	3,0 ± 0,0

Os resultados obtidos na quantificação de EPS mostram que não há relação direta com o crescimento celular durante a fermentação (Figura 4b). Porém, através dos cromatogramas

(Figura 5), pode-se observar que existe atividade microbiana na formação de compostos de elevada massa molecular (maior que 39000 Da), através da transformação e interação de açúcares e proteínas presentes no extrato hidrossolúvel de soja e no meio de fermentação.

Contrário aos resultados reportados por Grattepanche et al (2007), que obteve em leite fermentado concentração de EPS 3 vezes menor em culturas mistas de lactobacilos que cultura pura de *L. rhamnosus* RW-9595M, a concentração de EPS obtida foi maior nos fermentados de *L. rhamnosus* LR32 em presença do mix de probióticos.

Nesse trabalho, foram obtidas concentrações de EPS de até 4270 mg/L, que são altas quando comparadas aos resultados de EPS de *L. lactis subsp. lactis* de Cerning et al. (1988) e Cerning (1990) (100-600 mg/L) e de EPS de *Streptococcus thermophilus* em meio MRS, substituindo-se glicose por lactose 75 g/L de Savadogo et al. (2004) (814 mg/L). Macedo (2002b) obteve até 2775 mg/L de EPS de *L. rhamnosus* RW-9595M em meio mínimo basal composto por soro e extrato de levedura enriquecido com vitaminas, sais e aminoácidos. Segundo Macedo (2002b), a produção de EPS por bactérias lácticas é influenciada pela composição do meio de crescimento, particularmente de aminoácidos, minerais, vitaminas e bases nitrogenadas, a qual está relacionada à produção de biomassa, havendo exceções.

Tem sido provado que sais de Mg^{2+} e Mn^{2+} são fatores essenciais para o crescimento de lactobacilos e que melhoram a produção de EPS ao menos por meio da promoção do crescimento. O Mg^{2+} , por exemplo, influencia a atividade da enzima fosfoglucomutase, que participa na biossíntese de EPS, catalisando a transferência de grupos fosfato entre carbono C_1 e C_6 da glicose (Macedo, 2002b). Assim, como o meio utilizado nesse estudo (extrato hidrossolúvel de soja 10%) é complexo, sendo rico em aminoácidos, vitaminas e inclusive sais minerais como Mg^{2+} (~216 mg/L) e Mn^{2+} (~2,68mg/L) (NEPA, 2006), valores superiores ao leite bovino integral (100mg/L de Mg^{2+} e traços de Mn^{2+}) (NEPA, 2006), pode-se explicar a obtenção de resultados mais elevados de EPS.

Na Figura 5a, pode-se observar um cromatograma com a formação do EPS durante a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja por *L. rhamnosus light* ou seja sem adição de sacarose e adicionado dos prebióticos FOS e polidextrose. Na Figura 5b é mostrado em detalhe a formação do EPS em fermentado de soja por *L. rhamnosus light* porem sem adição de prebióticos. Em ambos os casos, um pico aos 32,5 minutos está sempre presente e corresponde provavelmente às proteínas do extrato de soja (não-EPS) (Cerning, 1990). Outro pico pouco homogêneo entre 26-27 minutos de corrida também está presente desde o início da fermentação. Observa-se que ao longo das 24 horas de fermentação aconteceram modificações destes dois picos, sendo que o primeiro diminui enquanto o segundo aumenta gradativamente.

Este fenômeno indica que há atividade de formação de um EPS com uma estrutura mais complexa e com maior massa molecular, de aproximadamente (43 a 79 KDaltons).

É possível que o EPS formado pelo *L. rhamnosus* sofra interações com as proteínas da soja e outros compostos presentes como oligossacarídeos da soja e/ou polissacarídeos adicionados (FOS e polidextrose), formando estruturas diferentes e complexas em cada produto, dependendo de fatores como a presença de co-solutos como a sacarose e do pH do meio. No Apêndice 2, pode-se observar outros cromatogramas dos padrões utilizados e de outras cinéticas realizadas neste estudo.

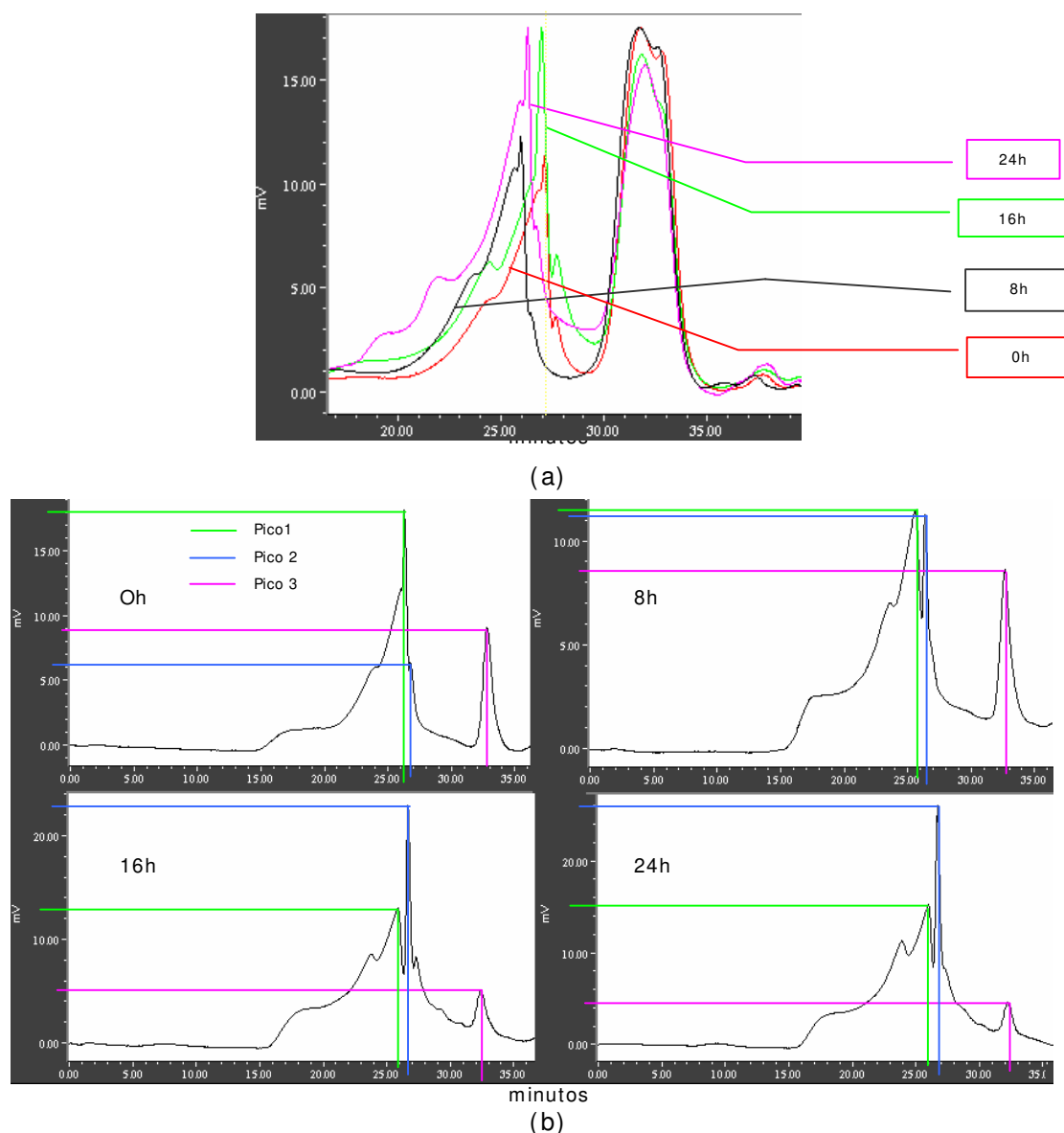


Figura 5. Cromatograma da formação de EPS durante a fermentação de (a) *L. rhamnosus* em extrato hidrossolúvel de soja *light* adicionado de prebióticos FOS e polidextrose (b) *L. rhamnosus* em extrato hidrossolúvel de soja *light* e sem adição de prebióticos.

Foi necessário realizar testes em branco de EPS de todos os componentes presentes no meio e a somatória dos não-EPS, foi subtraída no resultado final (Goh *et al.*, 2005), dada a alta probabilidade de que os resultados fossem influenciados pela presença de compostos não-EPS, como explicado por Cerning (1990). Como se observa na Figura 6 há sempre presença de polímeros de alta massa molecular provenientes das proteínas de soja que não são retirados com a metodologia adotada durante o processo de extração do EPS, além das reações complexas que possam existir entre todos os polímeros e açúcares presentes no meio de fermentação (proteínas, prebióticos e EPS formado), segundo Braga (2006). Por tudo isso, acredita-se que os EPS formados nas diferentes fermentações sejam compostos complexos, resultantes das interações químicas entre as proteínas da soja, os EPS produzidos pelas BAL e demais co-solutos, cujas propriedades dependem da(s) linhagem(s) de origem do EPS e cuja composição e demais características físico-químicas deverão ser estudadas com maior profundidade em futuras pesquisas.

Espera-se que um incremento na viscosidade relacionada à concentração de EPS leve a diminuição de sinérese. Porém, tais fatos não podem ser associados tão diretamente, como ocorreu no trabalho de Champagne *et al.* (2006), no qual o aumento das contagens de lactobacilos não afetou a sinérese. Este autor verificou que para *L. rhamnosus* RW-9595M, a população final não tinha correlação com a viscosidade nem com a sinérese. De maneira semelhante, isso foi observado neste estudo.

Os sistemas com mais de um biopolímero exibem comportamentos mais complexos do que misturas de polímeros sintéticos, pois existe um equilíbrio relacionado ao estado de ordem desordem de conformação, além de apresentar transições e separações de fases em determinadas situações. Interações entre polímeros resultam em incompatibilidade e formações complexas (Braga, 2006). Na presença de polissacarídeos e co-solutos como a sacarose, a temperatura de desnaturação de algumas proteínas é alterada ou a capacidade de formação dos géis é modificada (Neves, 2008). Em solução, as proteínas podem atrair e repelir os polissacarídeos dependendo da sua origem, do pH, da força iônica, da temperatura, da concentração ou do cisalhamento a que são submetidas (Belyakova *et al.*, 2003).

Desta forma, as propriedades do gel protéico formado durante as diversas fermentações deste estudo, como consistência e sinérese, foram alteradas, não só pela adição de polissacarídeos como também pelas variações na força iônica e pH do sistema, onde a fermentação láctica e o os componentes do meio formaram um sistema altamente complexo, no qual, as forças moleculares envolvidas provavelmente são pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que o gel é mantido por pontes de hidrogênio e dissulfeto (Belyakova *et al.*, 2003, Torrezan, 2007).

Como representado na Tabela 7, no momento da inoculação, todos os fermentados, exceto a mistura de probióticos em presença de sacarose, tiveram ajuste de fluido pseudoplástico, ou seja, sem τ_0 . Ao final da fermentação, o comportamento reológico dos fermentados mudou, apresentando melhor ajuste ao modelo de fluido tipo Herschel-Bulkley, ou seja, aqueles que apresentam tensão inicial de deformação (τ_0) e cujo índice de escoamento é menor à unidade ($n < 1$).

Tabela 7. Viscosidade aparente e constantes τ_0 , k e n dos modelos reológicos ajustados para fermentados de EHsoja com *L. rhamnosus* e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose durante fermentação.

Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	k	n	μ_{ap} (Pa.s) 100s ⁻¹	Modelo Ajustado com R ² > 0,9999
<i>L. rhamnosus LR32 light</i>					
0		0,093 ±0,009	0,884 ±0,057	0,056 ±0,020	Pseudoplástico
8		0,070 ±0,021	0,858 ±0,024	0,036 ±0,007	Pseudoplástico
16		0,111 ±0,003	0,905 ±0,000	0,072 ±0,002	Pseudoplástico
24	0,595±0,000	0,101 ±0,015	0,830 ±0,121	0,058 ±0,034	Herschel-Bulkley
<i>L. rhamnosus LR32 + 12% Sacarose</i>					
0		0,160 ±0,012	0,864 ±0,025	0,086 ±0,016	Pseudoplástico
8		0,150 ±0,072	0,772 ±0,059	0,050 ±0,011	Pseudoplástico
16	0,349±0,067	0,084 ±0,036	0,872 ±0,057	0,053 ±0,032	Herschel-Bulkley
<i>L. rhamnosus LR32 + Mix probióticos + 12 % Sacarose</i>					
0		0,124 ±0,013	0,826 ±0,018	0,056 ±0,010	Pseudoplástico
8	0,447 ±0,063	0,062 ±0,009	0,868 ±0,016	0,038 ±0,002	Herschel-Bulkley
16	0,347 ±0,059	0,089 ±0,008	0,957 ±0,005	0,077 ±0,008	Herschel-Bulkley
<i>Mix probióticos + 12% Sacarose</i>					
0	0,185 ±0,048	0,110 ±0,017	0,816 ±0,006	0,049 ±0,005	Herschel-Bulkley
8	0,180 ±0,084	0,104 ±0,020	0,823 ±0,005	0,048 ±0,007	Herschel-Bulkley
16	0,975 ±0,108	0,035 ±0,008	0,905 ±0,012	0,032 ±0,003	Herschel-Bulkley

k=índice de consistência (s⁻¹), n= índice de escoamento, τ_0 =Tensão inicial de deformação. (*) μ_{ap} = viscosidade aparente (Pa/s) e 100 s⁻¹ é o esforço de deformação médio para mastigação de alimentos.

Observou-se em todas as fermentações, exceto *L. rhamnosus*+ Mix+12% sacarose, queda na viscosidade aparente ao final da fermentação. Isso é um aspecto positivo, pois mostra

novamente que a relação de mutualismo entre o *L. rhamnosus* e o Mix de probióticos, gera melhores resultados de sinérese, viscosidade aparente e contagens finais.

Com exceção do produto *L. rhamnosus* light, a tendência dos produtos fermentados é que seu k diminua e n e τ_0 aumentem ao longo do tempo.

4.3.2. Resultados de vida-de-prateleira

Nas Tabelas 8 e 9 são mostrados os comportamentos das contagens totais e específicas para lactobacilos e bifidobactéria com relação ao pH durante, na Tabela 10. são apresentadas as médias de AR, ART, ANR, EPS e percentagem de sinérese durante 25-30 dias de prateleira para extrato hidrossolúvel de soja EHsoja - na presença ou não de sacarose. Os resultados referem-se às fermentações com *L. rhamnosus* puro ou com mistura padronizada de probióticos contendo *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*. Foi estabelecido como controle o fermentado do EHsoja com mistura de probióticos e 12% de sacarose (Mix+12%), bebida padronizada que apresenta alta sinérese, mudanças de pH e viscosidade durante a vida de prateleira.

Há evidência de simbiose entre *L. rhamnosus* e a mistura padrão de probióticos *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*, já que as contagens de *L. rhamnosus* aumentaram de 10^6 e 10^7 UFC/mL (Tabelas 8) quando aplicado puro, para maior que 10^9 UFC/mL nos produtos em mistura e (Tabela 9).

Na Figura 6 observa-se o comportamento da sinérese em relação a pH e EPS. Os fermentados de *L. rhamnosus*, apesar de terem baixas contagens de células, apresentaram mudanças não significativas no pH durante vida de prateleira, com uma produção moderada de EPS, mas com as menores percentagens de sinérese, como pode ser observado nas Tabelas 8 e 10 e Figura 6.

A queda do pH é causada pela alta atividade dos probióticos presentes, enquanto contagens baixas como as dos fermentados com *L. rhamnosus* puro, o pH manteve-se aproximadamente constante (Tabela 8).

Na Tabela 9 pode-se observar que as maiores contagens finais são apresentadas no fermentado contendo as quatro linhagens de bactérias lácticas, atingindo contagens maiores a 10^9 UFC/mL, enquanto a queda de pH é similar ao longo da vida de prateleira quando comparado com o Mix+12%, com contagens acima de 10^8 UFC/mL. A produção de EPS foi menor para os fermentados com *L. rhamnosus*, mas a sinérese foi significativamente menor, indicando que não há correlação direta entre sinérese e quantidade de EPS produzido. (Tabela 10).

Tabela 8. Contagem de microrganismos e pH de fermentados de EHsoja com *L. rhamnosus* com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	Contagem <i>L.rhamnosus</i> Aerobiose Log UFC/mL	Contagem <i>L.rhamnosus</i> Anaerobiose Log UFC/mL	Média Total log UFC/mL	pH
<i>L. rhamnosus</i> LR32 light				
0	5,90 ± 0,63	5,87 ± 0,53	5,88 ± 0,55	5,8
10	7,38 ± 0,88	7,42 ± 0,80	7,40 ± 0,78	5,6
25	5,71 ± 0,38	5,46 ± 0,27	5,58 ± 0,34	5,5
<i>L. rhamnosus</i> LR32 + 12% Sacarose				
0	5,93 ± 0,22	5,97 ± 0,28	5,95 ± 0,23	5,7
10	6,51 ± 0,69	6,28 ± 0,59	6,41 ± 0,62	5,6
25	5,88 ± 0,91	5,34 ± 0,12	5,64 ± 0,71	5,5

Tabela 9. Contagem de microrganismos e pH de fermentados de EHsoja com mistura de probióticos adicionados ou não de *L. rhamnosus* com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	Contagem total <i>Lactobacillus</i> * log UFC/mL	Contagem total <i>Bifidobacterium</i> log UFC/mL	Média Total log UFC/mL	pH
<i>L. rhamnosus</i> LR32 + Mix probióticos + 12 % Sacarose*				
0	9,20 ± 0,51	8,99 ± 0,25	9,51 ± 0,30	5,1
10	9,85 ± 0,58	9,11 ± 0,59	9,95 ± 0,44	4,2
25	9,34 ± 0,40	8,42 ± 0,37	9,48 ± 0,39	4,0
Mix de probióticos + 12% Sacarose				
0	8,01 ± 1,11	7,46 ± 0,50	8,83 ± 0,75	5,6
10	8,15 ± 0,71	8,50 ± 0,78	9,16 ± 0,22	4,5
20	8,96 ± 0,27	8,69 ± 0,86	9,49 ± 0,04	4,2
30	8,40 ± 0,86	8,50 ± 0,73	9,34 ± 0,37	4,0

* Foi observada nas placas a presença das três linhagens de lactobacilos (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. paracasei subsp paracasei*) por características morfológicas próprias de cada colônia (Mondragón-Bernal, 2005).

Observa-se que o fermentado Mix+12% sac, apresenta as maiores percentagens de sinérese ao longo da vida de prateleira, mesmo contendo as maiores concentrações de EPS, quando comparado com o EPS do fermentado de EHsoja contendo só *L. rhamnosus*, na

presença ou não de sacarose (Tabela 10 e Figuras 6). Pode-se assumir que a alta concentração de células causa maiores mudanças no pH, viscosidade aparente e na sinérese no Mix+ 12% sac.

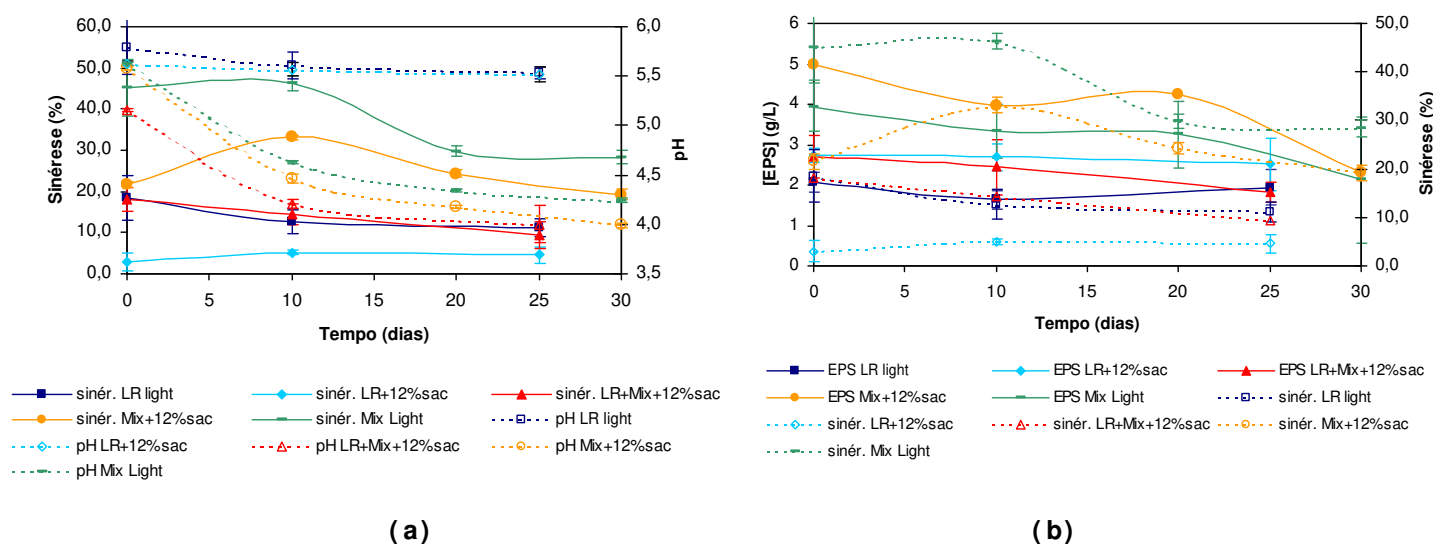


Figura 6. Comportamento durante a vida-de-prateleira da (a) sinérese (%) e pH, e, (b) sinérese (%) e EPS (g/L) para as fermentações em EHsoja LR light (*L. rhamnosus* sem sacarose), LR+ 12% sac (*L. rhamnosus* + 12% sacarose), LR+ Mix+ 12% (*L. rhamnosus* + Mistura de probióticos + 12% sacarose), Mix+ 12% sac (Mistura de probióticos + 12% sacarose) e Mix light.

A maior sinérese observada atingiu aproximadamente 45% no fermentado com Mix light (mistura probiótica sem sacarose), a mistura de probióticos com sacarose teve até 30%, mas quando adicionado de *L. rhamnosus* caiu para aproximadamente 14%. Já para os fermentados com *L. rhamnosus* puro, com e sem sacarose, diminuiu até cerca de 4% e 14% respectivamente (Tabela 10).

Com isto, é possível analisar que a presença de sacarose e de *L. rhamnosus* contribuem para menores percentagens de sinérese nos produtos finais e durante a vida de prateleira, sendo um aspecto favorável, além do incremento considerável das contagens totais finais e a evidência de simbiose entre as espécies presentes. Acredita-se ainda que o *L. rhamnosus*, mesmo alcançando contagens inferiores e com EPS produzido em menor quantidade, produz polissacarídeos de melhor qualidade em relação à retenção de líquidos quando comparado com os EPS produzidos pela mistura padrão de probióticos (Figuras 6). Como visto na Figura 5, através de padrões de dextrana de diferentes massas moleculares, observou-se a formação de um polissacarídeo característico, nas fermentações com *L. rhamnosus* com massa molecular maior que 43 KDa.

Tabela 10. Teor de açúcares AR, ART e ANR, EPS e sinérese de fermentados de EHsoja com *L. rhamnosus*, Mistura de probióticos adicionados ou não de *L. rhamnosus* com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	ART (g/ L)	AR (g/ L)	ANR (g/ L)	EPS (g/ L)	Sinérese (%)
<i>L. rhamnosus LR32 light</i>					
0	62,8 ± 4,8	0,9 ± 0,1	62,4 ± 4,8	2,1 ± 0,2	18,5 ± 5,5
10	59,8 ± 6,7	0,8 ± 0,1	59,4 ± 6,7	1,6 ± 0,2	12,7 ± 3,0
25	59,9 ± 0,5	0,8 ± 0,0	59,5 ± 0,5	2,0 ± 0,4	11,1 ± 2,1
<i>L. rhamnosus LR32 + 12% Sacarose</i>					
0	303,8 ± 22,3	14,8 ± 0,7	288,9 ± 22,0	2,8 ± 0,2	3,0 ± 2,2
10	305,3 ± 15,3	16,0 ± 1,6	289,3 ± 14,9	2,7 ± 0,3	5,1 ± 0,6
25	320,4 ± 37,0	15,5 ± 0,1	304,9 ± 36,9	2,5 ± 0,6	4,6 ± 1,9
<i>L. rhamnosus LR32 + Mix probióticos + 12 % Sacarose</i>					
0	261,2 ± 23,5	12,7 ± 0,2	261,2 ± 23,5	2,7 ± 0,5	18,1 ± 2,9
10	247,0 ± 18,6	10,6 ± 0,8	247,0 ± 18,6	2,4 ± 0,7	14,5 ± 2,4
25	252,5 ± 17,6	10,9 ± 0,7	252,4 ± 17,6	1,8 ± 0,2	9,4 ± 3,3
<i>Mix de probióticos + 12% Sacarose</i>					
0	204,1 ± 12,0	12,4 ± 0,5	204,0 ± 12,0	5,0 ± 0,0	21,6 ± 1,6
10	194,0 ± 12,6	10,1 ± 0,0	193,9 ± 12,6	4,0 ± 0,1	33,1 ± 1,6
20	203,8 ± 3,9	10,2 ± 0,6	203,8 ± 4,0	4,2 ± 0,0	24,3 ± 1,2
30	199,3 ± 6,3	10,8 ± 0,4	199,3 ± 6,3	2,3 ± 0,3	19,2 ± 1,6
<i>Mix de probióticos light</i>					
0	54,0 ± 0,8	7,9 ± 0,4	53,6 ± 0,8	3,9 ± 0,6	45,1 ± 6,8
10	52,7 ± 0,6	9,0 ± 0,1	52,2 ± 0,6	3,3 ± 0,7	46,3 ± 1,7
20	51,3 ± 0,9	9,4 ± 0,1	50,9 ± 0,9	3,3 ± 0,8	29,8 ± 1,4
30	48,4 ± 1,2	9,0 ± 0,3	47,9 ± 1,2	2,1 ± 1,6	28,3 ± 1,7

AR= Açúcares redutores; ART= Açúcares redutores totais; ANR= Açúcares não redutores;

EPS= Exopolissacarídeo

Na Tabela 11 são mostrados os resultados do comportamento reológico dos fermentados durante vida-de-prateleira. O modelo que apresentou o melhor ajuste para todas as amostras com sacarose foi fluido do tipo Herschel-Bulkley, que apresenta tensão inicial de fluência (τ_0) e cujo índice de escoamento é menor que uno ($n < 1$). Aos 25 dias de prateleira, o fermentado de *L. rhamnosus* com mistura padronizada de probióticos e sacarose apresentou mudança no comportamento reológico passando para fluido pseudoplástico e com menor viscosidade

aparente. Já os fermentados sem sacarose apresentaram característica de fluidos pseudoplásticos ($n < 1$) durante o tempo de estudo em prateleira. Os maiores índices de consistência foram dos fermentados com mistura de probióticos padrão e 12% sacarose, seguidos pelo Mix *light* refletidos em viscosidades aparentes mais altas, sendo maiores para pH em torno de 4,0. A presença do *L. rhamnosus* causou índices de consistência menores, mesmo a valores de pH baixos, sendo ligeiramente maiores os índices de escoamento e como consequência menores viscosidades aparentes (Tabela 11).

Tabela 11. Viscosidade aparente e constantes τ_0 , k e n dos modelos reológicos ajustados para fermentados de EHsoja com *L. rhamnosus* e/ou mistura de probióticos com e sem adição de sacarose durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	τ_0 (Pa)	K	N	μ_{ap} (Pa.s) (*) $100s^{-1}$	Modelo ajustado com $R^2 > 0,9999$
<i>L. rhamnosus + 12% Sacarose</i>					
0	0,324±0,065	0,095±0,085	0,882±0,085	0,059±0,022	Herschel-Bulkley
10	0,299±0,075	0,086±0,011	0,869±0,011	0,049±0,013	Herschel-Bulkley
25	0,264±0,039	0,088±0,087	0,854±0,087	0,045±0,002	Herschel-Bulkley
<i>L. rhamnosus light</i>					
0		0,079±0,015	0,912±0,052	0,054±0,034	Pseudoplástico
10		0,074±0,023	0,855±0,023	0,038±0,007	Pseudoplástico
25		0,080±0,052	0,868±0,052	0,043±0,004	Pseudoplástico
<i>L. rhamnosus + Mix probióticos + 12 % Sacarose</i>					
0	0,225±0,029	0,052±0,006	0,905±0,006	0,036±0,030	Herschel-Bulkley
10	0,175±0,019	0,071±0,033	0,926±0,033	0,052±0,046	Herschel-Bulkley
25		0,075±0,028	0,862±0,028	0,039±0,042	Pseudoplástico
<i>Mix de probióticos + 12% Sacarose</i>					
0	0,945±0,075	0,160±0,025	0,839±0,033	0,085±0,006	Herschel-Bulkley
10	0,440±0,134	0,261±0,061	0,761±0,047	0,090±0,000	Herschel-Bulkley
20	1,506±0,018	0,265±0,048	0,833±0,034	0,137±0,003	Herschel-Bulkley
30	0,563±0,069	0,989±0,147	0,577±0,005	0,146±0,017	Herschel-Bulkley
<i>Mix de probióticos Light</i>					
0		0,121±0,025	0,857±0,076	0,062±0,009	Pseudoplástico
10		0,182±0,097	0,795±0,101	0,063±0,015	Pseudoplástico
20		0,154±0,053	0,800±0,075	0,059±0,003	Pseudoplástico
30		0,159±0,050	0,811±0,088	0,065±0,007	Pseudoplástico

k= índice de consistência, n= índice de escoamento, τ_0 =Tensão inicial de deformação. (*) μ_{ap} = viscosidade aparente (Pa/s) e $100 s^{-1}$ é o esforço de deformação médio para mastigação de alimentos.

4.4. CONCLUSÕES

L. rhamnosus LR32 foi a linhagem de BAL produtora de EPS selecionada após triagem com as melhores características de crescimento no meio de fermentação requerido para este estudo, assim como por seu potencial probiótico. Há evidência de simbiose entre *L. rhamnosus* e a mistura padrão de probióticos *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*, já que as contagens de *L. rhamnosus* aumentaram significativamente nos produtos em mistura. Interpreta-se que o EPS produzido pelo *L. rhamnosus* tende a reter mais umidade do meio fermentado, e, portanto, amenizar a sinérese. No entanto, os simbióticos possuem consistência inferior à dos produtos com mistura padrão de probióticos, que, apesar de conter mais EPS, apresentam pouca retenção de líquidos, por tanto não existe relação direta entre produção de EPS e redução de sinérese e/ou aumento da viscosidade por *L. rhamnosus* nas condições deste estudo. Quando o valor de pH do meio está ao redor de 4,0, os produtos aumentaram a consistência e a viscosidade aparente. A presença de sacarose e *L. rhamnosus* contribuiu para a diminuição da sinérese. Após 16 horas de fermentação o produto contendo *L. rhamnosus*, mix de probióticos e sacarose obteve a maior viscosidade aparente (0,08 Pa.s), maior população de probióticos (9,3 log UFC/mL) e 3,54 g/L de EPS atingindo pH 5,0. Durante a estocagem a viabilidade da população foi mantida, a sinérese caiu de 18% para 9% (m/v) e a viscosidade diminuiu para 0,04 Pa.s. Amostras com mix de probióticos sem *L. rhamnosus* atingiram viscosidades de 0,15 Pa, 4 g/L de EPS, pH 4,0 e sinérese de 25% (m/v) durante vida-de-prateleira. Produtos com sacarose apresentaram comportamento de fluidos Herschel-Bulkley, e, sem sacarose, do tipo pseudoplástico ao longo da estocagem.

Por tanto, pode se concluir que a inclusão da linhagem *L. rhamnosus* LR32 no produto simbiótico, adicionado de sacarose, não só melhora as características funcionais do produto pela presença de uma nova linhagem probiótica, mas também favorece a sua estabilidade em relação à sinérese e comportamento reológico. No entanto novos estudos devem ser realizados na procura de otimizar as variáveis envolvidas na elaboração do simbiótico como seriam: a proporção das linhagens envolvidas para melhorar a viscosidade aparente, redução máxima da sinérese, a substituição da sacarose para produtos *light*, a estabilidade do pH talvez por meio da adição de agentes tamponantes, e a manutenção da viabilidade, entre outras.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq/PEC-PG pela bolsa de doutorado e iniciação científica, à USDA-USA pelo fornecimento das bactérias lácticas, a OLVEBRA, DANISCO, Chr. Hansen, Duas Rodas e Proceedings pelo fornecimento gratuito dos materiais empregados neste estudo.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATCC CULTURES - THE AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Bactéria collection. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/bacteria/bacterialIndex.cfm>. Acessado em abril de 2006.
- BATT, C.A. **Lactococcus**. Department of Food Science, Cornell University, USA, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/LACTOCOCCUS.doc> Acessado em abril de 2006.
- BELYAKOVA, L. E., ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., Dickinson, E., MERINO, L. M., TSAPKINA, E. N. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 31-46, 2003.
- BRAGA, A. L. M. **Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos**. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- CERNING, J.; BOUILLANE, C; DESMAZEAUD, M.; LANDON, M. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 10, 225-260, 1988.
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 87, p. 113-130, 1990.
- CHABOT, S.; YU, H.L.; DE LE´SE´LEUC, L.; COUTIER, D.; VAN CALSTEREN, M.R.; LESSARD, M. e outros. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6, and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-c in mouse splenocytes. **Lait**, v. 81, p. 683-697, 2001.
- CHAMPAGNE, C.P.; BARRETE, J.; ROY, D.; RODRIGUE, N. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. **Food Research International**, v. 39, p. 651-659, 2006.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.
- DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 251-255, 2000.

-
- GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELAN, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of de EPS produced by *P. acidi-propionici* on milk microfiltrate. **Carbohydrate polymers**, v. 51, p. 149-158, 2003.
- GRATTEPANCHE F., AUDET P., LACROIX C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, v 17, i 2, p. 123-132, 2007.
- HESS, S.J.; ROBERTS, R.F.; ZIEGLER, G.R. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 252-263, 1997.
- MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; CHAMPAGNE, C.P. Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 167-173, 2002(a).
- MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; GARDNER, N.J.; CHAMPAGNE, C.P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419-426, 2002(b).
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; COSTA, F.; RODRIGUEZ, M.I.; MAUGERI, F. **Metodologia para Contagem Diferenciada de Lactobacilos e Bifidobactérias em Mistura**. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Recife, PE, Brasil, 2005.
- NEVES, E. S. **Efeito da adição de co-solutos na reologia de géis lácteos acidificados**. Orientador: Rosiane Lopes da Cunha. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TACO Versão 2**. Segunda Edição. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 2006, 114 p.
- PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil**. Campinas, SP, 2006. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

-
- ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of Chicory and its hidrolysis products. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 11-19, 1998.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163 171, 2002.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T.; SAVADOGO, P.W.; BARRO, N.; OUATTARA, A.S.; TRAORÉ, S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from burkina Faso milk samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 3 (3), p. 189-194, 2004.
- SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 765 772, 2002.
- SMITINONT, T.; TANSAKUL, C.; TANASUPAWAT, S.; KEERATIPIBUL, S.; NAVARINI, L, BOSCO, M.; CESCUTTI, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 105-111, 1999.
- 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.
- TORREZAN, R. **Efeito do processamento à alta pressão nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas: 2007.
- TUINIER, R.; OOMEN, C.J.; ZOON, P.; COHEN, S.; de KRUIF, C.G. Viscoelastic properties of an exocellular polysaccharide produced by a *Lactococcus lactis*. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 219-223, 2000.
- VUYST, L. de; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153 177, 1999.

CAPÍTULO 5.

5. ESTUDO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA ESTABILIDADE E FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA

Parte dos resultados deste capítulo foram apresentados como:

1) Efeitos de ingredientes nos parâmetros reológicos de simbiótico fermentado de soja associado a exopolissacarídeo produzido por *L. Rhamnosus* durante *shelf-life*.

Autores: Mondragón-Bernal; Olga; Tapia-Blacido, Délia; Rodrigues, Maria Isabel; Maugeri, Francisco. Apresentado como resumo e pôster no 7^º **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos SLACA** Campinas- do 04 a 07 de novembro de 2007.

2) Comportamento de exopolissacarídeo produzido por *L. Rhamnosus* na estabilidade de produto simbiótico fermentado de soja através de delineamento experimental Plackett & Burman

Autores: Horita, Juliana; Ferreira-Perina, Maria Fernanda; Mondragón-Bernal; Olga; Rodrigues, Maria Isabel; Maugeri, Francisco. Apresentado como resumo e pôster no 7^º **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos SLACA** Campinas- do 04 a 07 de novembro de 2007.

Um verdadeiro amigo é quem te pega pela mão e te toca o coração (Gabriel García Marquez)

5. ESTUDO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA ESTABILIDADE E FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE SOJA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA

RESUMO

Após a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja por bactérias lácticas, verifica-se uma queda do pH, o que lhe confere características como viscosidade e acidez. É necessário que os produtos fermentados conservem suas características sensoriais durante a vida de prateleira, mas tem-se observado que o pH continua decrescendo, e conseqüentemente acontece sinérese e mudanças na viscosidade. A fim de solucionar este problema, tem sido aplicada bactéria láctica com capacidade para produzir exopolissacarídeos (EPSs). Em muitos casos os EPS liberados extracelularmente por bactérias lácticas oferecem vantagens e são utilizadas na produção de leites fermentados, para melhorar suas propriedades reológicas. Foram estudadas as variáveis de crescimento do *L. rhamnosus* LR32 na presença de uma mistura padronizada de probióticos contendo lactobacilos e bifidobactéria. Primeiramente foi analisado o efeito das variáveis: proporção dos lactobacilos, concentrações de sacarose, extrato hidrossolúvel de soja, regulador de acidez lactato de cálcio, frutooligossacarídeos (FOS) e polidextrose na produção de EPS, redução da sinérese, viscosidade aparente, e contagens totais durante a vida-de-prateleira. Encontrou-se que quanto maior o teor de sacarose, extrato de soja, FOS e polidextrose os produtos apresentarão menor sinérese. Sacarose e extrato de soja tem efeito positivo na viabilidade dos probióticos e as características reológicas. O lactato de cálcio tem efeito negativo na estabilidade do produto quanto a sinérese, contagens e propriedades reológicas com leve melhoria na estabilidade do pH e viabilidade das bifidobactérias. As melhores estabilidades durante 30 dias vida-de-prateleira foram obtidos em amostras sem lactato de cálcio, 12% de sacarose e 10% extrato de soja, porém uma formulação substituindo a sacarose por 4% de FOS e 4% de polidextrose mostrou bons resultados.

5.1. INTRODUÇÃO

Recentemente tem havido um grande avanço no desenvolvimento dos produtos chamados probióticos (Tamime *et al.*, 1995), que são um suplemento alimentar de microrganismos vivos que afetam de forma benéfica o animal hospedeiro, pela melhora do balanço da microbiota intestinal (Guarner, 1998). A influência positiva das substâncias prebióticas, consideradas como fibras solúveis, na microbiota intestinal tem sido amplamente estudada, onde as espécies probióticas junto com substâncias prebióticas fornece um efeito

combinado, nomeado "simbiótico" (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Alimentos funcionais simbióticos são então os que fornecem tanto probióticos como prebióticos.

Segundo a ANVISA (2002) um alimento probiótico deve conter como mínimo 10^7 UFC/mL de bactérias viáveis para ter efeito terapêutico ótimo e até o prazo de validade, como mínimo 10^6 UFC/mL; também o teor de prebióticos deve suplementar o requerimento diário de 8 g/dia (Yun, 1996; Modler, 1994) em produtos funcionais. Segundo a ANVISA (1998) em relação a alimentos com fibras alimentares, pode ser incorporada como alegação nutricional: fonte de fibras quando o teor é de 3,0g/100g para alimentos sólidos e 1,5g/100mL para líquidos, ou, alto teor de fibras quando contem 6,0g/100g para sólidos, ou, 3,0g/100mL para líquidos.

Produtos fermentados de soja contendo probióticos e prebióticos (alimento simbiótico) apresentam, após fermentação por bactérias lácticas, uma queda do pH que lhes confere características sensoriais como viscosidade e acidez. É necessário que os produtos fermentados conservem suas características sensoriais durante a vida de prateleira, mas tem-se observado que o pH continua decrescendo, com conseqüente sinérese e mudanças na consistência como observado no Capítulo 3.

As culturas *starter* fermentam açúcares para produzir ácido láctico, que serve para acidificar o produto, preservá-lo, e conferir-lhe sabor, também hidrolisam proteínas, alterando a textura do produto (Batt, 1999) e algumas possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos quando fermentadas em meios apropriados (Tuinier *et al.*, 2000, Gorret *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007).

Tem sido atribuído a algumas bactérias lácticas (BAL) produtoras de EPS, efeito benéfico à saúde (Chabot *et al.*, 2002). *Lactobacillus rhamnosus ssp* é uma espécie produtora de EPS com potencial probiótico (Dupont *et al.*, 2000; Macedo, 2002; Champagne *et al.*, 2006).

Em muitos casos os polissacarídeos liberados extracelularmente por bactérias lácticas oferecem vantagens em uma variedade de produtos de alimentos fermentados (Cerning, 1990). De fato, em vez de usar aditivos como melhoradores da textura, estabilizantes, emulsificantes, gelificantes ou agentes antisinérese em alimentos fermentados, pode ser conveniente usar bactérias lácticas produtoras de EPS como culturas *starter* (Smitinont, 1999). Os exopolissacarídeos (EPS) são produzidos por espécies de BAL, como o *Lactobacillus rhamnosus* e são utilizados na obtenção de produtos fermentados para melhorar suas propriedades reológicas (de Vuyst *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002; Shihata & Shah, 2002; Champagne *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007).

A BAL *L. rhamnosus* LR32 foi selecionada pela sua capacidade de crescimento em extrato de soja em altas concentrações de sacarose (12%) e capacidade de produção de EPS conforme

descrito no Capítulo 4. Foi observado que o EPS produzido por *L. rhamnosus* diminuiu a sinérese em produtos simbióticos fermentados a base de soja e teve boa associação ao inóculo padrão contendo os probióticos *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*. No entanto, observou-se que a presença do EPS de *L. rhamnosus* resultou em fermentados menos viscosos.

Segundo Braga (2006) as propriedades de um gel protéico como textura e sinérese, podem ser alteradas não só pela adição de polissacarídeos como também pelas variações na força iônica e pH do sistema. A formação de uma rede protéica é o resultado da agregação das moléculas de proteína, a partir da desnaturação prévia destas e/ou da acidificação do sistema, como acontece durante a fermentação láctica por cultura bacteriana. Utsumi e Kinsella (1985) explicam que as forças moleculares envolvidas na formação de géis térmicos de isolado protéico de soja são pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que o gel é mantido por pontes de hidrogênio e dissulfeto.

Durante a fermentação de meios complexos como o extrato de soja e leite por BAL, o ácido láctico produzido causa agregação das partículas de proteínas (globulinas) levando à formação de um gel frágil. O gel no qual as células bacterianas, açúcares e outros componentes menores ficam retidos, é uma estrutura de rede altamente complexa de proteínas e EPS (Goh *et al.*, 2005).

Na presença de polissacarídeos, a temperatura de desnaturação de algumas proteínas é alterada ou a capacidade de formação dos géis é modificada. Em solução, as proteínas podem atrair e repelir os polissacarídeos dependendo da sua origem, do pH, da força iônica, da temperatura, da concentração ou do cisalhamento a que são submetidas (Beliakova, 2003). As interações complexas entre proteínas e polissacarídeos são um resultado das propriedades físicas de cada biopolímero puro em solução. As propriedades físicas das soluções de biopolímeros parecem ser altamente dependentes da presença de um co-soluto como a sacarose e do processamento térmico, que também podem alterar as características do gel, sendo relacionada à conformação molecular apresentada em solução, como formação de duplas hélices, de ultra-agregados e desordenamento molecular (Neves, 2008). Braga (2006) encontrou em seus estudos que a adição de sacarose em soluções tratadas termicamente na presença de alguns polissacarídeos como a goma xantana, afetou as propriedades reológicas de soluções anisotrópicas ou bifásicas (mistas). Neves (2008) verificou que em géis de polímeros a adição de sacarose aumentou a dureza, deformabilidade, firmeza, teve efeito na diminuição das interações polissacarídeo-solvente e durante a avaliação da capacidade de retenção de água a adição do açúcar promoveu o fortalecimento da rede do gel, com uma malha mais firme e coesa.

Os planejamentos propostos por Plackett & Burman (1946), *Screening Design*, baseados na metodologia de planejamento fatorial, são uma ferramenta estatística muito útil na avaliação prévia de um processo quando temos um grande número de variáveis. 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 de um planejamento completo, mas tem a desvantagem de não permitir a otimização do processo (Rodrigues e Lemma, 2005).

Neste estudo, através de um delineamento experimental Plackett & Burman, foram procurados protótipos de alimento simbiótico a base de soja cujas características funcionais, físico-químicas e sensoriais se mantivessem mais estáveis durante 30 dias de vida-de-prateleira. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos de 6 variáveis (proporção de *Lactobacillus rhamnosus*, teores de sacarose, extrato hidrossolúvel de soja, regulador de acidez lactato de cálcio, frutooligossacarídeos-FOS e polidextrose) na produção de EPS (exopolissacarídeo), sinérese, viscosidade aparente, e contagens totais durante vida de prateleira, tendo por objetivo ainda verificar a aceitação sensorial e a intenção de compra pelo público alvo.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Matéria-prima

Extrato hidrossolúvel de soja (PROVESOL FB Olvebra Industrial S/A-Brasil) 6-10% p/v, misturado com outros ingredientes sólidos foi pasteurizado a 116°C por 5 minutos, resfriado, o agente tamponante foi adicionado vagarosamente e inoculado com cultura(s) probiótica(s) e láctica(s) com 10^5 - 10^7 UFC/mL, incubação a 37°C.

Os agentes prebióticos foram Frutooligossacarídeos (FOS) Raftilose 95®-Orafti e polidextrose Litesse®-Danisco. O agente tamponante foi o lactato de cálcio (PURAC) em solução 10% (m/v). Foi utilizada sílica 0,005% (m/v) (Proceedings) como antiespumante.

5.2.2. Culturas Probióticas e Lácticas

Foram estudadas as linhagens *L. rhamnosus* LR32, produtora de EPS, e os probióticos padrão: *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *Bifidobacterium longum* BL04.

5.2.3. Procedimento de elaboração de alimento simbiótico

A partir de formulações definidas pelo delineamento experimental Plackett & Burman descrito a seguir, foram elaboradas suspensões de extrato hidrossolúvel de soja estéril, segundo formulação foi adicionada (ou não) vagarosamente (gota a gota) solução de lactato de cálcio 10% (m/v) e foi inoculada com misturas de culturas lácticas e fermentada, sem agitação,

a 37 °C até atingir pH 4,8-4,3 (aproximadamente 16 h), coletando-se ao término da fermentação uma amostra (0 dia). Outras amostras foram armazenadas em geladeira (3-8°C) e retiradas após 10, 20 e 30 dias, respectivamente em duplicata. As amostras coletadas foram congeladas para posterior análise.

5.2.4. Estudo das variáveis significativas na estabilidade

Realizou-se um delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios e 4 pontos centrais para um total de 16 ensaios (Rodrigues e Lemma, 2005), sendo 6 variáveis independentes: X₁=Proporção de *L. rhamnosus* e Mix probióticos (*L. acidophilus*+ *L. paracasei* subsp *paracasei* : *L. rhamnosus* / *B.longum*); X₂ = porcentagem de sacarose; X₃= lactato de cálcio como agente tamponante; X₄ = porcentagem de EHsoja; X₅ = porcentagem de frutooligossacarídeos FOS; X₆= porcentagem de polidextrose (Tabela 1). As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram calculados pela média dos valores obtidos.

Tabela 1. Níveis das variáveis para o planejamento Plackett & Burman

Nível	-1	0	+1
X1: Proporção L ₁ L ₂ :LR/B	30:10/60	20:20/60	10:30/60
X2: Sacarose (%)	0	6	12
X3: Lactato de Cálcio (g/L)	0	5	10
X4: EHsoja (%)	6	8	10
X5: FOS (%)	0	2	4
X6: Polidextrose (%)	0	2	4

L₁= *L. acidophilus*, L₂= *L.paracasei* subsp *paracasei*, LR= *L.rhamnosus*, B= *B. longum*, EHsoja= extrato hidrossolúvel de soja, FOS= frutooligossacarídeos

As variáveis dependentes ou respostas foram: contagem total e de bifidobactéria (log UFC/mL), concentração de EPS (g/L), sinérese (%), parâmetros reológicos τ_0 (Pa), k, n e viscosidade aparente (Pa.s); também foi realizado o controle do pH durante a vida-de-prateleira. O tratamento dos resultados foi realizado usando-se as técnicas de planejamento experimental, ajuste a modelos reológicos, e o software STATISTICA 5.0 (Statsoft, Inc.(2000) STATISTICA for Windows).

5.2.5. Metodologia Analítica

5.2.5.1. Determinação do pH

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

5.2.5.1. Sinérese

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

5.2.5.2. Contagem de colônias

Foi feito plaqueamento em profundidade em meio ágar MRS com 0,01% azul de anilina, incubação por 72h a 37°C em aerobiose e anaerobiose gerada por meio de câmara e geradores de anaerobiose Anaerobac-Probac (Mondragón-Bernal, 2005).

5.2.5.3. Determinação das propriedades reológicas

As propriedades reológicas das amostras foram analisadas através do reômetro Carri-Med Rheometer CSL² TA Instruments com prato cônico 6 cm, 1,59° com controle de tensão. Fator de Tensão: 0,0177, fator de deformação: 28,7, truncamento: 67 micron. Foram realizadas em triplicata e os modelos reológicos foram ajustados e selecionados segundo a Tabela 2 pelo coeficiente de correlação e teste de Qui² (valor da dispersão para duas variáveis de escala nominal), com os dados das segundas subidas.

Tabela 2. Modelos reológicos ajustados a cada amostra estudada

Replicatas		
Tipo de Modelo	Ajuste ao Modelo	μ_{ap}
Newtoniano	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma}$, $\tau_0 = 0$	$\mu = \tau / \dot{\gamma} = k$
Pseudoplástico	Ajuste lei da potência $\tau = k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$	$\mu_{ap} = k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$
Plástico de Bingham	Ajuste linear $\tau = k \cdot \dot{\gamma} + \tau_0$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\tau_0 / \dot{\gamma}) + k$
Herschel-Bulkley	Ajuste $\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n$, $n < 1$, $\tau_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\tau_0 / \dot{\gamma}) + k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$

k = índice de consistência, n = índice de escoamento ou fluência, τ_0 = Tensão inicial de deformação. (*), μ_{ap} = viscosidade aparente (Pa.s) calculada a 100 s^{-1} de esforço de deformação, sendo este o valor médio utilizado para mastigação de alimentos.

5.2.5.4. Determinação de Exopolissacarídeos (EPS):

Separação de células

Para cada mL de amostra, foi adicionado 0,01 mL de ácido cítrico 1M, centrifugada a 9640 g durante 10 min/5 °C para remoção de células e proteínas. O sobrenadante foi utilizado para extração do EPS

Extração do EPS Bruto

As enzimas presentes no sobrenadante foram inativadas em banho a 100 °C por 10 min. Os EPS foram precipitados adicionando-se 5 volumes de etanol resfriado, durante 12 h a 4°C. Centrifugou-se a 907 g por 20 min, o precipitado foi re-dissolvido adicionando-se mais 2 volumes de álcool resfriado e deixou-se por uma noite a 4°C. Centrifugou-se a 907 g por 20

min, retirando-se o sobrenadante. Em seguida, evaporou-se o álcool residual durante 3 h a 60 °C e o EPS bruto foi re-dissolvido em água para posteriores análises (Metodologia adaptada de Savadogo *et al.*, 2004; Ruas-Madiedo *et al.*, 2006; Grattepanche *et al.*, 2007).

Quantificação de EPS pelo método da Antrona

A reação foi feita em tubo de ensaio contendo 1 mL de amostra previamente diluída (0,01-0,1 g/L) e 4 mL do reativo Antrona (0,2 g/100 mL de H₂SO₄). Incubou-se os tubos em banho-maria em ebulição durante 10 min e resfriou-se em banho com gelo. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 a 600nm (Silva, 2003). A curva padrão foi feita utilizando-se dextrana de peso molecular 9300 Da.

Foram preparados brancos de EPS de todos os componentes presentes no meio e a somatória dos não-EPS, foi subtraída no resultado final (Goh *et al.*, 2005).

5.2.6. Análise Sensorial

Foram avaliadas as 6 amostras que apresentaram os melhores resultados de estabilidade durante a vida-de-prateleira segundo o planejamento experimental Plackett & Burman e uma amostra controle sem *L. rhamnosus*. As amostras foram elaboradas com extrato hidrossolúvel de soja (FB Olivebra), inoculadas com probióticos (*Lactobacillus acidophilus* LAC4, *L. casei* subsp *paracasei* LBC81, *L. rhamnosus* LR32 e *Bifidobacterium longum* BL04) e prebióticos (frutooligossacarídeos -Raftilose®- e polidextrose -Litesse®); mascarante de soja (quantidade sugerida pelo fabricante Duas Rodas); antiespumante (sílica 0,005% - Proceedings); e saborizante idêntico ao natural em forma sólida sabor leite condensado (Duas Rodas), sacarose como adoçante tradicional e associação de edulcorantes acessulfame K- e sucralose (25:75 m:m) para amostras *diet* em sacarose.

5.2.6.1. Preparação das amostras para testes sensoriais

Os produtos fermentados foram mantidos sob refrigeração até a realização dos testes sensoriais por 12 horas. As amostras foram servidas aos provadores em cabines individuais codificadas com números de três dígitos, em recipientes plásticos brancos descartáveis com capacidade para 50 mL. As amostras foram elaboradas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP.

Para avaliar a aceitabilidade das amostras quanto à aparência, sabor, doçura, consistência e impressão global, os provadores utilizaram uma escala não-estruturada de nove centímetros, com termos ancorados em seus extremos, sendo desgostei muitíssimo à esquerda e gostei muitíssimo à direita. Para avaliar a atitude de intenção de compra, utilizou-se escala estruturada de cinco pontos, indo de 5 igual a certamente compraria o produto até 1 igual a certamente não compraria o produto (Meilgaard *et al.*, 1999). As amostras foram avaliadas por 32 provadores, potenciais consumidores dentro da comunidade da Faculdade de

Engenharia de Alimentos da Unicamp. Foi realizada análise de variância e teste de médias de Tukey do tipo HSD nos resultados.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Vida-de-prateleira

A matriz e as respostas do delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios e 4 pontos centrais aplicados para determinar o efeito de seis variáveis independentes na estabilidade durante 30 dias de vida-de-prateleira em relação a sinérese, contagens, EPS e pH do alimento simbiótico fermentado a base de extrato de soja apresentam-se na Tabelas 3.

Estima-se que um número maior de 10^7 UFC/mL de probióticos é necessário para obter um efeito terapêutico ótimo (Ribka & Kailasapathy, 1995) e como mínimo manter 10^6 UFC/mL no final da vida de prateleira (ANVISA, 2002). Owehand (2005) estabelece que o consumo de uma dose diária de 10^9 UFC de probióticos é suficiente para obter bom efeito terapêutico. Pela Tabela 3, pode-se perceber que as populações de probióticos, após os 30 dias de prateleira, se mantiveram em contagens superiores a 8 log UFC/mL. O ensaio 2 foi o que obteve a maior contagem no 30º dia sendo de 11,18 log UFC/mL. Observa-se, que todos os ensaios realizados apresentaram número maior ao exigido.

Quanto a contagem de bifidobactérias, verificou-se que foi mantida na maioria dos ensaios, praticamente constante e com valores $\geq 7,0$ log UFC/mL, houve ensaios que atingiram > 10 UFC/mL. Outros ensaios como 1 e 5, apresentaram maior oscilação da bifidobactéria ao longo da estocagem talvez devido à condição de maior proporção de *L. rhamnosus* no inóculo, competindo com a bifidobactéria, e à pouca disponibilidade de fontes de carbono pela ausência de sacarose e prebióticos no ensaio 1. Já o ensaio 7, com menor proporção de *L. rhamnosus*, com 12% de sacarose e 4% de povidextrose, oscilou de forma positiva pois houve um aumento considerável da bifidobactéria do início da estocagem (8,43 UFC/mL) até os 10 dias subseqüentes (10,57 UFC/mL).

Crittenden e colaboradores (2001) elaboraram iogurte composto por de sólidos do leite desengordurados 14%, gordura 2,1%, sacarose 6% e os prebióticos amido resistente (Hi-maize) 1% e inulina 1%. Os iogurtes foram inoculados com *S. thermophilus* DS 224 e as linhagens de bifidobactérias selecionadas pela sua capacidade de hidrolisar o amido resistente. Estes autores encontraram que o isolado *Bifidobacterium lactis* B94 e a linhagem comercial *B. lactis* DS 920 sobreviveram sem perdas substanciais de viabilidade em iogurte simbiótico mantendo contagens maiores a 7 log UFC/mL durante estocagem a 4 oC por 5 semanas, enquanto que as contagens do isolado altamente amilolítico *B. adolescentis* B97 foram inferiores a 2 log UFC/mL em 4 semanas.

Tabela 3. Plackett & Burman para o estudo da estabilidade do alimento simbiótico fermentado a base de extrato de soja durante 0, 10, 20 e 30 dias de prateleira.

Ensaio	Variáveis Independentes*						0 DIAS					10 DIAS				
	x1	x2	x3	x4	x5	x6	Respostas					Respostas				
							Sinérese	Contagem Total log UFC/ mL	Contagem Bífido logUFC/ mL	EPS (g/ L)	pH final	Sinérese	Contagem Total log UFC/ mL	Contagem Bífido logUFC/ mL	EPS (g/ L)	pH final
1	1	-1	1	-1	-1	-1	26,8%	8,77	8,29	0,67	5,0	27,4%	9,60	8,00	0,48	4,5
2	1	1	-1	1	-1	-1	2,3%	9,66	9,17	4,88	4,7	1,6%	10,48	9,54	9,66	4,2
3	-1	1	1	-1	1	-1	15,3%	9,88	9,35	3,17	4,7	18,3%	10,06	9,13	11,61	4,2
4	1	-1	1	1	-1	1	23,6%	9,28	8,62	3,43	4,8	26,2%	10,05	8,85	3,47	4,4
5	1	1	-1	1	1	-1	1,6%	10,47	9,67	3,34	4,5	0,9%	11,06	10,52	4,10	4,1
6	1	1	1	-1	1	1	12,0%	10,19	8,81	4,87	4,6	16,7%	10,75	9,54	4,82	4,2
7	-1	1	1	1	-1	1	14,2%	10,05	8,34	6,06	4,7	16,9%	10,73	10,57	13,66	4,4
8	-1	-1	1	1	1	-1	17,7%	9,50	8,73	1,09	4,7	20,6%	9,87	9,47	1,28	4,3
9	-1	-1	-1	1	1	1	4,0%	10,52	10,55	3,04	4,5	2,4%	9,43	9,24	1,41	4,0
10	1	-1	-1	-1	1	1	4,0%	10,26	10,03	2,97	4,4	5,0%	10,15	9,10	0,90	4,0
11	-1	1	-1	-1	-1	1	2,4%	10,32	9,34	4,28	4,5	9,6%	10,28	10,13	1,08	4,0
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	20,1%	8,98	8,84	0,57	5,0	28,6%	8,68	8,63	0,29	4,5
13	0	0	0	0	0	0	16,7%	10,20	9,58	6,08	4,8	15,6%	10,25	9,75	2,54	4,2
14	0	0	0	0	0	0	13,3%	10,07	9,34	4,52	4,8	10,6%	10,60	9,94	3,05	4,1
15	0	0	0	0	0	0	12,7%	10,35	8,96	4,77	4,6	15,5%	9,38	8,69	5,90	4,2
16	0	0	0	0	0	0	19,4%	10,32	9,89	4,83	4,6	18,7%	10,34	9,89	11,46	4,3

* Variáveis independentes $x_i = (-1; 0; +1)$, sendo: $x_1 =$ proporção $L_1L_2:LR/B$ (10:30/60; 20:20/60; 30:10/60); $x_2 =$ % Sacarose (0; 6; 12 % m/v); $x_3 =$ Lactato de cálcio (0; 5; 10 g/L); $x_4 =$ EHsoja (6; 8; 10% m/v); $x_5 =$ % FOS (0; 2; 4% m/v); $x_6 =$ % povidexose (0; 2; 4% m/v).

Continuação da Tabela 3.

Ensaio	Variáveis Independentes*						20 DIAS					30 DIAS				
	Respostas						Respostas					Respostas				
	x1	x2	x3	x4	x5	x6	Sinérese	Contagem Total log UFC/ mL	Contagem Bífido logUFC/ mL	EPS (g/ L)	pH final	Sinérese	Contagem Total log UFC/ mL	Contagem Bífido logUFC/ mL	EPS (g/ L)	pH final
1	1	-1	1	-1	-1	-1	34,4%	10,41	9,88	0,35	4,4	32,0%	11,01	9,18	0,39	4,4
2	1	1	-1	1	-1	-1	6,3%	10,37	9,36	1,78	4,0	4,9%	11,18	9,92	3,36	4,0
3	-1	1	1	-1	1	-1	20,8%	10,66	10,26	4,73	4,0	25,0%	10,06	9,49	3,75	4,0
4	1	-1	1	1	-1	1	19,4%	10,56	10,17	2,37	4,3	34,4%	9,91	8,85	1,84	4,3
5	1	1	-1	1	1	-1	3,2%	10,49	7,70	4,60	3,9	4,8%	10,17	8,48	4,65	3,9
6	1	1	1	-1	1	1	18,1%	10,76	8,90	6,29	4,1	20,3%	9,92	8,60	5,34	4,1
7	-1	1	1	1	-1	1	16,5%	11,15	10,82	11,57	4,2	20,3%	10,35	9,86	16,20	4,1
8	-1	-1	1	1	1	-1	26,6%	10,40	9,32	1,74	4,2	19,0%	10,05	9,39	0,66	4,2
9	-1	-1	-1	1	1	1	6,3%	10,52	9,44	2,22	3,9	5,6%	9,60	9,44	2,06	4,0
10	1	-1	-1	-1	1	1	9,5%	10,40	9,61	0,78	3,9	8,8%	8,59	7,85	0,76	3,9
11	-1	1	-1	-1	-1	1	7,2%	10,54	9,75	1,36	3,9	6,3%	9,79	9,00	3,21	3,8
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	32,3%	9,64	8,40	0,10	4,4	23,7%	9,26	8,71	0,14	4,3
13	0	0	0	0	0	0	23,3%	10,78	9,72	2,31	4,0	21,3%	9,06	7,70	4,38	4,0
14	0	0	0	0	0	0	13,0%	10,67	9,80	3,88	4,0	14,6%	9,33	8,40	3,50	4,0
15	0	0	0	0	0	0	20,5%	10,59	10,16	3,76	4,2	20,2%	9,30	8,95	4,18	4,1
16	0	0	0	0	0	0	25,6%	10,74	9,66	2,65	4,2	27,4%	9,15	8,48	5,12	4,1

* Variáveis independentes $x_i = (-1; 0; +1)$, sendo: $x_1 =$ proporção $L_1L_2:LR/B$ (10:30/60; 20:20/60; 30:10/60); $x_2 =$ % Sacarose (0; 6; 12 % m/v); $x_3 =$ Lactato de cálcio (0; 5; 10 g/L); $x_4 =$ EHsoja (6; 8; 10% m/v); $x_5 =$ %FOS (0; 2; 4% m/v); $x_6 =$ % povidexrose (0; 2; 4% m/v).

Crittenden *et al.* (2001) observaram também que *Bifidobacterium lactis* B94 cresceu pobremente na presença de monossacarídeos como frutose, galactose e xilose quando comparado com dissacarídeos e oligossacarídeos.

As maiores mudanças no pH foram mostradas nos primeiros 10 dias de estocagem para todas as amostras. O pH apresentou variação entre os diferentes ensaios, mudando entre as faixas de 4,0-5,0 no início da estocagem até 4,0 a 4,5 nos 10 primeiros dias. Após 10 e até completar 30 dias de prateleira permaneceram num intervalo de pH de 3,8 a 4,4. Os ensaios 1 e 12 apresentaram os maiores valores de pH e os ensaios 10 e 11 os mais baixos no 30º dia. Crittenden e colaboradores (2001) observaram que o pH em iogurtes simbióticos a base de leite contendo os prebióticos inulina e amido resistente e inoculados *S. thermophilus* DS 224 e bifidobactérias variou de 4,5 até 4,1 desde o início da estocagem e após 5 semanas de vida-de-prateleira.

A sinérese é considerada uma medida extremamente importante para o processo, devido ao aspecto visual dado ao produto final. Os ensaios 2, 5 e 9 apresentaram a menor porcentagem de sinérese, sendo considerados os melhores resultados. O ensaio 11 também apresentou baixa sinérese. Observa-se que todos esses ensaios continham sacarose 12%, com exceção o ensaio 9 que continha FOS e polidextrose nos máximos teores trabalhados (4% de cada um) e também nenhum tinha lactato de cálcio dentro da formulação.

Os resultados da quantificação de EPS mantiveram-se praticamente constantes nos ensaios, com exceção do 10º dia e do ensaio 7, que se mostrou muito diferente dos outros, com maior concentração de EPS em toda a vida-de-prateleira.

A viscosidade aparente também é um fator de extrema importância na qualidade do produto final. Um produto muito líquido não é bem aceito pela maioria das pessoas, pois associam o iogurte a uma textura mais consistente e cremosa.

A Tabela 4 apresenta os modelos reológicos com melhor ajuste (maior coeficiente de variação explicada - R^2) para cada um dos ensaios do delineamento experimental, assim como os parâmetros reológicos τ_0 , k e n e o cálculo do μ_{ap} para uma deformação de 150 s^{-1} (para mastigação de alimentos). Observa-se que a maioria dos ensaios se comportam como um fluido Herschel-Bulkley, associado aos ensaios que apresentam na sua formulação o extrato de soja em 10%. Alguns ensaios mostraram-se pseudoplásticos, pois apresentaram τ_0 desprezíveis, houve um caso de plástico de Bingham com o ensaio 9 no dia zero e de dilatante no caso do ensaio 12.

Tabela 4. Modelos reológicos ajustados para os ensaios do delineamento experimental Plackett & Burman

Ensaio	Modelo 0 dias	R ²	τ_0			μ_{ap} (Pa.s)
			(Pa)	k	n	($\dot{\gamma} = 150 \text{ s}^{-1}$)
1	Pseudoplástico	0,99982		0,068	0,967	0,0574
2	Herschel-Bulkley	0,99984	0,421	0,025	0,876	0,0159
3	Herschel-Bulkley	0,99996		0,018	0,870	0,0099
4	Herschel-Bulkley	0,99992		0,011	0,924	0,0082
5	Herschel-Bulkley	0,99841	0,742	0,038	0,824	0,0207
6	Herschel-Bulkley	0,99997	0,037	0,025	0,846	0,0116
7	Herschel-Bulkley	0,99990	0,034	0,043	0,828	0,0186
8	Pseudoplástico	0,99885		0,023	0,832	0,0098
9	Plast Bingham-	0,99968	0,231	0,007	1,007	0,0088
10	Pseudoplástico	0,99991		0,003	1,063	0,0050
11	Herschel-Bulkley	0,99995	0,244	0,018	0,860	0,0106
12	Dilatante	0,99977	0,084	0,001	1,299	0,0032
13	Herschel-Bulkley	0,99997	0,089	0,021	0,877	0,0117
14	Herschel-Bulkley	0,99989	0,084	0,031	0,824	0,0134
15	Herschel-Bulkley	0,99900	0,088	0,030	0,840	0,0139
16	Pseudoplástico	0,99990		0,027	0,830	0,0114

Ensaio	Modelo 10 dias	R ²	τ_0			μ_{ap} (Pa.s)
			(Pa)	k	n	($\dot{\gamma} = 150 \text{ s}^{-1}$)
1	Newtoniano-dilatante	0,99940		0,003	1,015	0,0027
2	Herschel-Bulkley	0,99992	1,779	0,126	0,721	0,0429
3	Pseudoplástico	0,99984		0,017	0,884	0,0093
4	Pseudoplástico	0,99975		0,013	0,917	0,0088
5	Herschel-Bulkley	0,99994	1,443	0,123	0,684	0,0347
6	Herschel-Bulkley	0,99999	0,052	0,020	0,901	0,0127
7	Herschel-Bulkley	0,99998	0,187	0,099	0,838	0,0450
8	Pseudoplástico	0,99910		0,026	0,839	0,0111
9	Herschel-Bulkley	0,99990	0,555	0,019	0,887	0,0139
10	Herschel-Bulkley	0,99994	0,064	0,005	0,982	0,0052
11	Herschel-Bulkley	0,99995	0,849	0,047	0,766	0,0202
12	Dilatante	0,99965	0,022	0,002	1,127	0,0032
13	Herschel-Bulkley	0,99999	0,071	0,028	0,857	0,0141
14	Herschel-Bulkley	0,99994	0,120	0,035	0,838	0,0158
15	Herschel-Bulkley	0,99996	0,073	0,026	0,865	0,0135
16	Herschel-Bulkley	0,99997	0,052	0,020	0,889	0,0117

Continuação da Tabela 4			τ_0	μ_{ap} (Pa.s)		
Ensaio	Modelo 30 dias	R ²	(Pa)	K	N	($\gamma = 150 \text{ s}^{-1}$)
1	Pseudoplástico	0,99969		0,003	0,999	0,0030
2	Herschel-Bulkley	0,99774	1,034	0,852	0,513	0,0678
3	Pseudoplástico	0,99991		0,025	0,848	0,0111
4	Herschel-Bulkley	0,99980		0,008	0,980	0,0077
5	Herschel-Bulkley	0,99943	1,372	0,379	0,538	0,0456
6	Herschel-Bulkley	0,99997	0,041	0,023	0,879	0,0125
7	Pseudoplástico	0,99963	0,000	0,334	0,735	0,0885
8	Pseudoplástico	0,99944		0,029	0,806	0,0110
9	Herschel-Bulkley	0,99975	0,618	0,057	0,732	0,0200
10	Herschel-Bulkley	0,99988	0,248	0,038	0,746	0,0122
11	Herschel-Bulkley	0,99873	0,336	0,287	0,512	0,0260
12	Dilatante	0,99970	0,039	0,001	1,179	0,0028
13	Herschel-Bulkley	0,99987	0,104	0,032	0,851	0,0157
14	Herschel-Bulkley	0,99986	0,112	0,060	0,780	0,0206
15	Herschel-Bulkley	0,99999	0,052	0,022	0,887	0,0127
16	Pseudoplástico	0,99998	0,000	0,030	0,849	0,0139

τ_0 : Tensão inicial de cisalhamento (Pa), k= índice de consistência, n= índice de escoamento, μ_{ap} : viscosidade aparente calculada à deformação $\gamma = 150 \text{ s}^{-1}$ (para mastigação de alimentos).

Pela Figura 1 é possível notar que os ensaios 1 (atipicamente), 5 e 7 apresentam as maiores viscosidades aparentes (μ_{ap}), sendo que a do ensaio 1 decresceu do tempo 0 a 10 dias, chegando a valores bem inferiores aos dos outros ensaios. A viscosidade do ensaio 7 aumentou durante toda a vida-de-prateleira. E do ensaio 5 há um pequeno aumento até o 10^o dia, mas depois permaneceu praticamente constante.

Outra propriedade reológica analisada foi a tensão inicial de cisalhamento (τ_0), ou seja, a tensão exigida pelo produto para que ocorra o escoamento. Nota-se, pela Tabela 4, que as maiores tensões ocorreram nos ensaios 2 e 5, sendo que o ensaio 2 teve um aumento no valor de tensão nos primeiros 10 dias, e depois ocorreu um declínio até o 30^o dia. E o ensaio 5 apresenta um pequeno aumento até o 10^o dia, porém seu valor permaneceu constante até completar os 30 dias de vida-de-prateleira.

Os índices de escoamento (n) e consistência (k) são mostrados na Tabela 4. Notou-se que o k aumentou a partir do 10^o dia para os ensaios 2, 5, 7 e 11, e nos outros ensaios, os valores permanecem constantes. O n diminuiu para os ensaios 2, 5, 10 e 11 durante toda a vida-de-prateleira, sendo que para o ensaio 12 houve

diminuição apenas até o 10^o dia. O ensaio 12 apresentou os menores k e os maiores n , o que se explica por ser um experimento com todas as variáveis no nível -1 do delineamento experimental, tornando-o o pior dos ensaios em relação à estabilidade. Nos outros ensaios n permaneceu praticamente constante.

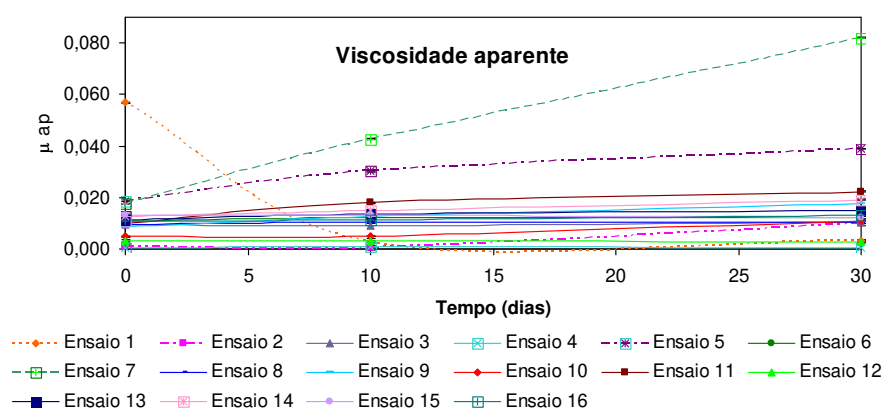


Figura 1. Viscosidade aparente (Pa.s) do Plackett & Burman durante a vida-de-prateleira.

Teles e Flôres (2007) encontraram comportamento tanto de fluido Herschel-Bulkley em iogurtes elaborados com leite em pó, quanto pseudoplásticos quando adicionados com diferentes espessantes, onde os parâmetros reológicos oscilaram entre 0,12 e 2,27 Pa para τ_0 , 0,04 e 2,57 para k e 0,19 e 0,73 s^{-1} para n , os iogurtes não continham sacarose.

Na Tabela 5 é apresentado o resumo dos efeitos principais, os coeficientes de variação explicada (R^2) e as variáveis que apresentaram significância ($p \leq 0.1$) para cada uma das oito respostas do delineamento experimental Plackett & Burman relacionadas à estabilidade do produto simbiótico para 0, 10 e 30 dias de vida de prateleira. No 10^o dia de estocagem foram verificadas as maiores mudanças em todas as respostas, isto pode ser observado também pelos efeitos das variáveis.

Através do cálculo dos efeitos principais e o erro padrão ($p \leq 0.1$) para o produto terminado logo após a fermentação, a Contagem Total (CT), o lactato de cálcio apresentou efeito negativo, ou seja, que quanto maior a concentração de lactato adicionada menor a CT. Os FOS e a polidextrose apresentaram efeito positivo, indicando que quanto maior adição destes prebióticos (dentro das faixas do estudo), maior a CT. No entanto no 10^o dia de estocagem só a proporção de lactato de cálcio e

a sacarose mostraram efeito positivo. No entanto, para 30 dias de prateleira, nenhuma variável apresentou efeito significativo indicando que após esse período de armazenamento atingiu-se estabilidade microbiana.

Tabela 5. Resumo dos efeitos das variáveis independentes e coeficiente de variação explicada para as respostas do delineamento experimental Plackett & Burman na estabilidade do simbiótico de soja durante vida de prateleira.

Efeitos estimados nas Respostas								
Variáveis independentes	Y ₁ = Sin	Y ₂ = EPS	Y ₃ = CT	Y ₄ = Bif	Y ₅ = μ_{ap}	Y ₆ = τ_0	Y ₇ = k	Y ₈ = n
0 dias								
R ²	0,8795	0,6972	0,8482	0,7621	0,4098	0,8182	0,5139	0,6295
Média	0,13	3,66	9,93	9,22	0,016	0,136	0,063	0,902
x ₁ = Proporção LR	-0,01	0,32	-0,10	-0,09	0,010	0,101	0,112	-0,057
x ₂ = % Sacarose	-0,08	2,47	0,54	-0,06	0,000	0,195	-0,093	-0,141
x ₃ = % Lactato de Ca	0,13	0,03	-0,42	-0,91	0,008	-0,256	0,117	-0,086
x ₄ = % EHsoja	-0,03	0,89	0,18	0,07	-0,002	0,177	-0,100	-0,078
x ₅ = % FOS	-0,06	-0,24	0,63	0,76	-0,008	0,039	-0,109	-0,076
x ₆ = % Polidextrose	-0,04	1,82	0,56	0,27	-0,010	-0,117	-0,112	-0,047
10 dias								
R ²	0,8606	0,5520	0,7632	0,7050	0,9054	0,8709	0,9129	0,8046
Média	0,15	4,73	10,11	9,44	0,019	0,329	0,038	0,875
x ₁ = Proporção LR	-0,03	-0,98	0,51	-0,27	0,002	0,288	0,014	-0,020
x ₂ = % Sacarose	-0,08	6,19	0,93	1,02	0,024	0,612	0,061	-0,162
x ₃ = % Lactato de Ca	0,13	2,98	0,16	-0,27	-0,008	-0,745	-0,024	0,038
x ₄ = % EHsoja	-0,06	2,40	0,35	0,61	0,020	0,496	0,052	-0,132
x ₅ = % FOS	-0,08	-0,75	0,25	0,21	-0,007	-0,121	-0,013	-0,034
x ₆ = % Polidextrose	-0,03	-0,35	0,27	0,35	-0,001	-0,256	-0,015	0,003
30 dias								
R ²	0,8100	0,7093	0,5648	0,4552	0,7500	0,9003	0,8172	0,6823
Média	0,18	3,72	9,80	8,89	0,026	0,271	0,107	0,802
x ₁ = Proporção LR	0,01	-1,61	0,28	-0,50	-0,003	0,347	0,016	-0,027
x ₂ = % Sacarose	-0,07	5,11	0,51	0,32	0,037	0,376	0,214	-0,211
x ₃ = % Lactato de Ca	0,16	2,33	0,45	0,33	-0,009	-0,664	-0,118	0,146
x ₄ = % EHsoja	-0,05	2,53	0,43	0,52	0,032	0,457	0,135	-0,144
x ₅ = % FOS	-0,06	-1,32	-0,52	-0,38	-0,014	0,082	-0,077	-0,061
x ₆ = % Polidextrose	-0,02	2,74	-0,60	-0,26	0,006	-0,264	-0,010	-0,075

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,1$) sobre as respostas para estabilidade, calculados através do SS residual. Sin= sinérese, EPS= exopolissacarídeo, CT= contagem total, Bif= contagem de bifidobactéria, μ_{ap} = viscosidade aparente, τ_0 = tensão inicial de deformação, k= índice de consistência, n= índice de escoamento.

Já para a manutenção da Bifidobactéria Bif - (*B. longum* BL04) o lactato de cálcio apresentou efeito significativo negativo e somente os FOS apresentaram efeito positivo e significativo. No entanto, após 10 dias foram a sacarose e o extrato de soja as variáveis que tiveram efeito e positivo. Após 30 dias de prateleira nenhuma variável

mostrou efeito significativo na manutenção da bifidobactéria, mostrando que as contagens da bifidobactérias até os 30 dias são estáveis.

A sacarose seguida pela povidexrose são as variáveis com maior efeito positivo ($p \leq 0.10$) sobre o EPS no produto final (0 dias de prateleira), porém após 10 e 30 dias só a sacarose tem efeito positivo e os FOS um pequeno efeito negativo na resposta no final da estocagem. Pode-se observar que o teor de EPS não se encontra associado à estabilidade do produto nem à quantidade de inóculo de *L. rhamnosus* (sem efeito na resposta). Com isto, seria interessante estudar o inóculo do *L. rhamnosus* na fermentação numa faixa menor, com o objetivo de adicionar o mínimo necessário para atingir uma boa estabilidade.

O lactato de cálcio mostrou o maior efeito significativo positivo sobre a resposta sinérese: os ensaios com menor porcentagem de sinérese não o apresentavam. Outros fatores com efeito significativo negativo foram sacarose, FOS e povidexrose. A sinérese aumentou em média de 13% para 18% ao longo dos 30 dias de vida de prateleira. O lactato afeta altamente a estabilidade quanto à sinérese, contagens e propriedades reológicas, porém as amostras apresentam uma leve melhoria na estabilidade do pH durante a vida-de-prateleira. Isto sugere estudos numa faixa inferior à estudada levando em consideração o procedimento de adição, pois a proteína precipita rapidamente quando o lactato não é adicionado vagarosamente e a baixas temperaturas no extrato de soja.

Como pode ser observado na Tabela 5, para a viscosidade aparente, no dia zero de prateleira, não houve variáveis com efeito significativo, porém após 10 dias a sacarose e o extrato de soja mostraram efeito positivo e o lactato de cálcio e os FOS negativo. Já aos 30 dias de estocagem só as variáveis sacarose e extrato de soja apresentaram efeito significativo e positivo, cuja média aumentou de 0,02 para 0,03 Pa.s. Isto mostra que com o tempo de armazenamento continuam ocorrendo diversas interações químicas entre os componentes e a atividade metabólica das bactérias lácticas continua causando mudanças no pH do meio, na estrutura das proteínas da soja, os EPS e como consequência na consistência e viscosidade dos produtos fermentados.

As variáveis com efeito significativo no tempo zero para o τ_0 foram a sacarose e o extrato de soja com efeito positivo e o lactato de cálcio e a povidexrose com efeito negativo. Os ensaios 6, 7 e 10 formulados com povidexrose e lactato apresentaram os menores valores para τ_0 , porém, os ensaios 2 e 5 elaborados com 12% de sacarose, 10% extrato de soja e sem lactato obtiveram os maiores resultados de τ_0 . O ensaio 9

contendo povidexose (4%) e extrato de soja (10%), na ausência de sacarose e de lactato de cálcio, apresentou um valor intermediário de τ_0 . No 10º dia a proporção de *L. rhamnosus* assim como a sacarose e o extrato de soja tiveram efeito positivo e só o lactato negativo no τ_0 . Após 30 dias todas as variáveis, com exceção dos FOS, apresentaram efeito sobre o τ_0 , sendo que a proporção de *L. rhamnosus* a sacarose e o extrato de soja foram positivos para o τ_0 . Os ensaios 2 e 5, inoculados com a condição 30:10/60 dos lactobacilos, apresentaram os maiores valores de τ_0 , parâmetro que define os fluidos Herschel-Bulkley, característico de alguns iogurtes como descrito por Teles e Flôres (2007). Observou-se que a média do τ_0 aumenta de 0,16 para 0,27 Pa de 0 a 30 dias de prateleira, conforme o μ_{ap} .

Na Tabela 5, observa-se que para os índices reológicos k e n aconteceu o mesmo fenômeno que para τ_0 no dia zero de prateleira, ou seja, não houve variáveis com efeito significativo sobre elas. Já no 10º dia a sacarose e o extrato de soja tiveram efeito positivo no k e negativo no n , e, o lactato de cálcio teve efeito negativo sobre o k e positivo sobre o n . Os efeitos das variáveis foram semelhantes após 30 dias de estocagem para k e n . As médias de k diminuíram de 0,06 para 0,04 no 10º dia e aumentaram para 0,11 no 30º dia de prateleira, enquanto que as médias do n diminuíram de 0,90 para 0,88 no 10º dia e para 0,80 no 30º dia. Pode-se observar que a tendência geral foi o aumento da viscosidade ao longo da vida de prateleira.

De acordo com as anteriores observações, é possível analisar que os ensaios que apresentaram melhor estabilidade global ao longo dos 30 dias de vida de prateleira foram: 2, 5, 9 e 11 em relação a sinérese, características reológicas e viabilidade e as variáveis que afetam mais positivamente a estabilidade são a sacarose, o extrato de soja os FOS e a povidexose, enquanto o *L. rhamnosus* só teve efeito positivo na contagem total e no τ_0 , que caracteriza os fluidos Herschel-Bulkley.

5.3.2. Análise sensorial

Os testes sensoriais afetivos realizados tiveram como objetivo comparar os ensaios que obtiveram as melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira a partir do delineamento experimental Plackett & Burman desenvolvido neste estudo. Estes testes afetivos visaram conhecer o nível de aceitação e intenção de compra pelo público alvo dos ensaios selecionados, dada a expectativa de uma possível comercialização.

Com esta finalidade, os ensaios 2, 5, 7, 9 e 11 foram avaliados comparativamente o ensaio 15, um dos pontos centrais do delineamento. Estes ensaios também foram comparados a uma amostra chamada de Controle, a qual foi

elaborada nas condições não otimizadas de estabilidade, ou seja, sem conter *L. rhamnosus* (segundo formulação utilizada nos capítulos 2 e 3 desta tese) com teor de prebióticos estabelecido a priori, porém nas condições otimizadas de sabor e doçura ideal (Mondragón-Bernal,2005) (Cap 2).

Como pode ser observado na Tabela 6, as médias dos testes sensoriais afetivos de aceitação global mostram que o tratamento controle apresentou sempre uma média de notas altas em todas as características avaliadas. Os ensaios 2, 5, 9 e 11 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao Controle. O ensaio 7 (contendo lactato de cálcio) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao Controle somente em relação à aparência e consistência. O ensaio 15 se mostrou estatisticamente diferente ($p < 0,05$) ao Controle em todas as características estudadas: aparência, sabor, doçura, consistência e impressão global, conforme o esperado.

Tabela 6. Testes afetivos de aceitação sensorial para os ensaios com melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira a partir do delineamento experimental Plackett & Burman.

Ensaio*	Aparência Média**	Sabor Média	Doçura Média	Consistência Média	Impressão Global Média
2	6,33±2,14 ^a	5,20±2,09 ^a	5,86±2,53 ^a	5,80±2,35 ^{ab}	5,34±2,12 ^a
5	5,46±1,95 ^{ac}	5,52±1,80 ^a	5,84±2,16 ^a	5,50±1,89 ^{abc}	5,65±1,64 ^a
7	4,63±1,91 ^d	4,19±2,36 ^{ab}	5,48±2,14 ^a	4,23±2,17 ^{bc}	4,29±2,01 ^{ab}
9	6,39±2,01 ^a	4,91±2,22 ^{ab}	5,52±2,19 ^a	5,75±2,25 ^{ab}	5,22±2,13 ^a
11	6,11±1,82 ^{ab}	5,61±2,17 ^a	6,12±2,20 ^a	4,79±2,35 ^{abc}	5,50±2,19 ^a
15	4,87±2,03 ^{bcd}	3,44±2,09 ^b	3,40±2,07 ^b	4,10±1,88 ^c	3,48±1,79 ^b
Controle	6,69±1,96 ^a	5,47±2,27 ^a	6,08±2,27 ^a	6,01±2,39 ^a	5,83±2,02 ^a

* A composição dos ensaios foi realizada de acordo com a Tabela 3.

** Médias com letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si a $p \leq 0,05$.

As notas médias mais altas dadas pelo público alvo foram para a aparência da amostra controle com escores de 6,69, doçura do ensaio 11 com nota 6,12 e consistência do Controle com média 6,01. Gostaram ligeiramente do sabor das amostras sendo a maior média 5,61 para o ensaio 11 (com menor teor de soja, 6%), e, da impressão global, com 5,83 para a amostra controle. Os provadores desgostaram ligeiramente do sabor, doçura e impressão global do ensaio 15 (com 6% de sacarose e

8% de EHsoja), com notas inferiores a 3,5, sendo que nem gostaram nem desgostaram da aparência e da consistência (médias de 4,87 e 4,10 respectivamente).

Ressalta-se que o ensaio 9, produto sem sacarose e adoçado com associação de edulcorantes hipocalóricos em magnitude edulcorante igual a 12% de sacarose (Cap.2. parte 2), é um protótipo interessante na versão *light* ou *diet* em sacarose. O ensaio 9 apresentou boas características de estabilidade durante vida-de-prateleira de 30 dias e sensorialmente não apresentou diferenças significativas com a amostra controle, mostrando aceitação e intenção de compra pelo público alvo.

Na tabela 7, são mostradas as médias da atitude de compra para os ensaios, sendo que as respostas apresentaram comportamento similar às de aceitação. Valores acima de 3,5 indicam que os consumidores potenciais provavelmente comprariam o produto, a maior média foi para o Controle (3,59). Médias entre 2,5 e 3,5 significam que há dúvida por parte dos consumidores quanto à sua intenção de compra (ensaios 2, 5, 9 e 11). As médias dos ensaios 7 e 15 indicam que provavelmente não os comprariam.

Tabela 7. Teste afetivo de intenção de compra pelo público alvo para os ensaios com melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira a partir do delineamento experimental Plackett & Burman.

Ensaio*	Média	% C+ P**	% C+ P+ D***
2	3,34 ± 1,15	53,1%	78,1%
5	3,38 ± 1,01	50,0%	84,4%
7	2,44 ± 1,16	28,1%	40,6%
9	3,03 ± 1,15	43,8%	71,9%
11	3,22 ± 1,18	40,6%	65,6%
15	2,03 ± 1,03	9,4%	25,0%
Controle	3,59 ± 1,07	62,5%	81,3%

* A composição dos ensaios foi realizada de acordo com a Tabela 3.

**% dos provadores entre os que certamente e provavelmente comprariam o produto

*** % dos provadores entre os que certamente comprariam, provavelmente comprariam e apresentam dúvida para comprar o produto.

Deve-se ressaltar o fato de que as médias não apresentaram um comportamento normal e são o resultado tanto de notas altas como de baixas dadas pelos provadores para cada amostra. Essas diferenças geralmente decorrem do fato de que provadores utilizam diferentes partes da escala para expressar suas impressões.

Em termos de porcentagem quanto à atitude de compra, as amostras Controle e os ensaios 2 e 5 obtiveram as maiores porcentagens da população entre os que provavelmente e certamente comprariam o produto, sendo 62,5%, 53,1% e

50,0%, respectivamente. Já para os ensaios 2, 5, 9,11 e Controle as percentagens da população que estão entre duvidar e certamente comprar o produto são 78,1%, 84,4%, 71,9, 65,6 e 81,3%, respectivamente, tal como representado na Figura 2. Os ensaios 7 e 15 apresentaram percentagens inferiores a 40 % na intenção de compra por parte dos provadores.

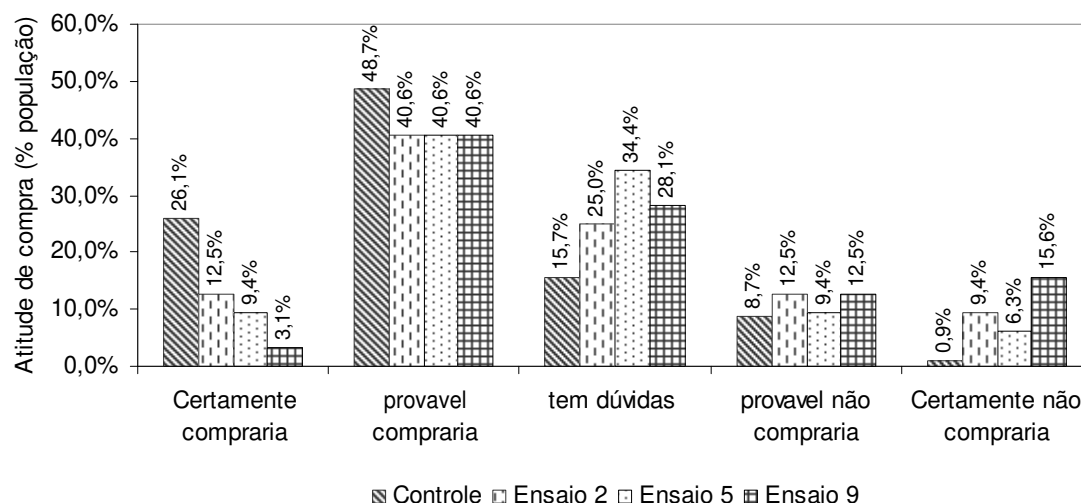


Figura 2. Distribuição das percentagens dos consumidores potenciais do produto quanto à atitude de compra.

5.4. CONCLUSÃO

A sacarose, o extrato de soja e os prebióticos FOS e povidona foram as variáveis que apresentaram melhor efeito significativo na maioria das respostas de estabilidade durante vida-de-prateleira, sendo possível adicionar-los nas quantidades dos pontos centrais ou maiores. Essas variáveis favorecem a manutenção dos probióticos, as características reológicas e a menor sinérese. O ensaio 7 (contendo lactato de cálcio) apesar de apresentar alta sinérese é um produto interessante dadas as altas contagens e características reológicas observadas, porém teve pouca aceitação sensorial pelo público alvo. O agente tamponante lactato de cálcio apresentou o maior efeito significativo sobre a resposta sinérese, os ensaios com menor percentagem de sinérese não o apresentavam, também afetou negativamente a estabilidade quanto a viabilidade dos lactobacilos e propriedades reológicas, com leve melhoria na estabilidade do pH e nas contagens de bifidobactéria durante estocagem, portanto se sugere realizar estudos complementares para a adição do lactato.

Os melhores ensaios para o estudo da estabilidade durante 30 dias de vida de prateleira para o alimento simbiótico de extrato de soja, se caracterizaram por não conter lactato de cálcio e conter as quantidades máximas de sacarose (12%) e extrato de soja (10%) empregadas neste estudo. Um produto contendo só 6% de soja e povidexose 4% também mostrou boas respostas de estabilidade e a melhor avaliação quanto à doçura e sabor. Estes produtos apresentaram menor sinérese e os parâmetros reológicos permaneceram mais estáveis durante a vida-de-prateleira, mas também a maior queda de pH durante os primeiros 10 dias, justamente por não apresentarem o agente tamponante. As contagens dos probióticos mantiveram-se em ótimas concentrações garantindo a funcionalidade do produto. Todos esses ensaios tiveram aceitação sensorial e intenção de compra pelo público alvo, especialmente para os simbióticos que foram elaborados com a maior proporção de *L. rhamnosus*. Outro simbiótico elaborado com menor proporção de *L. rhamnosus*, 12% de EHsoja, 4% de FOS, 4% de povidexose, sem lactato de cálcio e sem sacarose, porém adoçado com associação de edulcorantes hipocalóricos, é um protótipo interessante na versão *light* ou *diet* em sacarose já que apresentou boas características de estabilidade durante vida-de-prateleira de 30 dias em todas as respostas, sensorialmente não apresentou diferenças significativas com a amostra controle e mostrou aceitação e intenção de compra pelo público alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq/PEG-PG pela bolsa de doutorado e iniciação científica e as companhias OLVEBRA, DANISCO, ORAFIT, PURAC, Duas Rodas, Proceedings que forneceram gratuitamente o material para este trabalho.

5.5. 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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes)**. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.
- BATT, C.A. **Lactococcus**. Department of Food Science, Cornell University, USA, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/LACTOCOCCUS.doc> Acessado em abril de 2006.

-
- BELYAKOVA, L. E., ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., Dickinson, E., MERINO, L. M., TSAPKINA, E. N. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 31-46, 2003.
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 87, p. 113-130, 1990.
- CHABOT, S.; YU, H.L.; DE LE´ SE´ LEUC, L.; COUTIER, D.; VAN CALSTEREN, M.R.; LESSARD, M. et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6, and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. **Lait**, v. 81, p. 683-697, 2001.
- CHAMPAGNE, C.P.; BARRETE, J.; ROY, D.; RODRIGUE, N. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. **Food Research International**, v. 39, p. 651-659, 2006.
- DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 251-255, 2000.
- GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELART, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of the EPS produced by *P. acidipropionici* on milk microfiltrate. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p. 149-158, 2003.
- GRATTEPANACHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, v.17, n.2, p. 123-132, 2007.
- GUARNER F., SCHAAF SMA G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p. 237-238, 1998.
- MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; CHAMPAGNE, C.P. Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 167-173, 2002.
- MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, 12, 173-182, 2002

-
- MODLER HW. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4. p. 383-407, 1994.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. Tese de metrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; COSTA, F.; RODRIGUEZ, M.I.; MAUGERI, F. **Metodologia para Contagem Diferenciada de Lactobacilos e Bifidobactérias em Mistura**. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Recife, PE, Brasil, 2005.
- NEVES, E. S. **Efeito da adição de co-solutos na reologia de géis lácteos acidificados** Orientador: Rosiane Lopes da Cunha. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.
- PLACKETT R.L. e BURMAN J.P. The Design of Optimal Multifactorial Experiments. *Biometrika*, v. 33, n. 4, (4), pp. 305-325, 1946
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Ed. Casa do Pão. 326 p., 2005.
- RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILAN, C. G.; SALMINEN S. Short Communication: Effect of exopolysaccharide isolated from viilli on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 2355 2358, 2006.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163 171, 2002.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T.; SAVADOGO, P.W.; BARRO, N.; OUATTARA, A.S.; TRAORÉ, S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from burkina Faso milk samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 3 (3), p. 189-194, 2004.
- SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 765 772, 2002.
- SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.3, 2003.

-
- SMITINONT, T.; TANSAKUL, C.; TANASUPAWAT, S.; KEERATIPIBUL, S.; NAVARINI, L, BOSCO, M.; CESCUTTI, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 105-111, 1999.
- STEFFY, J. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press. Second Edition. USA. 1996.
- 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.
- TELES, C. D., FLÔRES, S. H. Influência da adição de espessantes e leite em pó nas características reológicas do iogurte desnatado. **B.CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 247-256 jul./dez. 2007.
- TUINIER, R.; OOMEN, C.J.; ZOON, P.; COHEN, S.; de KRUIF, C.G. Viscoelastic properties of an exocellular polysaccharide produced by a *Lactococcus lactis*. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 219-223, 2000.
- VUYST, L. de; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, p. 107-117, 1996.

CAPÍTULO 6.

6. TESTES *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

Parte dos resultados deste capítulo foram apresentados como:

Teste terapêutico de digestibilidade para alimentos simbióticos a base de extrato de soja. Autores: Mondragón-Bernal, Olga; Ferreira-Perina, Maria Fernanda; Maugeri, Francisco; Rodrigues, Maria Isabel. Apresentado como resumo e pôster no **7th Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages** Lorena/SP/Brasil, 3 a 7 de Dezembro de 2008

“Navega com as mãos colocadas nos remos e os olhos nas estrelas” (Yamilé Alberb)

6. TESTES IN VITRO DE RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

RESUMO

Para serem efetivos, os microrganismos probióticos devem preencher diversos requisitos. Devem ser capazes de ultrapassar várias barreiras até o local onde deverão atuar e manter-se viáveis e em alto número. Entre estas barreiras estão: a resistência ao suco gástrico, resistência à bÍlis, resistência à lisozima, persistência no trato intestinal humano. Neste estudo foram comparadas duas marcas comerciais de iogurtes probióticos a base de leite (controles) e 5 tratamentos de alimentos simbióticos fermentados à base de soja selecionados entre 16 dos que apresentaram as melhores características de estabilidade durante vida-de-prateleira no Capítulo 4. Foram realizados testes de resistência a sucos digestivos simulados *in vitro*, sendo: saliva, suco gástrico, suco intestinal e suco pancreático. Os alimentos simbióticos fermentados a base de soja foram digeridos e foram retiradas amostras em duplicata em diferentes tempos de exposição e realizada contagem em placa, análise de açúcares pelo método de DNS e polissacarídeos pelo método de Antrona após sua extração alcoólica. Em todas as digestões foi observada uma alta atividade de transformação de polissacarídeos e açúcares. O tratamento sem sacarose contendo povidexrose e FOS, apresentou os melhores resultados de resistência às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal (TI) mostrando-se como produto *diet* em sacarose e fonte de fibras. Os tratamentos contendo sacarose e povidexrose, e, contendo sacarose e FOS, mostraram bons resultados com redução menor que 35% em relação às contagens iniciais. As amostras comerciais apresentaram as menores tolerâncias com perdas nas contagens de 69% e os tratamentos contendo sacarose, povidexrose e menor teor de soja, e, só com sacarose obtiveram menos do que 40% de perdas.

6.1. INTRODUÇÃO

Probióticos, prebióticos (como os oligossacarídeos) e simbióticos modificam a composição da microbiota intestinal, restaurando o balanço microbiano e, conseqüentemente, têm o potencial de trazer benefícios à saúde, sendo assim considerados alimentos funcionais (Roberfroid *et al.*, 1998, Mattila-Sandholm *et al.* 2002). Substâncias prebióticas são ingredientes alimentícios não digeríveis fermentados por grupos selecionados de bactérias benéficas. Probióticos são suplementos alimentícios

que apresentam alto teor de microrganismos vivos que vão atuar em toda a extensão do trato gastrointestinal, afetando de forma benéfica o animal hospedeiro, pela melhora do balanço da microbiota intestinal (Guarner, 1998).

O uso de espécies probióticas junto com substâncias prebióticas fornece um efeito combinado, nomeado "simbiótico" (Crittenden *et al.* 2001). A legislação estabelece que os produtos funcionais contendo bactérias probióticas, como os simbióticos, para apresentarem efeito terapêutico ótimo, devem possuir como mínimo 10^7 UFC/mL de probióticos e até o prazo de validade como mínimo 10^6 UFC/mL (ANVISA, 2002). Os alimentos funcionais contendo prebióticos devem suprir o requerimento diário de 8 g/dia (Yun, 1996; Modler, 1994). Em relação às fibras alimentares, um alimento com alegação de fonte de fibras deverá conter no mínimo 3,0g/100g para alimentos sólidos e 1,5 g/100mL para alimentos líquidos; já para alegação de alto teor de fibras um alimento sólido terá no mínimo 6,0 g/100g e um líquido 3,0 g/100mL (ANVISA, 1999).

Entre os principais efeitos benéficos e terapêuticos atribuídos ao consumo de simbióticos estão a manutenção do balanço da microbiota intestinal, antagonismo ao crescimento de patogênicos, estimulação do sistema imunológico e redução da intolerância à lactose, beneficiando assim a saúde ao aumentar a proteção contra infecções intestinais e prevenindo diversas doenças, entre outros benefícios (Mattila-Sandholm *et al.* 2002).

As alegações sobre benefícios à saúde humana colocadas nos rótulos de alimentos funcionais geram expectativas que podem levar o consumidor a adquirir o produto. A legislação é cada vez mais rigorosa quanto ao uso de alegações, por isso, os produtos funcionais e *wellness drinks* devem ser desenvolvidos com base em pesquisas bem fundamentadas (ANVISA, 1999, Behrens, 2002).

Desta forma, é de grande importância que uma vez comprovada a propriedade funcional de um alimento, a informação desta propriedade seja feita com ética e objetividade, de forma que não somente promova as vendas do produto, mas que, sobretudo, respeite e beneficie o consumidor (Behrens, 2002)

Segundo Morelli (2007) a seleção de novas bactérias probióticas por meio de testes *in vitro* apresenta um desafio para os cientistas, assim como para as companhias produtoras de bebidas funcionais. Atualmente, a maioria de probióticos é analisada usando testes focados na sua habilidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal e a subsequente colonização.

Um grande número de novas espécies de lactobacilos e bifidobactérias tem sido previamente isolado de amostras fecais de neonatos e diferentes grupos etários,

identificados geneticamente, e avaliadas *in vivo* ou *in vitro*, sendo algumas delas *Lactobacilli* spp e *Bifidobacterium* em vista da sua aplicação como probióticos. 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. 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 (Owerhand *et al.*, 1999, Fooks *et al.*, 1999, Stanton *et al.*, 2001).

Para serem considerados alimentos probióticos, os microrganismos devem ser capazes de ultrapassar várias barreiras até o lugar em que deverão atuar. Muitos autores (Tamime *et al.*, 1995, Jan, *et al.* 2002; Leverrier *et al.*, 2005, Mishra & Prasad, 2005, Morelli, 2007) sugerem que uma linhagem probiótica poderia ser analisada e selecionada de acordo com os seguintes critérios:

- (i) ser de origem humana,
- (ii) poder sobreviver durante o trânsito estomacal, resistência ao suco gástrico,
- (iii) ser tolerante às sais biliares, resistência à biliar,
- (iv) resistência à lisozima
- (v) ter aderência ao tecido epitelial do intestino
- (vi) persistência no trato intestinal humano

Mattila-Sandholm *et al.* (2002) destacam que a evolução no desenvolvimento de simbióticos integrados precisa de estudos envolvendo sinergias específicas entre ingredientes probióticos e prebióticos no trato gastrointestinal (TI), e prebióticos que adicionalmente protejam os probióticos durante a manufatura, estocagem, formulação e trânsito gastrointestinal, do controle e liberação de probióticos em locais específicos no TI e, além disso, prebióticos fermentescíveis mais lentamente e com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no cólon distal. Alguns exopolissacarídeos EPS-produzidos *in situ* por bactérias lácticas poderiam cumprir em parte essas funções (Dupont *et al.*, 2000)

6.1.1. Sobrevivência durante o trânsito estomacal

Para atingir o intestino, os probióticos primeiro devem passar pelo estômago, que fornece uma poderosa barreira para a entrada no intestino. Os primeiros estudos de sobrevivência de bactérias lácticas ao ambiente gastrointestinal foram focados na identificação de linhagens capazes de sobreviver, entre muitas outras espécies. Conway *et al.* (1987) usaram suco gástrico obtido de humanos voluntários para demonstrar que espécies de *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus* (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)

são extremamente sensíveis, a maioria das espécies entéricas de lactobacilos são mais resistentes, com significativas variações entre as linhagens.

Publicações recentes têm mostrado que a sensibilidade das culturas do iogurte às condições ácidas pode reduzir a recuperação destas bactérias nas amostras fecais de consumidores, mas houve um número de células que foram capazes de permanecer viáveis (Elli *et al.*, 2006; Mater *et al.*, 2005) e isto tem levado alguns pesquisadores a sugerir que leites fermentados contendo culturas viáveis poderiam ter uma real ação probiótica (Guarner *et al.*, 2005). Linhagens pertencentes a espécies que normalmente habitam o intestino humano mostraram melhor comportamento *in vitro* quando foi analisada a sua resistência a baixos valores de pH, ou suco gástrico simulado (Conway *et al.*, 1987). Entretanto, essas espécies entéricas de lactobacilos, linhagens documentadas com boa habilidade de colonização no intestino humano, receberam avaliações ruins em ensaios *in vitro* por alguns autores (Charteris *et al.*, 1998; Mishra & Prasad, 2005). Esta discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* apontam à necessidade de refinar este tipo de testes. Como por exemplo, foi demonstrada uma limitada tolerância ao ácido por linhagens de *L. paracasei* spp *in vitro*, mas as mesmas espécies mostraram excelentes resultados *in vivo* (Ohlson *et al.*, 2002). Morelli (2007) informa que a avaliação *in vitro* da tolerância dos probióticos a acidez parece ser um modelo inadequado para testar o comportamento *in vivo* dessas linhagens. Somente linhagens que são extremamente sensíveis à acidez *in vitro* parecem ser incapazes de sobreviver ao trânsito intestinal já que uma moderada resistência a pH baixo é necessária. No entanto, deve ser comprovado ainda que altas resistências avaliadas *in vitro* se correlacionem com melhores habilidades de colonização.

6.1.2. Tolerância aos sais biliares

A habilidade de sobreviver à ação dos sais biliares é geralmente incluída dentro dos critérios usados para selecionar potenciais linhagens probióticas. Num estudo pioneiro, Gilliland *et al.* (1984) mostraram que a resistência à bile pode diferir entre linhagens de uma mesma espécie de lactobacilos entéricos e que esta diferença pode esclarecer diferenças na habilidade de colonização do trato intestinal de bezerros. Cabe ressaltar que a preparação de bile usada por Gilliland *et al.* (1984) para os testes *in vitro* foi *oxgall*, um produto derivado de bile bovina. A mesma preparação de bile foi usada por vários autores para avaliar a resistência a bile por bactérias probióticas, lactobacilo ou bifidobactéria. Há muito poucos dados disponíveis acerca do comportamento de linhagens quando provadas com bile humana ou com bile originária de outras fontes. Porém, nenhum dado permite avaliar a possível correlação entre a origem do animal

hospedeiro da bactéria e a resistência à bile dessa bactéria. Morelli (2007) questionou se seria possível, por exemplo, que um *Lactobacillus* isolado de porco possa ser mais resistente à bile suína que outra linhagem pertencente à mesma espécie, porém isolada de bezerros. Assim, recentemente testou, não somente com oxgall, mas também com bile suína disponível comercialmente, 10 linhagens de *L. johnsonii* isolado de humanos (três linhagens), bezerros (cinco isolados), assim como de porcos e aves (um isolado de cada um). Cinco linhagens de *L. acidophilus* (duas isoladas de humanos e 3 de porcos) foram também incluídas nesse estudo. As linhagens foram plaqueadas em Agar MRS contendo preparado de bile e as contagens foram comparadas com placas contendo agar MRS na mesma diluição, porém sem conter bile. Os resultados mostraram que a bile suína teve maior poder inibitório que a bile bovina; assim o papel da espécie ficou mais longe de ser relevante do que a origem ecológica, pois foi observado um comportamento específico para cada linhagem.

Diversos estudos da tolerância de probióticos às condições gastrointestinais realizam os testes separadamente, expondo as linhagens em estudo ao pH ácido do estômago ou a sais biliares, mudando às vezes o pH numa faixa pré-estabelecida ou a concentração de bile. Neste estudo tentou-se simular as condições gastrointestinais *in vitro*, o mais semelhante possível às condições humanas, tendo em conta os seguintes aspectos: a seqüência na exposição dos fluidos digestivos, os tempos de exposição, como também a composição química, enzimática e o pH de cada um dos sucos digestivos aos que os probióticos teriam contato quando consumidos pelo organismo humano. Sendo assim foram elaborados sucos simulados *in vitro* de saliva, suco gástrico, suco pancreático e suco intestinal.

Este estudo teve por objetivos verificar a resistência dos probióticos presentes em bebidas simbióticas fermentadas a base de soja, às condições simuladas do trato gastrointestinal (TI) *in vitro* com os ensaios do planejamento realizado no Capítulo 4 deste estudo e que apresentaram as melhores características de estabilidade durante vida-de-prateleira e com duas marcas comerciais de alimentos probióticos e simbiótico.

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Matéria-prima

Extrato hidrossolúvel de soja (PROVESOL FB Olvebra Industrial S/A-Brasil) 6-10% p/v, adicionado de antiespumante sílica (5 ppm-Proceedings) e agentes prebióticos: frutooligossacarídeos (FOS-Raftilose 95® da Orafti) e polidextrose (Litesse® da Danisco) foi esterilizado a 116°C, por 5 minutos, resfriado, adicionado vagarosamente de solução

10% (m/v) de lactato de cálcio (segundo a Tabela 1), inoculado com cultura(s) probiótica(s) e láctica(s) com 10^5 a 10^7 UFC/mL, e incubado a 37°C.

Os tratamentos selecionados para testes de digestibilidade foram os que apresentaram as melhores características de estabilidade durante a vida-de-prateleira no estudo do Capítulo 4. A matriz e os níveis do delineamento experimental Plackett & Burman estão representados na Tabela 1 e os ensaios selecionados aparecem marcados com asterisco (*), sendo 2, 5, 7, 9, 11 e 15.

Tabela 1. Matriz do delineamento experimental Plackett & Burman

Ensaio	Variáveis Independentes					
	Inóculo Proporção (L1L2:LR/B)	Sacarose (g/100mL)	Lactato de Ca ²⁺ (g/L)	EHsoja (g/100mL)	FOS (g/100mL)	Polidextrose (g/100mL)
1	1 (10:30/60)	-1 (0)	1 (10)	-1 (6)	-1 (0)	-1 (0)
2*	1 (10:30/60)	1 (12)	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)
3	-1 (30:10/60)	1 (12)	1 (10)	-1 (6)	1 (4)	-1 (0)
4	1 (10:30/60)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (4)
5*	1 (10:30/60)	1 (12)	-1 (0)	1 (10)	1 (4)	-1 (0)
6	1 (10:30/60)	1 (12)	1 (10)	-1 (6)	1 (4)	1 (4)
7*	-1 (30:10/60)	1 (12)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (4)
8	-1 (30:10/60)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (4)	-1 (0)
9*	-1 (30:10/60)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10)	1 (4)	1 (4)
10	1 (10:30/60)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (6)	1 (4)	1 (4)
11*	-1 (30:10/60)	1 (12)	-1 (0)	-1 (6)	-1 (0)	1 (4)
12	-1 (30:10/60)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (6)	-1 (0)	-1 (0)
13	0 (20:20:60)	0 (6)	0 (5)	0 (8)	0 (2)	0 (2)
14	0 (20:20:60)	0 (6)	0 (5)	0 (8)	0 (2)	0 (2)
15*	0 (20:20:60)	0 (6)	0 (5)	0 (8)	0 (2)	0 (2)
16	0 (20:20:60)	0 (6)	0 (5)	0 (8)	0 (2)	0 (2)

* Ensaio com os melhores resultados de estabilidade durante a vida-de-prateleira selecionados para testes de digestibilidade *in vitro*.

Amostra comercial I - CI: Actifibras da Nestlé, a base de leite contendo *Bifidobacterium animalis*. Ingredientes: Leite reconstituído integral, preparado de ameixa (água, xarope de açúcar, polpa de ameixa, fibra solúvel (dextrina resistente em pó), fosfato tricálcico, amido modificado, açúcar, vitamina E, aromatizante, acidulante ácido cítrico, corante caramelo), conservador sorbato de potássio, espessante goma xantana, xarope de açúcar e fermento lácteo. Não contém glúten. Tempo de estocagem: 9 dias

Amostra comercial II - CII: Biofibras da Batavo, a base de leite contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Ingredientes: Leite desnatado e/ou leite reconstituído desnatado, preparado de ameixa (açúcar, água, fibras solúveis (inulina), polpa de ameixa, amido modificado, fibras insolúveis (fibras de trigo), aroma idêntico ao natural de ameixa fresca e conservante sorbato de potássio), leite em pó desnatado, fermentos lácteos e espessante gelatina. Contém glúten. Tempo de estocagem: 27 dias

6.3.2. Culturas Probióticas e Lácticas

Foram estudadas as linhagens *L. rhamnosus* LR32, produtora de EPS, e os probióticos padrão: *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *Bifidobacterium longum* BL04, gentilmente fornecidos pela Danisco.

6.3.3. Preparo dos fermentados de extrato hidrossolúvel de soja com as culturas probióticas.

A partir de formulação pré-estabelecida pelo delineamento experimental Plackett & Burman Tabela 1, suspensões de extrato hidrossolúvel de soja estéril, adicionadas de FOS e/ou polidextrose, com e sem sacarose, foram inoculadas com misturas de culturas lácticas e fermentadas, sem agitação, a 37°C até atingir pH 4,8-4,3 (aproximadamente 16 h). Ao término da fermentação foram armazenadas em geladeira e retiradas após 20 dias, em duplicata.

6.3.4. Testes de digestibilidade: resistência a sucos digestivos simulados in vitro

Foram elaborados sucos digestivos artificiais conforme as metodologias adaptadas de Hernaalsteens (2006) e Crittenden et al. (2001). para avaliar a resistência das amostras escolhidas (ensaios 2, 5, 7, 9, 11, 15, do capítulo 4 desta tese, Comercial I e Comercial II) à digestão. Todos os sucos simulados foram preparados com solução tampão, adicionados das enzimas e sais mais característicos de cada solução digestiva na tentativa de se aproximar o máximo possível das condições reais. Todos os sucos digestivos foram esterilizados a frio através de filtro de 0,2 µm.

a) Saliva: foi preparada com 0,33 g/100mL de α -amilase fúngica (de *A. niger*) e 0,25 g/100mL de lisozima (ovo branco-Boehringer Mannheim-Merck), a pH 6,0.

b) Suco gástrico: foi preparado com 0,32 g/100mL de pepsina (estômago bovino-Medicamenta), 0,20 g/mL de lipase gástrica (Ao Pharmaceutico) e 0,02 g/mL de quimosina (Rennin chymosin da Sigma), a pH 1,2.

c) Suco intestinal: foi preparado com 0,33 g/100mL de sais biliares (Medicamenta), 0,25 g/100mL de lactase (Ao Pharmaceutico), 0,25 g/100mL de invertase (Baker s yeast) e 0,25 g/100mL de lisozima (Boehringer Mannheim), a pH 8,0.

d) Suco pancreático: foi preparado com 0,83 g/100mL de pancreatina (Medicamenta), 0,10 g/100mL de tripsina e 0,02 g/100mL de lipase (Medicamenta), a pH 8,0.

6.3.4. Digestão in vitro

Os tratamentos foram feitos em cinco etapas. Primeiramente colocou-se 9 mL de saliva simulada em 1mL de amostra e incubou-se a 37°C durante 5 minutos, quando foram acrescentados 10mL de suco gástrico. Este foi deixado a 37°C por dois tempos diferentes: uma e três horas, simulando o tempo em que o alimento é digerido no estômago. Na terceira hora de digestão, acrescentou-se 5 mL de suco intestinal e 5mL de suco pancreático, que permaneceram a 37°C também por dois tempos diferentes, totalizando quatro e oito horas de digestão. As amostras foram coletadas em duplicata nos seguintes tempos: cinco minutos, uma, três, quatro e oito horas. Foi realizada contagem em placa, determinação de açúcares e polissacarídeos. Para contagem em placa as amostras digeridas foram diluídas em água peptonada pH 6.0 e plaqueadas em meio MRS com azul de anilina pH 6.0. Açúcares redutores e totais foram determinados pelo método espectrofotométrico 3,5-DNS (Miller, 1959) e a análise de digestão de polissacarídeos foi feita pelo método da Antrona (Silva, 2003) após sua extração alcoólica.

6.3.5. Metodologia Analítica

6.3.5.1. Contagem de colônias

Foi feito plaqueamento em profundidade em meio ágar MRS com 0,01% azul de anilina, incubação por 72h a 37°C, em aerobiose e anaerobiose (Mondragón-Bernal et al., 2005).

6.3.5.2. Separação de células

Para cada mL de amostra, foi adicionado 0,01 mL de ácido cítrico 1M, centrifugada a 9640 g durante 10 min/5 °C para remoção de células e proteínas. O sobrenadante foi dividido para análise de açúcares e EPS

6.3.5.3. Determinação de Açúcares Redutores (AR), Açúcares Redutores Totais (ART), Açúcares Não Redutores (ANR)

Após a diluição adequada do sobrenadante, foi feita a determinação de AR, ART pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 a 540 nm. Os ANR foram calculados pela diferença entre os resultados de ART e AR.

6.3.5.4. Determinação de Exopolissacarídeos (EPS)

Extração do EPS Bruto. As enzimas presentes foram inativadas em banho a 100 °C, por 10 min. Os EPS foram precipitados durante 12 h a 4°C, adicionando-se 5 volumes de etanol resfriado. Centrifugou-se a 907 g, por 20 min, foi re-dissolvendo o precipitado com mais 2 volumes de álcool resfriado e deixando-se por uma noite a 4°C. Centrifugou-se a 907 g por 20 min, retirando-se o sobrenadante. Em seguida, evaporou-se o álcool residual durante 3 h a 60 °C e o EPS bruto foi re-dissolvido em água para posteriores análises (Metodologia adaptada de Savadogo et al., 2004; Goh et al., 2005, Ruas-Madiedo et al., 2006; Grattepanche et al., 2007).

Quantificação de EPS pelo método da Antrona. A reação foi feita em tubo de ensaio contendo 1 mL de amostra previamente diluída (0,01-0,1 g/L) e 4 mL do reativo Antrona (0,2 g/100 mL de H₂SO₄). Incubou-se os tubos em banho-maria em ebulição durante 10 min e resfriou-se em banho com gelo. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 a 600nm (Silva, 2003). A curva padrão foi feita utilizando-se dextrana de peso molecular 9300 Da.

Foram preparados brancos de EPS de todos os componentes presentes no meio e a somatória dos não-EPS, foi subtraída no resultado final (Goh et al 2005).

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de sobrevivência realizados com os ensaios que obtiveram os melhores resultados do delineamento experimental do capítulo 4, mais um ponto central e duas amostras comerciais, foram analisados a resistência dos microrganismos à digestão, o metabolismo dos açúcares (reduzidos e totais) e dos exopolissacarídeos.

A Tabela 2 apresenta os resultados de açúcares reduzidos, AR (g/L), açúcares reduzidos totais, ART (g/L) e exopolissacarídeos EPS (g/L) das amostras submetidas a testes de resistência nas condições simuladas do trato gastrointestinal humano *in vitro*.

Tabela 2. Teor de açúcares redutores-AR (g/L), açúcares redutores totais-ART (g/L) e exopolissacarídeos-EPS (g/L) após digestão *in vitro* de amostras simbióticas selecionadas em sucos simulados do trato gastrointestinal.

Tratamento digestivo simulado	Tempo (min)	Ensaio 2	Ensaio 5	Ensaio 7	Ensaio 9	Ensaio 11	Ensaio 15	Comercial I	Comercial II
AR (g/ L)									
Sem Digerir (tempo 0)	0	29,1	28,7	107,5	16,7	17,0	60,7	66,5	35,2
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	38,9	57,2	56,0	26,4	29,8	60,6	100,0	61,5
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	107,0	82,8	93,5	46,8	53,9	89,9	119,5	88,6
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	96,6	86,4	83,7	52,7	34,9	87,5	150,5	93,5
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (4h)	240	141,8	135,7	101,2	59,3	104,0	91,3	205,3	250,0
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (8h)	480	122,6	155,3	99,5	57,0	96,2	83,9	238,8	238,2
ART (g/ L)									
Sem Digerir (tempo 0)	0	139,8	104,1	158,0	35,2	50,7	109,1	187,8	212,6
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	150,1	188,8	131,8	100,9	200,3	106,1	233,2	253,4
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	163,6	203,5	167,2	131,3	240,0	118,2	179,5	224,8
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	135,8	210,4	154,0	129,0	204,4	111,5	204,0	229,0
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (4h)	240	174,3	201,8	175,3	121,2	218,7	140,9	161,9	276,4
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (8h)	480	140,4	211,7	167,0	120,7	221,0	129,4	210,0	242,6
EPS g/ L									
Sem Digerir (tempo 0)	0	1,2	4,0	10,8	1,4	0,8	3,2	13,6	8,5
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	0,8	1,4	21,8	5,7	9,8	0,2	5,4	1,3
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	12,0	0,0	0,0	11,5	0,0	27,9	0,4	0,0
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	7,4	0,0	0,0	9,8	0,0	10,2	0,6	0,0
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (4h)	240	0,0	0,0	26,6	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Suco intestinal + pancreático pH 8.0 (8h)	480	0,0	0,0	22,9	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0

* Todos os resultados são as médias das análises realizadas em duplicata.

Na Figura 1a, observa-se que na primeira hora de digestão houve um aumento de açúcares redutores para todos os tratamentos pela ação do pH e das enzimas presentes nas soluções digestivas simuladas. A partir da primeira hora de digestão (saliva + suco gástrico), ocorreu uma pequena queda e, entre a terceira e quarta hora de digestão, ocorre novamente um aumento dos açúcares redutores. A partir da quarta hora, mantiveram-se praticamente constantes. As amostras comerciais foram as que apresentaram maior concentração de açúcares ao final da digestão, indicando maior hidrólise, principalmente em condições do intestino.

Os ensaios 2, 5, 7, 9, 11 e 15, apresentaram menor concentração de açúcares redutores (AR) ao final, o que evidencia maior presença de fibras, pois ao não serem digeríveis elas se mantêm intactas, ficando disponíveis como alimento para as bactérias da microbiota intestinal. A amostra Comercial I apresentou maior concentração de açúcares redutores desde o início, o que indica menor concentração de fibras. A Figura 1b compara os ensaios nos períodos analisados. No tempo 0, onde não houve digestão, observou-se que o ensaio 1 apresentou a maior concentração de açúcares redutores. No final das oito horas de digestão, verificou-se que as amostras comerciais apresentaram muito mais açúcares redutores do que os ensaios simbióticos de soja.

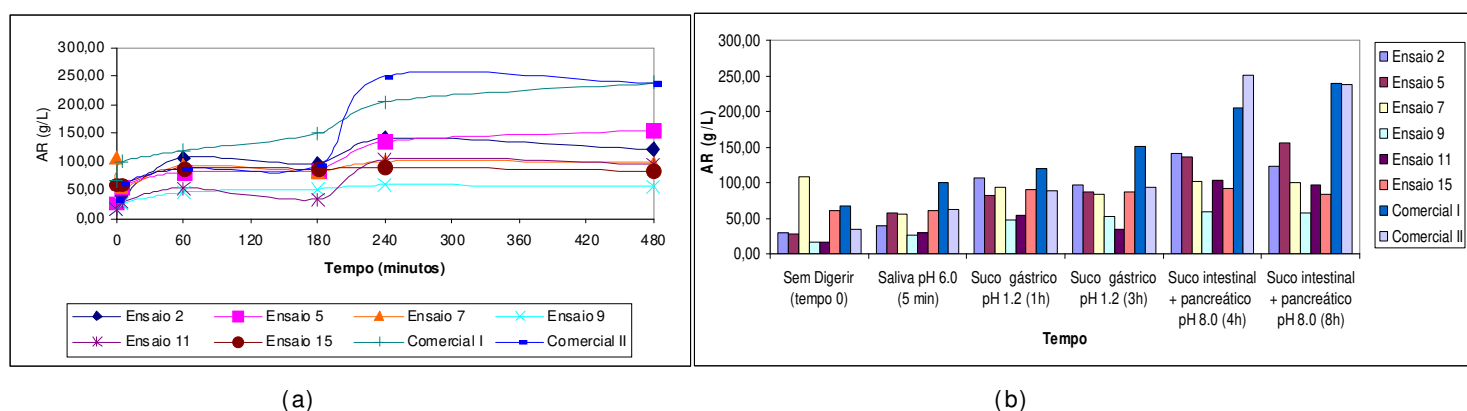
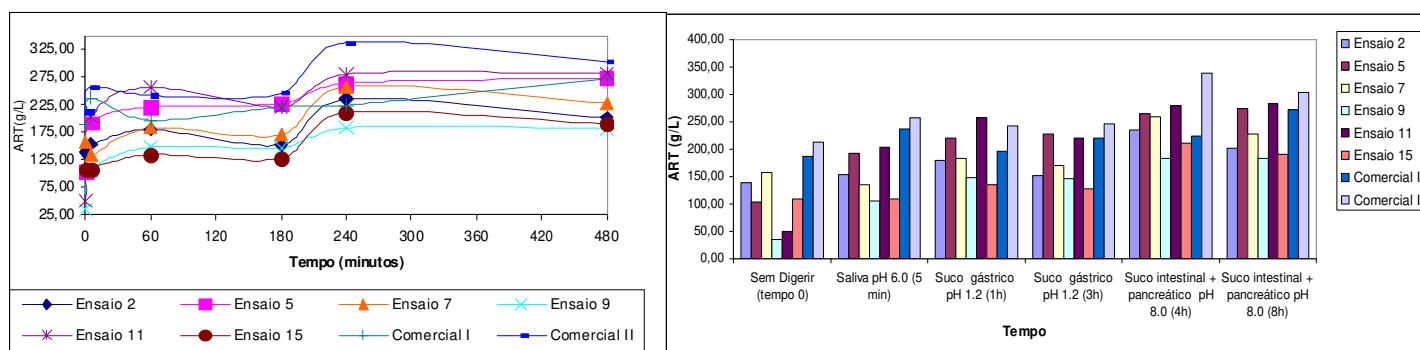


Figura 1. Teor de açúcares redutores AR (g/L) durante digestão simulada em ensaios e amostras comerciais (a) em relação ao tempo (b) em relação aos tratamentos digestivos.

A Figura 2, ilustra que o comportamento dos açúcares redutores totais (ART) foi semelhante ao dos AR. É conhecido que em qualquer tipo de fermentação o normal é não ocorrer aumento de ART, somente diminuição devido ao consumo dos microrganismos, porém durante a digestão simulada com os sucos gastrointestinais das bebidas simbióticas de soja foi observado aumento de ART principalmente durante a digestão gástrica e intestinal nas primeiras horas. Nas condições deste estudo, o consumo de ART por parte dos microrganismos foi insignificante, pois estes foram submetidos valores

extremos de pH, ou seja, condições drásticas (não ótimas) de atividade e com baixa taxa metabólica. Pelo fato das amostras analisadas serem matrizes muito complexas de nutrientes (proteínas e oligossacarídeos da soja, açúcares e agentes prebióticos adicionados, EPS produzido durante a fermentação pelas bactérias lácticas, entre outros), os ART não foram detectados na sua totalidade nas primeiras horas de digestão pelo método de DNS. O método de DNS para determinar ART não é adequado para moléculas mais complexas, porém os resultados obtidos foram interessantes para este estudo, pois permitiram observar e comparar as diferenças existentes na digestibilidade das diversas amostras analisadas. Sendo assim, alguns compostos presentes no meio podem não ter sido hidrolisados e quantificados completamente nos primeiros minutos e horas de digestão. Ao longo da digestão pela ação dos complexos enzimáticos de cada suco digestivo adicionado nos diferentes tempos, novas moléculas redutoras foram produzidas e quantificadas pelo método colorimétrico utilizado. Os erros decorrentes de interferências no método devido à presença dos sucos e seus componentes foram calculados e subtraídos no resultado final.



(a)

(b)

Figura 2. Teor de açúcares totais (g/L) nos ensaios e amostras comerciais durante digestão simulada (a) em relação ao tempo e (b) em relação aos tratamentos digestivos.

A Figura 2 ilustra que houve aumento de ART na primeira hora de digestão e entre a terceira e quarta hora. A partir dos 60 minutos e até os 180 minutos (em saliva + suco gástrico), a concentração de ART permaneceu constante em quase todas as amostras analisadas. No final da digestão (8 h) os ART foram maiores em todos os casos, sendo a amostra Comercial II a que apresentou o maior valor, indicando maior facilidade de digestão principalmente no intestino, pela presença de açúcares mais simples. Isto também indica menor concentração de fibras disponíveis para as bactérias probióticas, situação que disponibiliza maior quantidade de açúcares para toda a flora intestinal,

incluindo a não desejada, sendo um aspecto desfavorável. No tempo 0 notou-se que os ensaios 9 e 11 apresentaram a menor concentração de açúcares totais, enquanto que as amostras comerciais os maiores teores. Nos tempos seguintes as concentrações oscilam pouco, e, ao final da digestão, apresentaram altas concentrações, sendo os ensaios 2, 9 e 15 os que mostraram os melhores resultados, ou seja, menor concentração de açúcares totais, portanto maior concentração de fibras.

Quanto ao teor de EPS, verificou-se que os resultados de digestão foram bem diferentes entre as amostras, conforme mostrado na Figura 3. Verificou-se que os ensaios 5 e 11 e as amostras Comercial I e II quase não apresentaram EPS durante a digestão. O teor de EPS do ensaio 7 apresentou queda durante a digestão com suco gástrico, entre a primeira e quarta horas, mas com a adição de suco pancreático e intestinal, o valor de EPS voltou a aumentar. Já o ensaio 9 mostrou maior resistência quando exposto os sucos digestivos, pois apresentou concentração praticamente constante de EPS durante toda a digestão. Somente os ensaios 7 e 9 apresentaram EPS no final da digestão, sendo a concentração de EPS do ensaio 7 maior (23 g/L). Portanto o EPS residual ao longo da digestão poderia ser caracterizado também como fibra dietética.

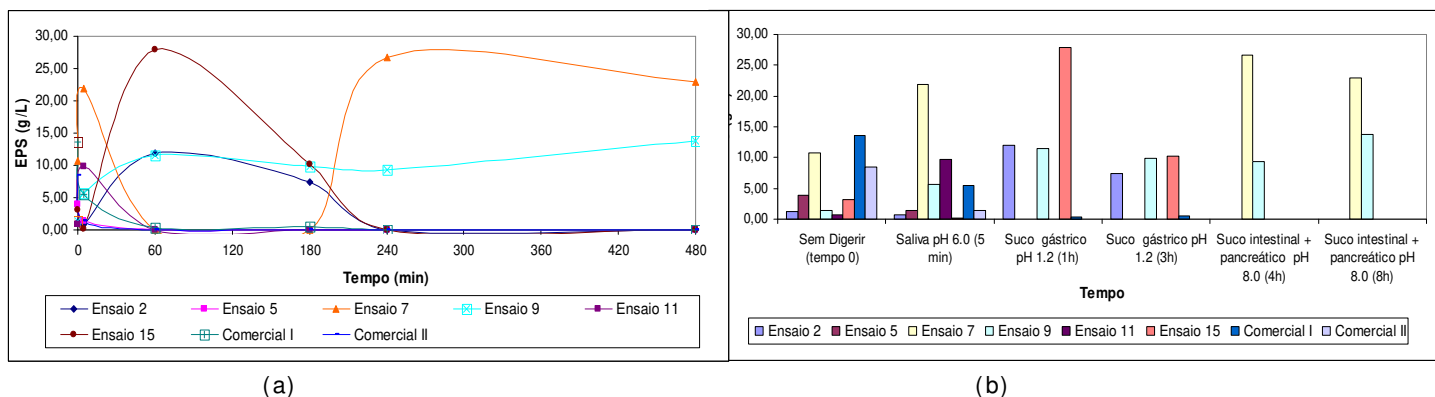


Figura 3. Quantificação de EPS nos ensaios e amostras comerciais durante a digestão simulada: (a) em relação ao tempo e (b) em relação aos tratamentos digestivos.

Hernalsteens (2006) encontrou em estudos de digestibilidade *in vitro*, que oligossacarídeos (FOS), sintetizados por *Rhodotorula* sp selecionada, foram capazes de estimular o crescimento de bactérias probióticas como *L. acidophilus* sp, *L. paracasei* subsp *alactosus* sp, *B. bifidum* sp e *B. longum* sp., e foram capazes de resistir bem às condições gástricas artificiais. A digestibilidade dos FOS sintetizados foi de 10%, FOS comerciais 32%, inulina 44% e dextrana 51%. Do anterior estudo observa-se que os FOS apresentaram maior resistência à digestão do que outros polissacarídeos, mostrando uma característica de fibra solúvel alimentar. Sendo que no atual estudo os FOS presentes

somados à polidextrose e o EPS formado constituíram um complexo de fibras solúveis resistentes ao ambiente drástico do trato digestório humano, mostrando também um tipo de barreira protetora dos probióticos nesse trajeto, especialmente da bifidobactéria.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das contagens de lactobacilos, bifidobactéria e total (log UFC/mL) dos probióticos presentes nos 6 ensaios selecionados de simbióticos a base de soja com melhores características de estabilidade durante vida-de-prateleira e duas amostras comerciais, após testes de resistência durante 8 horas de digestão nos sucos simulados do trato digestório humano. Observa-se que as perdas de viabilidade até o final da digestão variaram entre 16 e 62% para o total dos microrganismos. A somatória dos lactobacilos *L. acidophilus* LAC4, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *L. rhamnosus* LR32 sofreram perdas nas contagens de 33 a 61%. Enquanto *B. longum* BL04 teve perdas entre 7 e 67%, sendo que os ensaios 9 e 5 tiveram somente perdas de 7 e 18%. As contagens da bifidobactéria oscilou entre 5 e 9 log UFC/mL nos ensaios e entre 3 e 5 log UFC/mL nas amostras comerciais no final da digestão. Observa-se que na maioria dos ensaios os probióticos foram mais sensíveis às condições gástricas durante a primeira hora de digestão e nos tratamentos em seqüência mantiveram-se mais ou menos estáveis, enquanto que as amostras comerciais foram mais sensíveis nas 4 e 8 horas de digestão aos sais biliares e enzimas presentes nos sucos intestinal e pancreático.

A Figura 4 ilustra que os ensaios 9 (sem sacarose contendo polidextrose e FOS), 7 (contendo lactato de cálcio, sacarose e polidextrose), 5 (contendo sacarose e FOS) e 15 (ponto central, contendo sacarose, lactato de cálcio, FOS e polidextrose), apresentaram os melhores resultados de resistência aos diferentes valores de pH e enzimas, sendo os mais tolerantes ao trânsito intestinal com redução menor que 35% em relação às contagens totais iniciais. As duas amostras comerciais (I e II) apresentaram a menor resistência às condições simuladas do TI, apresentando até 67 % de perdas nas contagens. Os tratamentos 11 (contendo sacarose, polidextrose e menor teor de soja) e 2 (só com sacarose) também apresentaram baixas tolerâncias às condições descritas com perdas nas contagens de até 40%.

Tabela 3. Resultados das contagens total, de lactobacilos e de bifidobactérias (log UFC/mL) durante 8 horas de digestão *in vitro* de simbióticos.

Digestão	Tempo (min)	Ensaio 2		Ensaio 5		Ensaio 7		Ensaio 9		Ensaio 11		Ensaio 15		Comercia I		Comercia II	
		Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda	Contagem	% perda
Contagem Total (log UFC/mL)*																	
Sem Digerir (tempo 0)	0	10,4		10,5		11,2		10,5		10,5		10,6		10,0		10,1	
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	10,0	4,1	9,6	8,6	9,9	11,5	9,5	9,4	7,8	26,4	9,7	8,4	10,0	0,2	10,1	0,1
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	6,3	39,7	8,0	24,1	8,4	24,4	6,3	39,8	6,0	43,0	6,2	41,1	9,5	5,5	9,7	3,2
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	6,2	40,0	7,3	30,2	7,4	33,8	10,4	1,2	7,3	30,7	6,7	37,1	7,6	24,2	8,3	17,5
Suco int + pancr pH 8.0 (4h)	240	5,8	44,3	6,9	34,6	8,3	25,2	8,7	17,6	5,0	52,5	6,0	43,3	6,2	38,5	4,5	55,3
Suco int + pancr pH 8.0 (8h)	480	6,2	40,3	6,9	33,8	7,6	32,3	8,8	16,4	5,0	52,2	7,2	31,7	3,8	62,1	4,7	53,8
Contagem Lactobacilos (log UFC/mL)*																	
Sem Digerir (tempo 0)	0	10,4		10,5		11,2		10,5		10,5		10,6		9,8		9,8	
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	9,8	5,4	8,3	21,0	10,0	10,3	9,4	10,3	7,8	26,4	9,6	9,0	9,0	8,5	9,0	8,5
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	6,9	33,3	7,3	30,4	8,6	23,3	5,5	47,4	4,8	54,7	6,2	41,1	8,1	16,8	8,1	16,8
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	6,5	37,4	7,3	30,8	6,8	39,2	7,5	28,4	7,1	32,4	6,7	37,1	6,5	33,7	6,5	33,7
Suco int + pancr pH 8.0 (4h)	240	6,5	37,6	6,6	37,1	8,4	24,3	8,4	20,1	4,5	56,9	6,0	43,5	4,7	52,5	4,7	52,5
Suco int + pancr pH 8.0 (8h)	480	6,2	40,5	6,8	35,0	7,4	33,6	7,0	33,5	4,4	58,2	7,0	33,8	3,8	61,1	3,8	61,1
Contagem Bifidobactéria (log UFC/mL)*																	
Sem Digerir (tempo 0)	0	9,4		7,7		10,8		9,4		9,7		10,2		9,0		9,7	
Saliva pH 6.0 (5 min)	5	9,4	0,0	9,6	0,0	9,0	16,8	8,9	5,4	7,0	28,2	8,8	13,3	9,5	-5,3	10,0	0,0
Suco gástrico pH 1.2 (1h)	60	6,0	35,9	7,9	-2,1	8,9	17,9	5,8	38,0	6,0	38,7	6,0	41,0	8,8	2,1	9,8	0,0
Suco gástrico pH 1.2 (3h)	180	6,0	35,9	6,4	16,9	6,7	38,5	10,4	0,0	6,8	30,0	6,0	41,0	7,0	22,4	8,3	14,6
Suco int + pancr pH 8.0 (4h)	240	6,0	35,9	6,5	15,3	8,0	26,0	8,3	11,8	4,8	50,5	4,3	57,4	6,0	33,5	4,0	58,9
Suco int + pancr pH 8.0 (8h)	480	6,0	35,9	6,3	17,6	7,1	34,7	8,8	6,8	4,9	49,5	6,8	32,7	3,0	66,7	4,6	52,5

* Os resultados são as médias de análises em duplicata. A % de perda foi calculada em relação à contagem no tempo zero.

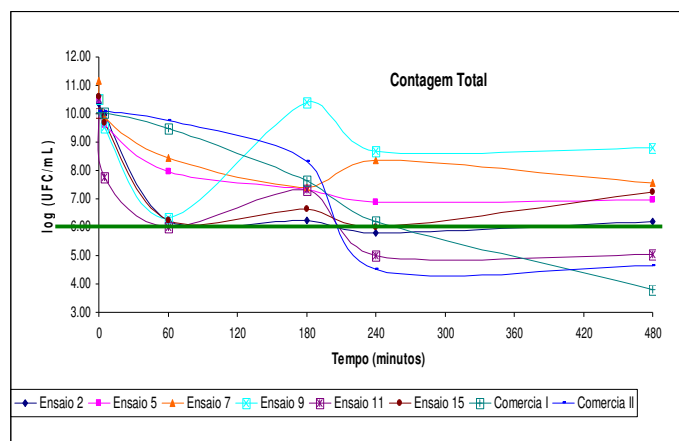


Figura 4a. Contagem total log (UFC/mL) durante digestão simulada.

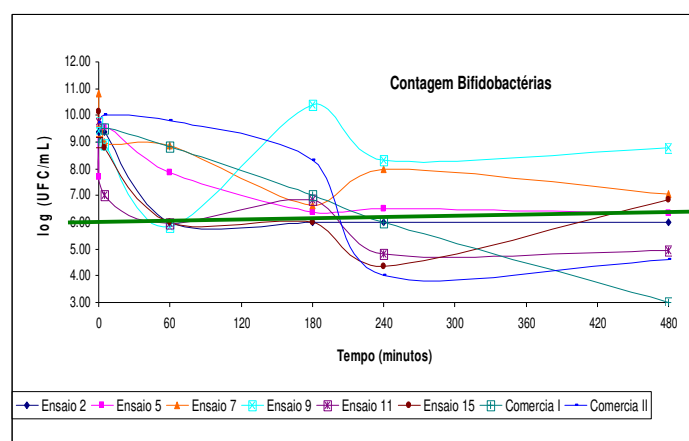


Figura 4b. Contagem de Bifidobactérias log (UFC/mL) durante digestão simulada.

Os comportamentos individuais dos ensaios com as melhores contagens de microrganismos (total, lactobacilos e bifidobactéria), encontram-se na Figuras 5. Observa-se que os ensaios 5, 7, 9 e 15 mantiveram contagens totais e de bifidobactéria superiores a 6 log UFC/mL até o final da digestão, sendo que a maior viabilidade dos probióticos foi para o ensaio 9, mantendo-se até 8,8 log UFC/mL.

No estudo de Crittiden e colaboradores (2001), 18 linhagens isoladas e 3 comerciais de bifidobactérias capazes de hidrolisar amido resistente para aplicação em iogurte simbiótico foram comparadas quanto à sua habilidade para sobreviver num modelo simulado in vitro do ambiente rico em proteases e acidificado do estômago humano. Somente o isolado *B. lactis* B94 demonstrou ser capaz de sobreviver bem nas condições simuladas do estômago humano, as linhagens comerciais *B. lactis* DS 920 e *B. lactis* Bb-12 e o isolado *B. animalis* NCFB 2716 também foram tolerantes, mas *B. longum* CSCC 5554 não sobreviveu bem nessas condições. A sobrevivência dos isolados *B. lactis* B94, *B. lactis* Bb-12, *B. lactis* DS 920 e outras linhagens de bifidobactérias não foi drasticamente afetada pela bile após exposição ao tratamento com ácido e protease. Os resultados indicaram que a bile não teve efeito bactericida porem bacteriostático sobre as linhagens.

Tem sido provado que sais de Mg^{2+} e Mn^{2+} são fatores essenciais para o crescimento de lactobacilos e que melhoram a produção de EPS por meio da promoção do crescimento. O Mg^{2+} , por exemplo, influencia a atividade da enzima fosfoglucomutase, que participa na biossíntese de EPS, catalisando a transferência de grupos fosfato entre carbono C1 e C6 da glicose (Macedo, 2002). Assim, como o meio utilizado nesse estudo (extrato hidrossolúvel de soja 10%) é complexo, rico em

aminoácidos, vitaminas e sais minerais (~ 216 mg/L de Mg^{2+} e ~ 2,68 mg/L de Mn^{2+} , NEPA, 2006), pode-se explicar a obtenção de resultados elevados de EPS. Por outro lado, o leite bovino integral contém 100 mg/L de Mg^{2+} e traços de Mn^{2+} (NEPA, 2006). Demonstrando em parte que, neste estudo, os melhores resultados de tolerância às condições gastrointestinais dos probióticos preparados em extrato de soja em relação ao leite bovino, são devidos a existência de EPS. A interação do EPS com os prebióticos presentes e as proteínas da soja, mostra um efeito protetor das bactérias probióticas e também se apresenta com características de fibra solúvel alimentar devido a sua baixa digestibilidade.

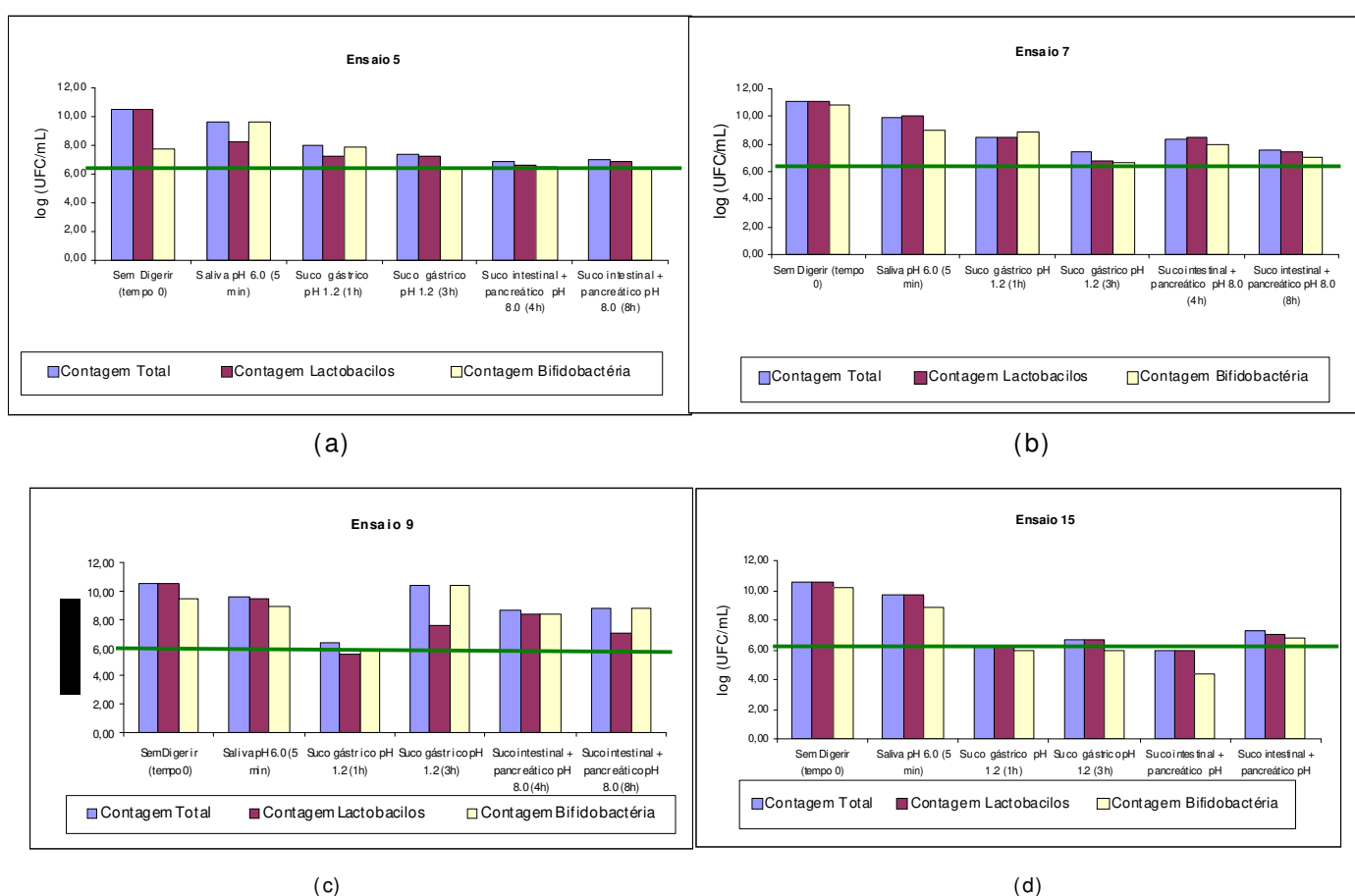


Figura 5. Resultados das contagens total, lactobacilos e bifidobactéria dos ensaios 5 (a), 7 (b), 9(c) e 15(d) durante digestão simulada. A linha verde indica a população mínima para ter efeito probiótico > 6 log UFC/mL.

6.5. CONCLUSÃO

Dentre os ensaios selecionados para os testes de sobrevivência às condições gastrointestinais *in vitro*, os microrganismos do alimento simbiótico fermentado de soja elaborado sem sacarose, 10% EHsoja, 4% polidextrose e 4% FOS, e, do tratamento contendo 12% de sacarose, 10 g/L de lactato de cálcio, 10% de EHsoja e 4% de polidextrose apresentaram os melhores resultados de resistência. Enquanto que os microrganismos do simbiótico contendo 12% sacarose, 10% de EHsoja e 4% de FOS mostrou tolerância média. Esses fermentados de soja foram mais tolerantes ao trânsito intestinal com redução menor que 35% em relação às contagens iniciais. As duas amostras comerciais de iogurtes probióticos (a base de leite) apresentaram perdas nas contagens de até 69%, e, os simbióticos de soja contendo sacarose, polidextrose e menor teor de soja, e, aquele elaborado só com sacarose apresentaram até 40% de perdas, sendo as menores tolerâncias às condições simuladas do trato gastrointestinal.

O ensaio que apresentou os melhores resultados foi o que possui alto teor de soja, FOS e polidextrose e não apresenta sacarose e nem agente tamponante lactato de cálcio na sua formulação. O produto apresentou ao final da digestão altas contagens totais e de bifidobactérias e baixos valores de açúcares totais e redutores e um valor constante de EPS, indicando um alto residual de fibras solúveis. Sendo assim, esse ensaio seria um ótimo protótipo de alimento simbiótico a base de soja produto *light* e *diet* em sacarose e fonte de fibras, pela resistência observada dos EPS até o final da digestão. No entanto, outros ensaios adicionados de sacarose também são uma boa alternativa, quando as contagens finais após digestão mantêm-se superiores a 10^6 UFC/mL, sendo que um produto contendo 100 mL estaria fornecendo quantidades terapêuticas ótimas de probióticos para a implantação no trato gastrointestinal. Pode se concluir que a sinergia existente entre os probióticos e prebióticos (simbiótico) no extrato de soja, juntamente com o EPS formado, possibilitam maior tolerância às condições gastrointestinais do que os probióticos comerciais elaborados com leite bovino.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq/PEC-PG pela bolsa de doutorado e iniciação científica e às companhias OLVEBRA, DANISCO, ORAFTI, PURAC e Proceedings que forneceram gratuitamente os materiais para este trabalho.

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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Resolução RDC No. nº 18, de 30 de abril de 1999.
- BEHRENS, J. H. **Aceitação, Atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine Max L-Merril*).** Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L. AND COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, p.759-768, 1998.
- CONWAY, P. L., GORBACH, S. L., & GOLDIN, B. R.. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, 70, 1 12, 1987.
- CRITTENDEN R.G., MORRIS L.F., HARVEY M.L., TRAN L.T., MITCHELL H.L., PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.268-278, 2001.
- DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 251 255, 2000.
- ELLI, M., CALLEGARI, M. L., FERRARI, S., BESSI, E., CATTIVELLI, D., SOLDI, S., *et al...* Assessing the survival of yoghurt bacteria in human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5113 5117, 2006.
- FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy journal**. v.9, p.53-61, 1999.

- GILLILAND, S. E., STALEY, T. E., & BUSH, L. J.. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, 67, 3045-3051, 1984.
- GOH K.T., HAISMAN D. R., ARCHER R. H., SINGH H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research International**. v.38, p. 605-613, 2005
- GRATTEPANCHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, v.17, n.2, p. 123-132, 2007.
- GUARNER, F., PERDIGON, G., CORTIER, G., SALMINEN, S., KOLETZKO, B., E MORELLI, L.. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93, 783-786, 2005.
- GUARNER F., SCHAAFSMA G. J. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* v.39, p. 237-238, 1998.
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento e identificação de leveduras produtoras de oligossacarídeos coletadas em diferentes regiões brasileiras**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- JAN, G., LEVERRIER, P., ROLAND, N. Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: In vivo and in vitro investigations. **Lait**. v.82, p. 31-144, 2002.
- LEVERRIER P., FREMONT Y., ROUAULT A., BOYAVAL P., JAN G. In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. **Food Microbiology**. v. 22, p. 11-18, 2005.
- MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; GARDNER, N.J.; CHAMPAGNE, C.P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419-426, 2002
- MATER, D. D., BRETIGNY, L., FIRMESSSE, O., FLORES, M. J., MOGENET, A., BRESSON, J. L. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiology Letters**, v.250, p.85-187, 2005.
- MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal** v. 12 p.173-182, 2002.

- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**. v.31 (3), p. 426-428. 1959
- MISHRA, V., & PRASAD, D. N.. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.109-115, 2005.
- MODLER HW. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4. p. 383-407, 1994.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; COSTA, F.; RODRIGUEZ, M.I.; MAUGERI, F. **Metodologia para Contagem Diferenciada de Lactobacilos e Bifidobactérias em Mistura**. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Recife, PE, Brasil, 2005.
- MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**. v.17, p. 1278-1283, 2007.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO NEPA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TACO Versão 2 Segunda Edição. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 2006, 114 p.
- OUWEHAND A C., KIRJAVAINEN P V, SHORTT C., SALMINEN S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**. v.9, p. 43-52, 1999.
- OHLSON, K., S. BJORNEHOLM, R. FONDEN, AND U. SVENSSON. *Lactobacillus* F19: a probiotic strain suitable for consumer products. **Microb. Ecol. Health Dis.** v.3 (Supl), p. 27-32, 2002
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics and synbiotics - Concepts and nutritional properties. **British Journal of Nutrition** 80, S197-S202, 1998
- RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILAN, C. G.; SALMINEN S. Short Communication: Effect of exopolysaccharide isolated from viili on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 2355-2358, 2006.
- SAVADOGO, A. *et al.* Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. **African Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 3, p. 189-194, 2004.
- SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23, n.3, 2003.

- STANTON C, GARDINER G, MEEHAN H, COLLINS K, FITZGERALD G, LYNCH PB, ROSS RP. Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 73, p. 476-483, 2001.
- 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.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, p. 107-117, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

Foram otimizados o sabor e doçura ideal para um alimento simbiótico fermentado a base de soja no sabor leite condensado e adoçado com sacarose, sendo seus modelos validados. Obtiveram-se também modelos para a aceitação global e intenção de compra pelo público alvo para as variáveis concentração de sacarose e de saborizante. O teor de sacarose foi a variável que obteve o maior efeito significativo ($p < 0,005$) para todas as respostas. Com concentrações superiores a 12g/100mL de sacarose obtém-se o produto com doçura ideal, alta aceitação e intenção de compra superior a 70% do público alvo, já com 11g/100mL obtém-se produto com sabor ideal para qualquer teor de saborizante dentro dos limites do estudo. Um produto contendo 12g/100mL de sacarose e 0,09g/100mL de saborizante satisfaz todas as respostas.

Foram obtidos os modelos de equivalência de doçura para substituição de sacarose por mistura de edulcorante hipocalórico composto por acessulfame-k e sucralose em proporção 25:75 m/m em uma bebida simbiótica fermentada a Bse de soja. A equação de lei da potência obtido para sacarose foi $S = 69,37C^{(1,14)}$ e para mistura edulcorante foi $S = 0,042.C^{(1,28)}$. Assim, para obter equivalência de doçura para 12% (m/v) de sacarose, é necessária a adição de 0,024% (m/v) da mistura edulcorante, sendo que esta é 490 vezes mais doce do que a sacarose no produto estudado.

A presença de sacarose nos simbióticos de soja resulta em produtos com melhores características reológicas e de sobrevivência dos probióticos durante a vida-de-prateleira. A viscosidade aparente foi maior em produtos com sacarose e a tendência foi aumentar ao longo da vida-de-prateleira acompanhada de queda de pH em todas as amostras estudadas, tanto *light* quanto com sacarose. Acontece sinérese com todos os produtos sendo maior nos *light* elaborados com preparados de fruta, no entanto, a sinérese nos produtos foi menor também na presença de sacarose. As contagens de bifidobactérias foram maiores e constantes enquanto que os lactobacilos aumentaram durante o tempo de estocagem para produtos com sacarose.

A linhagem *L. rhamnosus* LR32 foi a bactéria láctica com características probióticas, dentre 12 estudadas, que apresentou melhores características de crescimento e produção de EPS no extrato hidrossolúvel de soja. Na presença do EPS

produzido por *L. rhamnosus* LR32 foi observada menor sinérese, porém os produtos mostraram menores viscosidades aparentes. Produtos com 12% (m/v) de sacarose apresentaram comportamento de fluidos Herschel-Bulkley, e, sem sacarose, do tipo pseudoplástico. O desenvolvimento do *L. rhamnosus* no extrato de soja melhorou significativamente quando inoculado junto ao mix de probióticos (*L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* e *B. longum*) e sacarose, gerando uma relação simbiótica e um produto com boas características de estabilidade no referente a sinérese, viabilidade dos microrganismos e comportamento reológico, sendo que a viscosidade aparente foi a maior entre as fermentações estudadas e apresentou características de fluido Herschel-Bulkley.

Após delineamento experimental P&B foi encontrado que a sacarose e o extrato de soja foram as variáveis com efeito mais significativo sobre a estabilidade dos alimentos simbióticos fermentados a base de soja durante vida-de-prateleira em relação a sinérese, viabilidade da população probiótica, e características reológicas, ou seja, a presença desses componentes dentro dos limites estabelecidos neste estudo, mantém mais estáveis as características dos produtos por maior tempo de estocagem, também os FOS e a polidextrose mostraram efeito positivo nessas respostas. O lactato de cálcio afetou altamente a sinérese, mas também melhora a estabilidade do pH e da bifidobactéria. Alimentos simbióticos de soja substituindo a sacarose por 4% (m/v) de FOS e 4% (m/v) de polidextrose é uma alternativa *light* com boa estabilidade durante 30 dias de estocagem.

Foram obtidos protótipos de alimento simbiótico com característica funcional de resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, sendo que o produto elaborado com a proporção 30:10/60 (*L.rhamnosus*:*L.paracasei*+*L. acidophilus*/*B.longum*) de inóculo, 0% de sacarose, 0% agente tamponante, 10% de extrato de soja, e 4% de polidextrose apresentou os melhores resultados além de caracterizar-se como produto *diet* em sacarose e fonte de fibras dada a resistência dos polissacarídeos presentes à serem digeridos pelos sucos gastrointestinais. Outros produtos elaborados com sacarose 12g/L, FOS 4g/L, polidextrose 4g/L, extrato de soja 10g/L, também apresentaram bons resultados de resistência às barreiras do trato gastrointestinal humano.

Foram obtidos protótipos da bebida fermentada simbiótica a base de extrato de soja, com características de resistência às condições gastrointestinais, tanto em produto adoçado com sacarose quanto *diet*. Estes produtos apresentaram melhora no sabor e na doçura e tiveram aceitação e intenção de compra pelo público alvo. Os protótipos mostraram que produtos contendo alto teor de soja, FOS e/ou povidextrose adoçados ou não com sacarose, fermentados com quatro bactérias lácticas probióticas sendo uma delas o *L. rhamnosus*, produtor de EPS, apresentaram boas características de funcionalidade e estabilidade durante vida-de-prateleira, sendo também fontes de fibras solúveis.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar as variáveis de fermentação em reator de bancada para o alimento simbiótico à base de soja.
- Realizar perfil sensorial por meio da análise descritiva quantitativa (ADQ) e estudos de vida-de-prateleira incluindo análise sensorial.
- Aprofundar o estudo do EPS produzido por *L. rhamnosus* no extrato de soja quanto a composição química, massa molecular, otimização da produção, purificação e estudos reológicos específicos que terão diversas aplicações na indústria de alimentos, química e farmacêutica.
- Estudar outros EPS produzidos por outras bactérias lácticas em diferentes meios de cultura incluindo o extrato de soja.
- Realizar estudos terapêuticos *in vivo* particularmente com humanos voluntários.
- Realizar outros testes de funcionalidade e terapêuticos do alimento simbiótico, como aderência ao GALT (tecido linfático do trato intestinal), resistência a antibióticos, produção de antimicrobianos, entre outros.

“Não chores porque já terminou, sorria porque aconteceu” (Gabriel García Marquez)

APÊNDICE 1. FICHAS APLICADAS PARA TESTES SENSORIAIS

Ficha 1. Ficha de teste afetivo aplicado para aceitação para testes preliminares

Nome _____ Data: _____
 e-mail: _____

Você está recebendo cinco amostras codificadas de bebida fermentada de soja sabor morango. Prove as amostras da esquerda para a direita e avalie na escala apropriada, o quanto você gostou ou desgostou em relação ao sabor.

Amostra

_____	-----
_____	-----
_____	-----
_____	-----
_____	-----

Desgostei muitíssimo Gostei muitíssimo

Comentários _____

Ficha 2. Aplicada em teste triangular para seleção de provadores.

Nome: _____ Data: _____

Por favor, prove as amostras codificadas de bebida fermentada de soja sabor pêssego da esquerda para a direita. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.

_____ _____ _____

Ficha 3. Aplicada na escolha do ideal e testes afetivos para planejamento experimental Plackett & Burman.

Nome: _____ Data: _____
 e-mail: _____.

Você está recebendo 4 amostras codificadas de sobremesa funcional de soja sabor leite condensado. Por favor, primeiro avalie da esquerda para a direita a doçura, posteriormente avalie o gosto e indique na escala abaixo, o quão próximo do ideal encontra-se cada amostra.

Amostra	Escala para DOÇURA ideal		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
	Extremamente	Ideal	Extremamente
	menos doce que o ideal		mais doce que o ideal

Amostra	Escala para SABOR de leite condensado ideal		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
_____	----- -----		
	Extremamente	Ideal	Extremamente
	menos sabor que o deal		mais sabor que o ideal

Por favor, avalie sua preferência quanto à sua **Impressão global** das amostras

Amostra		

Desgostei
muitíssimo
Gostei muitíssimo

Finalmente, assinale abaixo a sua atitude de compra em relação às amostras codificadas.

	Amostra: _____	_____	_____	_____
Eu certamente compraria este produto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu provavelmente compraria este produto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tenho dúvidas se compraria ou não este produto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu provavelmente não compraria este produto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eu certamente não compraria este produto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Comentários: _____

Ficha 4. Aplicada para determinação da equivalência de doçura para mistura de acessulfame-k e sucralose em relação à sacarose em bebida simbiótica a base de soja.

Nome: _____ Data: _____

e-mail: _____.

ESCALA DE MAGNITUDE

Você está recebendo 5 amostras codificadas de sobremesa funcional fermentada de soja. Por favor, prove primeiramente a amostra de referência "R" assinalando a ela o valor de 100 de doçura. Em seguida avalie a intensidade de doçura de cada amostra codificada em relação à amostra referência "R". Se a amostra codificada for 2 vezes mais doce que a amostra R, dê à amostra codificada o valor 200, se for 2 vezes menos doce, dê o valor de 50, e assim por diante.

Amostra	Magnitude
R	100
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários: _____

Obrigado!!

Ficha 5. Teste discriminativo de diferencia do controle para comparação de amostras simbióticas de soja.

Nome: _____ Data: _____
e-mail: _____

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 3 amostras codificadas de sobremesa funcional de soja no sabor natural. Prove a amostra padrão e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

0 = nenhuma diferença	Amostra	Grau de diferença
1		
2	_____	_____
3		
4		
5	_____	_____
6		
7		
8	_____	_____
9 = extremamente diferente		

Comentários: _____

**APÊNDICE 2. COMPORTAMENTO DE ÍNDICES REOLÓGICOS EM ALIMENTOS
SIMBIÓTICOS A BASE DE SOJA DURANTE VIDA DE PRATELEIRA.**

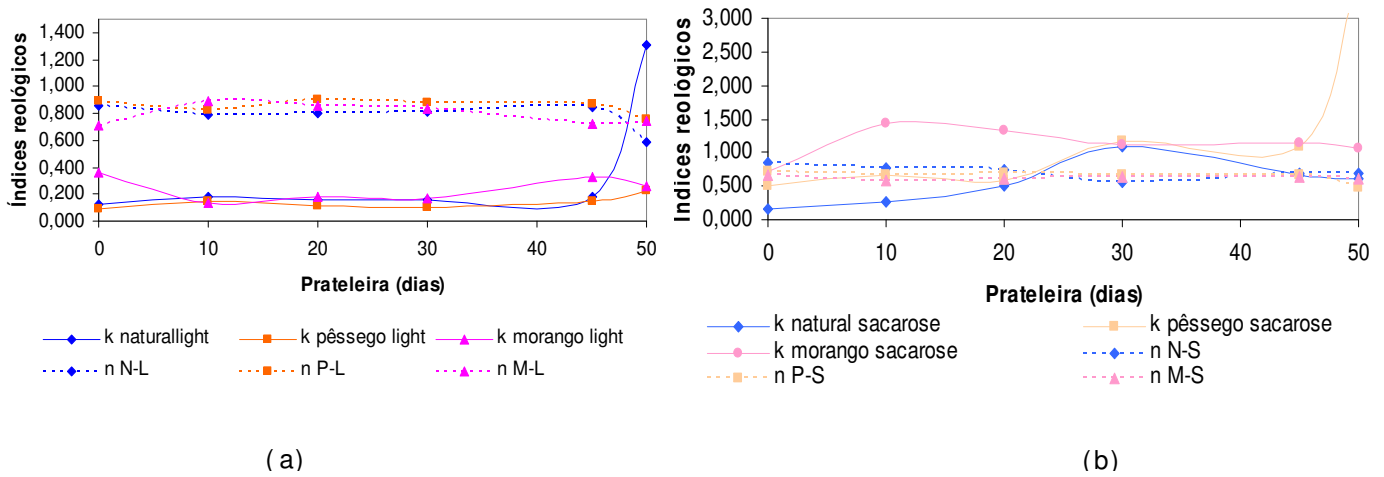


Figura A2.1. Índices reológicos (a) índice de consistência k e (b) índice de escoamento n , em função do tempo de vida-de-prateleira para produto light e sacarose respectivamente.

N-L= Natural light, N-S= natural sacarose, P-L= pêssego light, P-S= pêssego sacarose, M-L= morango light, M-S= morango sacarose

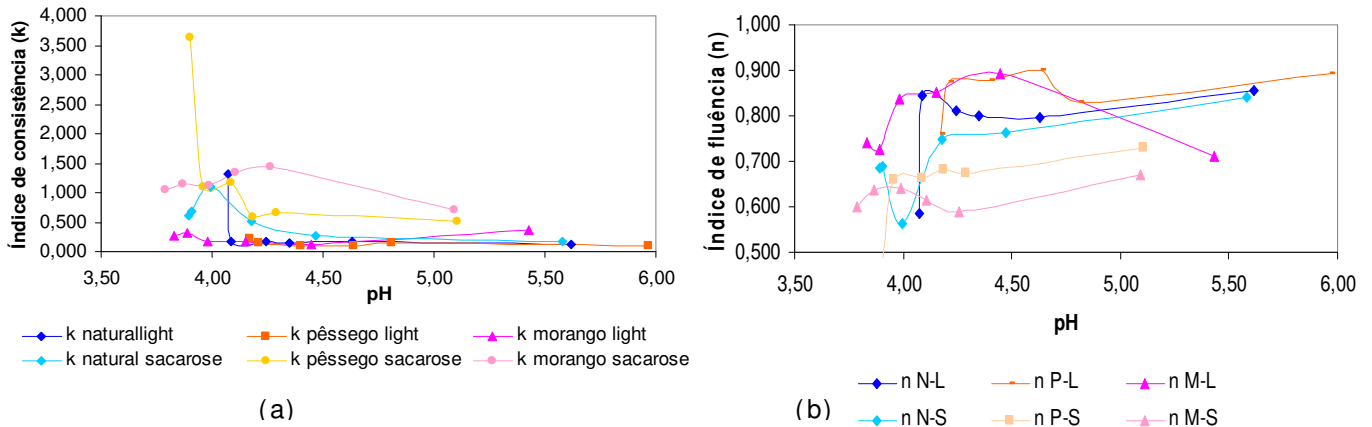


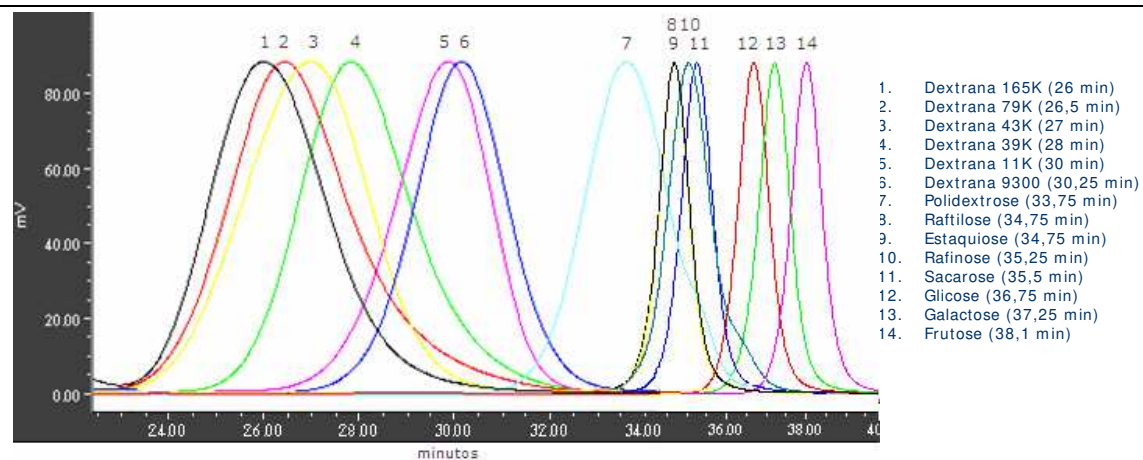
Figura A2.2. Índices reológicos (a) índice de consistência k e (b) índice de escoamento n , em função do pH para produto light e sacarose respectivamente.

N-L= Natural light, N-S= natural sacarose, P-L= pêssego light, P-S= pêssego sacarose, M-L= morango light, M-S= morango sacarose

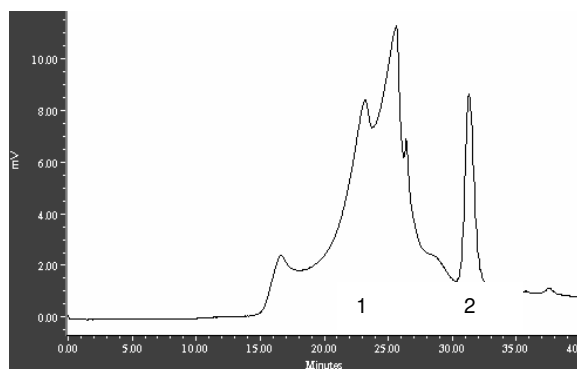
**APÊNDICE 3. CROMATOGRÁFIA DE PERMEÇÃO EM GEL PARA ANÁLISE DE
EXOPOLISSACARÍDEOS EPS- PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS LÁCTICAS
DURANTE FERMENTAÇÃO DE EXTRATO DE SOJA**

Cromatogramas dos padrões, cinéticas das fermentações do mix padronizado de probióticos e *L. rhamnosus* em extrato de soja e meio MRS. Análise em HPLC modelo Varian utilizando colunas de permeação em gel em série GPC6000, GPC4000 e GPC3000.

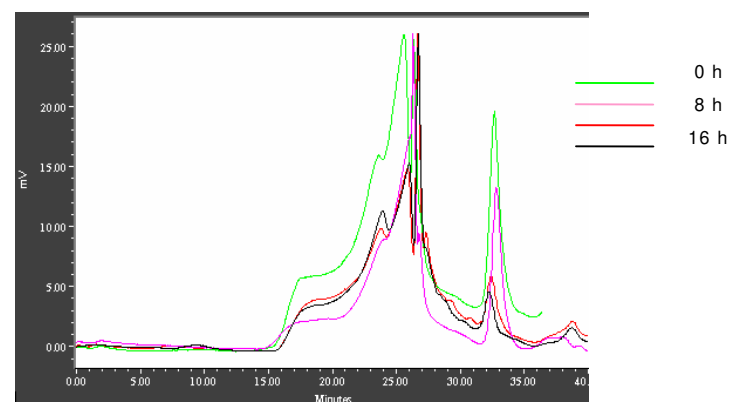
Cromatografia de exopolissacarídeos - EPS em HPLC Varian 9010. Colunas de permeação em gel em série GPC6000, GPC4000 e GPC3000.



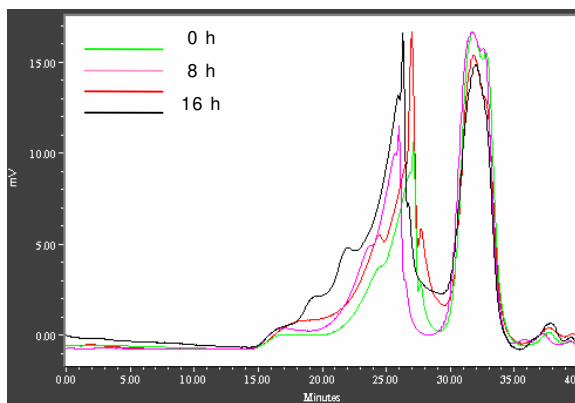
Padrões de dextranas (alta massa molecular), polissacarídeos, oligossacarídeos e açúcares.



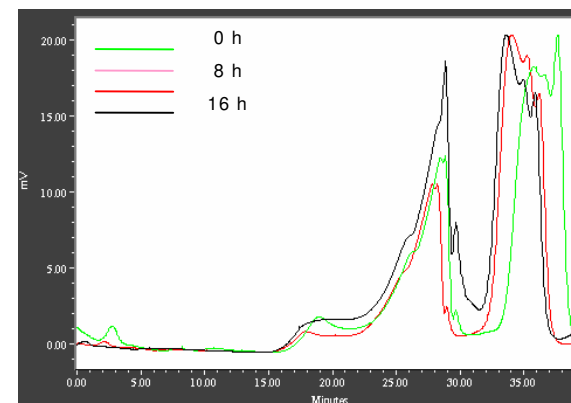
EPS de Extrato hidrossolúvel de soja 10g/100mL: pico 1 com maior massa molecular (m.m.) de aprox. > 165 K, pico 2 com m.m. aproximada à estaquiose



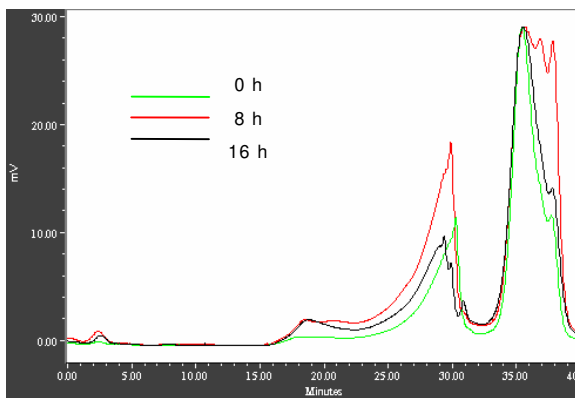
Cinética EPS de *L. rhamnosus* em extrato de soja light sem adição de prebiótico.



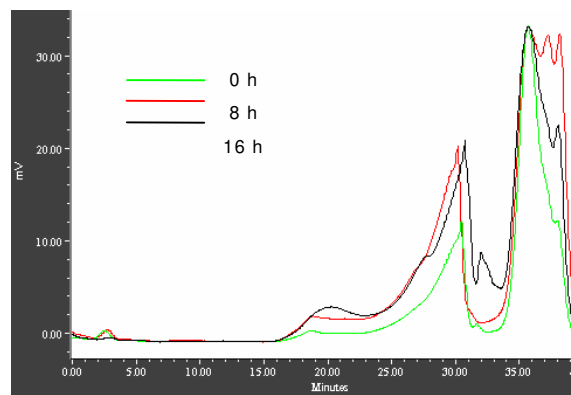
Cinética *L. rhamnosus* em extrato de soja *light*.



Cinética *L. rhamnosus* + 12% sacarose em extrato de soja



Cinética de EPS de *L. rhamnosus* e Mix de probióticos + 12% sacarose em em extrato de soja.



Cinética de EPS de Mix de probióticos + 12% sacarose extrato de soja.

*“Faça do alimento o seu remédio
E remédio o seu alimento”*

(Hipócrates, Cós, 460 a.C.)