



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AGROINDUSTRIAL

**PREVALÊNCIA DE BACTÉRIA PROBIÓTICA *L. acidophilus* - NCFM
EM EXTRATO DE SOJA FERMENTADO E SABORIZADO COM
SACAROSE E POLPA DE PÊSSEGO**

ELIANE GOUVÊA BARBOSA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação da Prof^a. Rosane da Silva Rodrigues, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Março, 2007

ELIANE GOUVÊA BARBOSA

**PREVALÊNCIA DE BACTÉRIA PROBIÓTICA *L. acidophilus* – NCFM
EM EXTRATO DE SOJA FERMENTADO E SABORIZADO COM
SACAROSE E POLPA DE PÊSSEGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof^a.

Rosane da Silva Rodrigues, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Equipe Orientadora: Rosane da Silva Rodrigues
César Valmor Rombaldi

Pelotas, 2007

B223p Barbosa, Eliane Gouvêa

Prevalência de bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* - NCFM em extrato de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêssego / Eliane Gouvêa Barbosa. – Pelotas : UFPEL, 2007.

58 f..

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Industrial, Pelotas, BR-RS, 2007. Orientadora: Rodrigues, Rosane da Silva.

1. *Lactobacillus acidophilus*. – NCFML. 2. Probiótico. 3. Extrato de soja. 4. Sacarose. 5. Polpa de pêssego. I. Rodrigues, Rosane da Silva. II. Título.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues
(Orientador)

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi
(Co-Orientador)

Prof^a. Dr^a. Gladis Aver Ribeiro

Prof. Dr. Paulo Renato Buchweitz

Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte

DEDICO

A minha mãe, Narcí,

que sempre revestiu minha existência de amor, carinho e dedicação e abriu as portas do meu futuro, iluminando-me com a luz mais brilhante que encontrou: o estudo.

Que em momento algum mediu esforços para minha formação pessoal e profissional, deixando, muitas vezes, seus sonhos de lado para viver os meus e torná-los reais.

A quem agradeço por sempre ter sido firme comigo e dessa forma me impediu muitas vezes de pensar em recuar. Sempre confiou na educação que me deu e dessa forma sempre orientou sem jamais interferir nas minhas decisões.

Que sempre torceu e torce para que eu seja feliz e siga meu caminho.

A você, mãe amada que sempre se fez presente e não foi somente mãe, mas também pai e amiga, deixo aqui registrado o meu reconhecimento e gratidão.

Obrigada pela lição de amor e doação que me deste por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, pela vida, amor, dedicação e por investir e acreditar sempre no meu sucesso.

Ao meu padrasto Alberico Cruz, por ter estado ao meu lado, sempre pronto a tudo e com uma palavra de incentivo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof^a Rosane da Silva Rodrigues, minha orientadora, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade, paciência e ajuda nas horas difíceis.

A Prof^a Mírian Ribeiro Galvão Machado, pela disponibilidade e apoio para melhoria do trabalho. Também pelas palavras de incentivo e afeto, que me incentivaram em todos os momentos.

Ao Prof. César Valmor Rombaldi, pelo auxílio e contribuições na execução do trabalho.

A Prof^a Márcia Arocha Gularte, pela orientação na avaliação sensorial.

Ao Prof. Jorge Adolfo Silva, pelo auxílio nas questões administrativas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelos conhecimentos adquiridos e pela amizade.

Às minhas amigas e colegas, Josiane Freitas Chim, Miriane Lucas Azevedo e Angelita Machado Leitão, pelo apoio, alegrias, companheirismo e sólida amizade que construímos ao qual tenho certeza que será para sempre.

Ao meu namorado Fabio da Costa Morales, pelo amor e paciência nos meus “maus momentos”. Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço.

A Deus, que me socorreu espiritualmente dando-me serenidade e forças para continuar.

“Eu não me envergonho de corrigir meus erros e mudar minhas opiniões porque não me envergonho de raciocinar e aprender sempre.”
-- Alexandre Herculano

RESUMO

A maioria dos produtos que contêm probióticos disponíveis no mercado consumidor são alimentos lácteos. Porém, pela disponibilidade de matéria-prima, associada às propriedades nutricionais e funcionais, o extrato de soja tem se mostrado um excelente substrato para a produção de uma bebida com potencial probiótico. Neste contexto, verificou-se a influência da sacarose (8-12%) e polpa de pêssego (10-20%) nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de extrato de soja “Embrapa BRS-213” fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, totalizando em 11 ensaios baseados na Metodologia de Superfície de Resposta. O probiótico, previamente ativado em caldo MRS, foi adicionado na proporção de 2% (v/v) ao extrato de soja contendo as diferentes concentrações de sacarose, procedendo-se a fermentação a 37°C até atingir pH 4,5 ou valor próximo. Após foram adicionados das diferentes concentrações de polpa de pêssego e armazenados sob refrigeração a 4±2°C. Como avaliações estudou-se o pH, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, viscosidade aparente e número de células viáveis no extrato de soja adoçado com sacarose (ES), no extrato de soja adoçado fermentado (ESF), no extrato de soja adoçado e fermentado, após 24 horas de adição da polpa de pêssegos (ESFP) e no extrato de soja adoçado, fermentado e saborizado com polpa de pêssego após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4±2°C (ESFP7). Os resultados indicaram que o processo fermentativo ocorreu adequadamente no ES após, em média, 9 horas de fermentação. A adição de sacarose (8-12%) e polpa de pêssego (10-20%) não afeta negativamente as características físico-químicas da bebida à base de extrato de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* - NCFM, bem como o seu potencial probiótico, mantendo valores acima do preconizado pela legislação vigente mesmo após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4±2°C. Na análise sensorial dos 11 ensaios, utilizou-se teste afetivo de preferência com 50 julgadores não treinados. A bebida que apresentou as maiores médias em todos os atributos (doçura, acidez, viscosidade e sabor) foi a preparada com 15% de polpa de pêssego e 13% de sacarose, bebida esta que representa o ponto central (0) de polpa de pêssego e ponto axial extremo (+α) de sacarose, respectivamente, conforme metodologia estatística de Superfície de Resposta aplicada neste estudo.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus* - NCFM, probiótico, extrato de soja, sacarose, polpa de pêssego.

ABSTRACT

Most of the products which contain probiotics, that are available on the market, are milky foods. However, for the availability of raw material, associated to the nutritional and functional properties, the extract of soy has presented itself as an excellent substrate for the production of a drink with probiotical potential. In this context, it was verified the influence of the sucrose (8-12%) and peach pulp (10-20%) in the chemical-physical, microbiological and sensorial characteristics of soy extract “Embrapa BRS-213” fermented with *L. acidophilus* – NCFM, totalizing in 11 tests based on the Response Surface Methodology. The probiotic previously activated in MRS broth, was added in the proportion of 2% (v/v) to the soy extract containing the different concentrations of sucrose, proceeding to the fermentation to 37°C up to reaching 4,5 pH or near value. Afterwards different concentrations of peach pulp, that werw stored under refrigeration 4±2°C, were added. For evaluations it was studied the pH, content of soluble solids, titratable acidity, apparent viscosity and number of viable cells in the sucrose sweetened soy extract (SE), in the sweetened fermented soy extract (FSE), in the sweetened and fermented soy extract, after 24 hours of addition of the peach pulp (FSEP) and in the extract of soy sweetened, fermented and flavored peach pulp after 7 days of cool storage kept 4±2°C (FSEP7). The results indicated that the fermentative process properly took place in the SE after, 9 hours of fermentation, on average. The addition of sucrose (8-12%) and peach pulp (10-20%) do not affect negatively the chemical-physical characteristics of the drink to the base of soy extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* – NCFM, as well as its probiotic potential, maintaining values above the one demanded by the in force legislation, even after 7 days of cool storage in 4±2°C. In the sensorial analysis of the 11 tests, this preference was used with 50 not trained judges. The drink that presented the highest averages in all the attributes (sweetness, acidity, viscosity and flavor) was the prepared one with 15% of peach pulp and 13% of sucrose, this drink that represents the central point (0) of peach pulp and extreme axial point (+α) of sucrose, respectively, according to the statistical methodology of Response Surface that was applied in this study.

Key-words: *Lactobacillus acidophilus* - NCFM, probiotic, soy extract, sucrose, peach pulp

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Células de <i>L. acidophilus</i> – NCFM.	7
FIGURA 2. Fluxograma de elaboração de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	14
FIGURA 3. Ficha de avaliação sensorial utilizada no teste de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	18
FIGURA 4. Escala Hedônica utilizada no teste de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	19
FIGURA 5. Superfície de resposta referente à variável pH em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	30
FIGURA 6. Superfície de resposta referente à variável teor de sólidos solúveis em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssegos.	32
FIGURA 7. Superfície de resposta referente à variável acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	34
FIGURA 8. Superfície de resposta referente à variável viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	37
FIGURA 9. Colônias de <i>L. acidophilus</i> – NCFM em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	38
FIGURA 10. Bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com 13% de sacarose e saborizado com 15% de polpa de pêssego.	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Listas das espécies que integram o gênero <i>Lactobacillus</i> .	6
TABELA 2. Variáveis independentes e níveis no planejamento experimental 2^2 para formulação de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	12
TABELA 3. Planejamento experimental fatorial completo 2^2 com 2 variáveis independentes em 3 níveis, com 3 repetições do ponto central, para formulação de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	13
TABELA 4. Composição centesimal dos grãos de soja, extrato de soja e polpa de pêssego.	20
TABELA 5. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT) e viscosidade aparente (VA) do extrato de soja adoçado com sacarose.	22
TABELA 6. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM.	23
TABELA 7. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	27
TABELA 8. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável pH em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	28
TABELA 9. Análise de variância do pH na bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	29
TABELA 10. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável sólidos solúveis em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	31

TABELA 11. Análise de variância dos sólidos solúveis em extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	31
TABELA 12. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	33
TABELA 13. Análise de variância da acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	33
TABELA 14. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	35
TABELA 15. Análise de variância da viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	36
TABELA 16. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável contagem de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> - NCFM em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	38
TABELA 17. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4±2°C.	39
TABELA 18. Médias do teste afetivo de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	43
TABELA 19. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo doçura em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	44
TABELA 20. Análise de variância do atributo doçura de bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	44
TABELA 21. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo acidez em bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.	45

TABELA 22. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo viscosidade em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego. 46

TABELA 23. Análise de variância do atributo viscosidade de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego. 47

TABELA 24. Efeito estimado, erro puro e grau de significância no atributo sabor em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego. 48

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Materiais	11
3.2 Métodos	11
3.2.1 Delineamento experimental	11
3.2.2 Fluxograma do processamento	13
3.2.2.1 Obtenção do extrato de soja e adição da sacarose	14
3.2.2.2 Fermentação do extrato de soja	15
3.2.2.3 Adição da polpa de pêssego	15
3.2.3 Avaliações	15
3.2.3.1 Matéria-prima	15
3.2.3.2 Extrato de soja fermentado	16
3.2.3.3 Bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego	17
3.2.3.4 Análise Estatística	19

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Matéria-prima	20
4.2 Extrato de soja adoçado com sacarose	21
4.3 Extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM	23
4.4 Bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego	26
4.5 Bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego, após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4±2°C	39
4.6 Avaliação sensorial da bebida à base de extrato de soja fermentado com <i>L. acidophilus</i> – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego	42
5 CONCLUSÕES	50
6 BIBLIOGRAFIA	51

1 INTRODUÇÃO

O avanço do conhecimento sobre a relação entre alimentação e saúde, os elevados custos com a saúde pública e a busca constante da indústria por inovações têm gerado novos alimentos, conhecidos como “funcionais”, cujas funções pretendem ir além do conhecido papel nutricional dos alimentos. O termo alimento funcional foi inicialmente definido no Japão, em meados da década de 1980, como *Foods for Specified Health Use* (FOSHU). Refere-se a qualquer alimento, ou ingrediente de algum alimento que, além de suas funções nutricionais básicas, contém substâncias com efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou capacidade de reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas (RODRIGUES, 1999).

Neste contexto, incluem-se alguns microorganismos que, além de atuarem de forma positiva na qualidade tecnológica do produto, podem proporcionar efeitos benéficos à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, sendo denominados microorganismos probióticos (OLIVEIRA et al, 2001).

Diversos autores vêm sugerindo possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro. Entre esses efeitos, merecem destaque o controle das infecções intestinais, o estímulo a motilidade intestinal com conseqüente alívio da constipação, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, o estímulo ao sistema imunológico pela produção de anticorpos e atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do hospedeiro, além da exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (GILLILAND; SPECK, 1977; KIM, GILLILAND, 1983; FULLER, 1989; GILLILAND, 1989; TEJADA-SIMON et al., 1999; LEE et al., 1999; GOMES; MALCATA, 1999; SHORTT, 1999; SREEKUMAR; HOSONO, 2000; NAIDU; CLEMENS, 2000).

Dentre os gêneros de bactérias probióticas destacam-se os *Lactobacillus* que foram isolados pela primeira vez por Moro, em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno e que tem sido largamente utilizado na obtenção de produtos lácteos fermentados (GOMES; MALCATA, 1999).

Culturas probióticas com boas características tecnológicas e funcionais devem apresentar elevada multiplicação no produto, promover propriedades sensoriais adequadas e ser estáveis e viáveis durante o processamento e armazenamento. É requisito básico que os alimentos com alegação de funcionalidade relacionada aos probióticos apresentem pelo menos 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ de bactérias viáveis no momento da compra (BRASIL, 1999; SAAD, 2006).

Nos últimos anos o interesse pelo extrato de soja vem aumentando devido à facilidade de obtenção e uso, versatilidade para elaboração de novos produtos e principalmente pelas suas características nutricionais e potencialmente funcionais.

No mercado nacional tem crescido principalmente a oferta de bebidas que associam o extrato de soja a sucos ou polpas de frutas, cuja aceitação pelo consumidor é maior comparativamente ao extrato sem saborização.

Pesquisas científicas demonstraram que o extrato de soja pode ser usado como um substrato adequado para o crescimento e atividade bioquímica de bactérias probióticas, proporcionando assim ao mercado consumidor um alimento com propriedades funcionais potencializadas (WANG et al., 1994; PRASAD et al., 1998; SCALABRINI et al., 1998; CHOU e HOU, 2000; BEASLEY et al., 2003).

A adição de substâncias saborizantes como sacarose e polpa de pêssegos ao extrato de soja fermentado com microorganismo probiótico é uma alternativa para melhorar e/ou incrementar as características sensoriais e a aceitabilidade da bebida, facilitando/estimulando seu consumo com conseqüentes benefícios inerentes a soja e ao probiótico. Contudo, é desconhecida a influência destes ingredientes no processo fermentativo da bebida e na viabilidade deste microorganismo.

O presente trabalho objetivou avaliar a influência da saborização com sacarose e polpa de pêssego no potencial probiótico e nas características físico-químicas e sensoriais de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* - NCFM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos sobre a saúde do hospedeiro é conhecido há bastante tempo. Apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados alimentos funcionais, e dos componentes responsáveis por esse efeito, intensificou-se nos últimos anos.

Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças. São considerados funcionais aqueles alimentos que “contêm ingredientes ou componentes capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas” (PUPIN, 2002; FRANCO et al., 2006; SAAD, 2006).

Segundo a portaria nº. 398 de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Os microorganismos probióticos são adjuntos alimentares que podem constituir e caracterizar alimentos funcionais.

O primeiro relato sobre o uso de microorganismos como adjuntos alimentares foi feita por Elie Metchnikoff, em 1900, quando sugeriu o consumo de leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus*, um microorganismo capaz de se fixar no trato intestinal humano (GILLILAND, 1989; BEHRENS et al, 2000). Segundo Fooks et al. (1999), a palavra *probiótico* se deriva de duas palavras gregas que significam “por vida”.

Os probióticos foram primeiramente definidos como suplementos alimentares à base de microorganismos vivos, que afetavam benéficamente o hospedeiro,

promovendo o balanço intestinal (FULLER, 1989). Atualmente a definição internacionalmente aceita é a de que estes adjuntos alimentares são microorganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003; SAAD, 2006). No Brasil, sua alegação está aprovada pelo Ministério da Saúde como sendo microorganismos que contribuem somente para o equilíbrio da flora intestinal, considerando que seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2002).

Pesquisas científicas recentes (PUPIN, 2002; BOTELHO, 2005; FRANCO et al., 2006; MACHADO et al., 2006; SAAD, 2006;) relatam que a ingestão de alimentos contendo probióticos proporcionam melhorias dos movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes; o equilíbrio da flora intestinal; a prevenção e/ou controle de infecções intestinais; a modulação do sistema imune; a prevenção de alguns tipos de câncer; a redução do colesterol; uma melhor digestão da lactose; a proteção em infecções do trato urinário; a prevenção a alergias; a redução de inflamações e de hipersensibilidade. Alguns desses efeitos citados estão já comprovados, outros são deduções hipotéticas que ainda necessitam de maiores estudos controlados com animais e humanos. Dentre os efeitos benéficos dos probióticos cientificamente validados estão: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos através da produção de ácido lático e acético, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SAAD, 2006).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence a bactéria deve ser de origem humana, a estabilidade frente ao ácido e à bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Ainda, a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não devem estar associadas a outras doenças, tais como, endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000).

O emprego de bactérias lácticas em alimentos é de longa data e a maioria das cepas empregadas são consideradas microrganismos comensais, sem potencial patogênico. Dentre os diversos gêneros que integram os microrganismos probióticos destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, em especial o *Lactobacillus acidophilus* (THAMER; PENNA, 2005; SAAD, 2006;). Segundo Oliveira et al. (2001), as bactérias pertencentes ao gênero lactobacilos são mais freqüentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras (GRAS – *Generally Recognized as Safe*).

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez por Moro em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno. Este pesquisador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (BOTELHO, 2005). Estes microrganismos são geralmente caracterizados como gram-positivos incapazes de formar esporos; desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar; aerotolerantes ou anaeróbios; com temperatura ótima de crescimento entre 37-42°C (GONZALEZ et al., 1989; GOMES; MALCATA, 1999); toleram ácido na faixa de 0,3% a 1,9% e o pH ótimo é de 5,5-6,0; são resistentes à acidez gástrica e sais biliares, com taxa de sobrevivência no trato gastrointestinal (TGI) estimada entre 2% e 5%, atingindo concentrações suficientes no cólon; a capacidade de aderência ao intestino é variável (GUEDES NETO et al., 2002; TOMELIN; PEPLAU, 2005).

O gênero *Lactobacillus* compreende, até o momento, 56 espécies oficialmente reconhecidas (Tabela 1), das quais 5 contém subespécies (*delbrueckii*, *avarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*).

TABELA 1. Espécies que integram o gênero *Lactobacillus*

<i>Lactobacillus</i>	
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. homohiochii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. intestinalis</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. jensenii</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. johnsonii</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. kandleri</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. kefiranofaciens</i>
<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. malefermentans</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. mali</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. minor</i>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. murinus</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. orisa</i>
<i>L. confusus</i>	<i>L. parabuchneria</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. paracaseia</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. farcinimidis</i>	<i>L. reuteria</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. ruminis</i>
<i>L. fructosus</i>	<i>L. sake</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. graminis</i>	<i>L. sharpeae</i>
<i>L. halotolerans</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. hamsteri</i>	<i>L. vaccinofermentans</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>L. viridescens</i>

FONTE: Gomes e Malcata, 1999.

Grande parte das estirpes de *L. acidophilus* degrada amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose e esculina (NAHAISI, 1986). De acordo com Gomes e Malcata (1999), o *L. acidophilus* como microorganismo

heterofermentativo produz quase exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (à taxa de 1,8 mol por mol de glicose).

O emprego de *L. acidophilus* em produtos fermentados comerciais está amplamente difundido, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com outros microrganismos. Essa ampla utilização está associada às propriedades terapêuticas, dentre as quais se destacam a reposição de microbiota intestinal, desejável após uso prolongado de antibióticos; a atuação contra bactérias indesejáveis como *Helicobacter pylori*; a redução dos níveis plasmáticos de colesterol e doenças coronarianas; a redução da ocorrência de doenças do trato urinário inferior como cistite e vaginite; a biodegradação de nitrosaminas carcinogênicas no intestino; o aumento da absorção de lactose em pessoas intolerantes; o efeito imunomodulador; o tratamento de infecções e diarreias causadas por leveduras (GUEDES NETO et al., 2002; MACHADO et al., 2006; SAAD, 2006;).

O *L. acidophilus* – NCFM (Figura 1) foi isolado de fezes de lactentes, sendo produzido comercialmente desde 1972, tendo seu genoma recentemente seqüenciado e parcialmente analisado *in silico*. É capaz de usar uma variedade de carboidratos incluindo mono, di e polissacarídeos, além de carboidratos complexos como rafinose e frutooligossacarídeos. Foram identificados *in silico* sistemas de transporte para trealose, frutose, glicose, manose, melobiose, gentiobiose, celobiose, salicina, rafinose e maltose. No entanto, o *L. acidophilus* - NCFM, através de análise *in silico* de seu genoma parece não ter genes envolvidos no aproveitamento de sacarose (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; BARRANGOU et al., 2003; ALTERMANN et al., 2005; MACHADO et al, 2006).

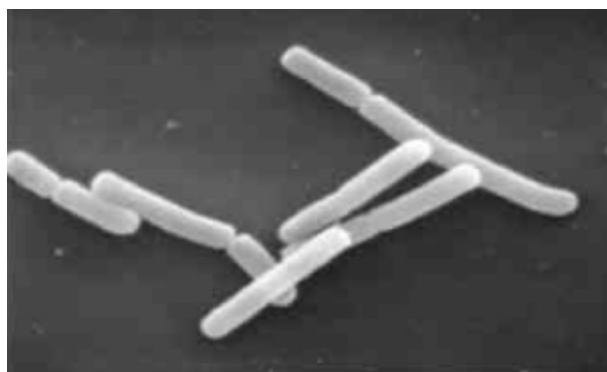


FIGURA 1. Células de *L. acidophilus* – NCFM
Fonte: Sanders e Klaenhammer, 2001.

Culturas probióticas com boas características tecnológicas e funcionais devem apresentar elevada multiplicação no produto, promover propriedades sensoriais adequadas e ser estáveis e viáveis durante o processamento e armazenamento (OLIVEIRA et al, 2002). É requisito básico que os alimentos com alegação de funcionalidade relacionada aos probióticos apresentem pelo menos de 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹ de bactérias viáveis no momento da compra (BRASIL, 1999; SAAD, 2006).

A maioria dos produtos disponíveis no mercado que apresentam probióticos em sua composição, são alimentos lácteos fermentados como iogurte, leite acidófilo, *sour cream*, queijos e leite em pó (PUPIN, 2002). Apesar do leite constituir-se num meio rico do ponto de vista nutricional, as bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido principalmente à falta de atividade proteolítica (KLAVER et al., 1993). A incorporação de micronutrientes como peptídeos e aminoácidos e de outros fatores de crescimento pode ser necessária para reduzir o tempo de fermentação e propiciar viabilidade às bactérias probióticas (OLIVEIRA, 2002).

O extrato de soja, conhecido popularmente como “leite de soja”, é um extrato aquoso obtido a partir de grãos de soja com alto valor nutricional, sendo considerado uma boa fonte alimentar. Dentre os principais produtos à base do extrato de soja, seja para consumo direto ou na elaboração de diversos produtos, estão as bebidas.

Segundo dados da ACNielsen, o consumo de bebidas à base de soja cresceu gradualmente nos últimos anos no Brasil, indo de 51 milhões de litros em 2002 para 110,5 milhões em 2005, equivalendo a um crescimento de 57,3%. Este aumento no consumo de bebidas de soja prontas para beber deve-se à demanda do consumidor por produtos saudáveis e práticos, às novas tecnologias de produção que permitem obter bebidas com melhores características sensoriais e a oferta constante de produtos com sabores diferenciados (ENGARRAFADOR MODERNO, 2006).

As propriedades funcionais associadas ao consumo de produtos contendo soja têm sido atribuídas principalmente aos fitoquímicos presentes nesta leguminosa, destacando-se os inibidores de proteases, fitatos, fitoesteróis, saponinas, ácidos fenólicos, lecitina, ácidos graxos insaturados e isoflavonóides (RODRIGUES, 2003).

Entretanto, ainda ocorrem restrições à inclusão desses produtos na dieta, devido à presença de oligossacarídeos não-digeríveis, na sua maioria estaquiose e

rafinose, que contem ligações alfa-glicosídicas e beta-frutosídicas que causam flatulências no organismo humano (HOU et al., 2000; RODRIGUES, 2003), bem como aos hábitos alimentares da população ainda não estar familiarizada ao consumo e as características sensoriais inerentes à soja.

Pesquisas anteriores realizadas por Wang et al., 1994; Prasad et al., 1998; Scalabrini et al., 1998; Chou e Hou, 2000 e Beasley et al., 2003; demonstraram que a presença de oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) no extrato de soja pode ser usado como um substrato adequado para o crescimento e atividade bioquímica de bactérias probióticas, proporcionando assim ao mercado consumidor um alimento com propriedades funcionais potencializadas, além de uma alternativa de consumo para nichos da população que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela ingestão de leite.

A fermentação láctica pela produção de ácido láctico, acetaldeído e diacetil modificam as características sensoriais de bebidas com extrato de soja além de promover a redução do efeito negativo de indução à flatulência pelos oligossacarídeos naturais da soja (MACHADO et al., 2006).

As tecnologias disponíveis para melhorar as características sensoriais do extrato de soja têm alcançado resultados bastante positivos. Entretanto, sua melhor aceitação pelos consumidores, especialmente na forma pura, ainda é limitada, visto que os extratos de soja naturais prontos para consumo disponíveis no mercado adicionam invariavelmente ingredientes que conferem doçura e/ou aromatizantes com intuito de melhorar o sabor (RODRIGUES, 2003).

Valim et al. (2003) obteve excelentes resultados em termos de aceitação sensorial em bebida à base de suco de laranja e extrato aquoso de soja.

Ao testar diferentes combinações de polpa de manga com isolado protéico de soja na elaboração de uma bebida, Chauhan et al., (1993) verificaram maior aceitação da formulação com 60 partes de polpa e 40 partes de isolado, com significativa melhora do sabor e textura.

Neste contexto, a suplementação de substâncias saborizantes como açúcares e polpas de frutas ao extrato de soja fermentado é uma alternativa para melhorar e/ou incrementar as características sensoriais e a aceitabilidade do produto, porém é desconhecida a influência destas substâncias saborizantes sobre a fermentação das bactérias probióticas. Segundo Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), a sobrevivência das bactérias probióticas durante a fermentação depende da

composição química do meio (fonte de carbono), das linhagens usadas, da interação entre espécies presentes, das condições de cultivo, da composição química do meio (fonte de carbono), da acidez final, do conteúdo de sólidos, dos promotores e inibidores de crescimento, da concentração de açúcares (pressão osmótica), do oxigênio dissolvido (especialmente para bifidobactérias), da quantidade de inóculo, da temperatura de incubação, do tempo de fermentação e da temperatura de armazenamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram utilizados grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) “BRS-213” (safra 2004) fornecidos pela Embrapa-Soja (Londrina-PR). Essa cultivar foi escolhida pela baixa atividade de lipoxigenases, o que permite a obtenção de produtos de soja com sabor e aroma agradáveis e, em consequência, melhor aceitos pelos consumidores. Como cultura probiótica utilizou-se *Lactobacillus acidophilus*, linhagem NCFM, cedido pela Danisco Brasil Ltda (Cotia-SP). Para polpa de pêssego utilizou-se a cultivar Eldorado, fornecida pela ICALDA-Indústria de Conservas Alimentícias Leon Ltda (Pelotas-RS).

3.2 Métodos

3.2.1 Delineamento experimental

A pesquisa foi conduzida segundo um experimento fatorial 2^2 completo, baseado na metodologia de Superfície de Resposta (BARROS NETO et al., 1995), com 4 pontos fatoriais (-1, +1), 3 pontos centrais (nível 0) e 4 pontos axiais ($-\alpha$, $+\alpha$), totalizando 11 ensaios para investigar o efeito das variáveis independentes (concentração de polpa de pêssego e sacarose) nas características da bebida probiótica à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM.

Na Tabela 2 são apresentados os níveis das variáveis independentes (concentração de polpa de pêssego e sacarose) utilizados no planejamento experimental.

TABELA 2. Variáveis independentes e níveis no planejamento experimental 2^2 para formulação de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	NÍVEIS				
	$(-\alpha)$	(-1)	(0)	$(+1)$	$(+\alpha)$
Concentração de polpa de pêsego (P) % (m/m)	7,95	10	15	20	22,05
Concentração de sacarose (S) % (m/m)	7	8	10	12	13

O planejamento experimental fatorial completo 2^2 está representado na Tabela 3 através dos níveis codificados e reais das variáveis independentes.

TABELA 3. Planejamento experimental fatorial completo 2^2 com 2 variáveis independentes em 3 níveis, com 3 repetições do ponto central, para formulação de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

ENSAIO	NÍVEIS CODIFICADOS		NÍVEIS REAIS	
	P	S	P	S
1	-1	-1	10	8
2	+1	-1	20	8
3	-1	+1	10	12
4	+1	+1	20	12
5	0	0	15	10
6	0	0	15	10
7	0	0	15	10
8	$-\alpha$	0	7,95	10
9	$+\alpha$	0	22,05	10
10	0	$-\alpha$	15	7
11	0	$+\alpha$	15	13

P : concentração de polpa de pêssego (%) (m/m);

S: concentração de sacarose (%) (m/m);

$-\alpha/+ \alpha$: pontos axiais.

3.2.2 Fluxograma do processamento

A elaboração das bebidas à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçadas com sacarose e saborizadas com polpa de pêssego, foi conduzido conforme o fluxograma apresentado na Figura 2.

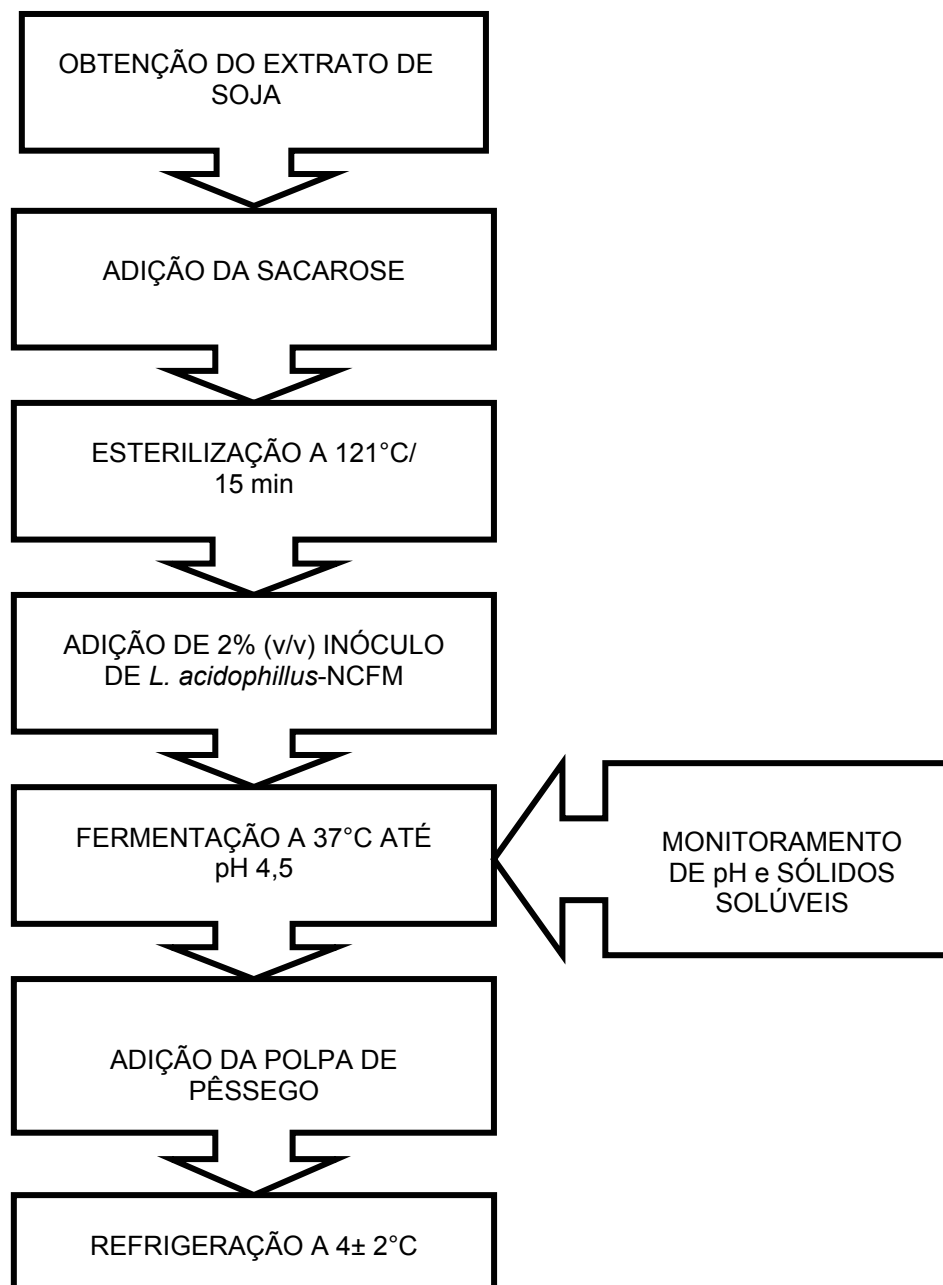


FIGURA 2. Fluxograma de elaboração de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssago.

3.2.2.1 Obtenção do extrato de soja e adição da sacarose

O extrato de soja foi obtido com base nos procedimentos descritos por Moraes e Silva (1996), que consiste nas operações de seleção, lavagem, maceração por 2 horas em água quente, trituração a quente em liquidificador e separação do resíduo por meio de filtro. Após a obtenção do extrato de soja, adicionou-se

sacarose nas porcentagens descritas no delineamento experimental (Tabelas 2 e 3) e realizou-se esterilização a 121°C por 15 minutos.

A proporção soja:água foi calculada para obtenção de extrato com aproximadamente 3% de proteína (m/m).

3.2.2.2 Fermentação do extrato de soja

O preparo dos inóculos a partir da cultura probiótica liofilizada *L. acidophilus* - NCFM foi feito pela reativação das bactérias em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS-Merck) previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos seguindo-se incubação a 37°C por 16 horas.

Os extratos de soja adicionados de sacarose foram fermentados à temperatura de 37°C com 2% (v/v) de inóculo de *L. acidophilus* – NCFM, até atingir o pH de 4,5 ou valor próximo conforme sugerido por Wang et al. (1994), Saxelin et al. (1999) e Oliveira et al. (2001).

3.2.2.3 Adição da polpa de pêssgo

A polpa de pêssgo foi pasteurizada a 100°C por 10 minutos visando a eliminação de patógenos e carga microbiana deteriorante, além de realizar a inativação enzimática (FURTADO et al, 2006).

As bebidas foram obtidas pela mistura dos extratos de soja adoçados com sacarose (item 3.2.2.1) e fermentados (item 3.2.2.2) com a polpa de pêssgos nos percentuais estabelecidos no planejamento experimental (Tabelas 2 e 3). Posteriormente foram acondicionadas em embalagens de vidro de 250mL e armazenadas sob refrigeração a 4±2°C.

3.2.3 Avaliações

3.2.3.1 Matéria-prima

Nos grãos de soja, no extrato de soja e na polpa de pêssego foi determinada, em triplicata, a composição centesimal conforme métodos descritos na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995): umidade (AOAC nº. 92608), cinzas (AOAC nº. 94546), proteínas (AOAC nº. 99120), lipídios (AOAC nº. 90502) e fibra bruta (AOAC nº. 7061), sendo os resultados expressos em percentagem.

Os carboidratos foram calculados por diferença, subtraindo-se de 100 o somatório dos % de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibras.

3.2.3.2 Extrato de soja fermentado

No início e término da fermentação do extrato de soja adoçado com sacarose realizaram-se determinações de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, viscosidade aparente e enumeração de bactérias probióticas viáveis.

Durante o processo fermentativo do extrato de soja adoçado determinou-se, a cada 2 horas, o pH e o teor de sólidos solúveis para controle do término da fermentação.

O pH foi obtido em potenciômetro digital (pHmeter Digimed DM-20) previamente calibrado; o teor de sólidos solúveis foi determinado com refratômetro manual (ATAGO N-1E variação de 0%-32%) e os resultados expressos em graus Brix; a acidez titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH a 0,1N (AOAC nº. 947.05) e os resultados expressos em porcentagem de ácido láctico; e a viscosidade aparente foi determinada com viscosímetro rotacional Viscotester 6L/R da Termo Haake a 100rpm por 30 segundos e os resultados expressos em miliPascal (mPa).

A viabilidade da bactéria probiótica *L. acidophilus* - NCFM foi realizada de acordo com Oliveira et al. (2002). As amostras foram homogeneizadas para utilização nas diluições seriadas de 10^2 até 10^{10} , com diluente peptona de carne estéril (0,1% p/v), seguindo-se o plaqueamento em profundidade, em duplicata, em meio seletivo ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS-Merck), e incubação a 37°C por 72 horas em jarra de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose Anaerobac® (Probac).

A seletividade do meio foi confirmada pela avaliação por microscopia, analisando-se as células isoladas de colônias simples. O resultado foi expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$).

3.2.3.3 Bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

Após 24 horas da adição da polpa de pêssego ao extrato de soja adoçado e fermentado, e ao final de 7 dias de armazenamento da bebida sob refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, determinou-se o pH, o teor de sólidos solúveis, a acidez titulável, a viscosidade aparente e a enumeração de bactérias probióticas, conforme descrito em 3.2.3.2.

As bebidas formuladas foram avaliadas sensorialmente através de método afetivo com aplicação de teste de preferência (MONTEIRO, 1984; MORAES, 1993; MORALES, 1994; GULARTE, 2002), considerando-se os atributos doçura, acidez, viscosidade e sabor.

As amostras foram apresentadas a 50 provadores não treinados, pertencentes à comunidade acadêmica da Universidade Federal de Pelotas, em cabines do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA/UFPel). Os provadores manifestaram sua preferência em relação aos atributos escolhidos, para cada amostra, na ficha de avaliação (Figura 3) utilizando Escala Hedônica Estruturada com 9 pontos (Figura 4) (GULARTE, 2002). As amostras foram servidas aos provadores à temperatura de $\pm 10^{\circ}\text{C}$, em copos plásticos codificados contendo aproximadamente 20mL da bebida.

NOME: _____ IDADE: _____ DATA: __/__/2006.

INSTRUÇÕES: Avalie cuidadosamente cada amostra de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego e utilize a escala hedônica para descrever o quanto você gostou ou desgostou da amostra segundo os atributos mencionados.

• **DOÇURA**

Código da amostra

.
.
.

Valor atribuído

.
.
.

• **ACIDEZ**

Código da amostra

.
.
.

Valor atribuído

.
.
.

• **VISCOSIDADE**

Código da amostra

.
.
.

Valor atribuído

.
.
.

• **SABOR**

Código da amostra

.
.
.

Valor atribuído

.
.
.

Comentários adicionais: _____

FIGURA 3. Ficha de avaliação sensorial utilizada no teste de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.

<u>Escala Hedônica</u>
1= desgostei muitíssimo
2= desgostei muito
3= desgostei regularmente
4= desgostei ligeiramente
5= indiferente
6= gostei ligeiramente
7= gostei regularmente
8= gostei muito
9= gostei muitíssimo

FIGURA 4. Escala Hedônica utilizada no teste de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.

3.2.3.4 Análise Estatística

Os resultados das avaliações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram analisados segundo a Metodologia de Superfície de Resposta em nível de 90% de probabilidade utilizando-se o programa Statistica, versão 5.0 (STATISTICA, 1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Matéria-prima

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da composição centesimal realizada dos grãos de soja da cultivar BRS 213, do extrato de soja e da polpa de pêssegos utilizados na formulação da bebida probiótica saborizada.

TABELA 4. Composição centesimal dos grãos de soja, extrato de soja e polpa de pêssego

DETERMINAÇÃO (%)	GRÃOS DE SOJA	EXTRATO DE SOJA	POLPA DE PÊSSEGO
Umidade	5,07 ± 0,09	94,37 ± 0,07	84,79 ± 0,21
Cinzas	5,48 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Proteínas	35,16 ± 0,74	2,76 ± 0,04	0,48 ± 0,06
Lipídios	20,01 ± 0,10	0,68 ± 0,02	0,18 ± 0,09
Fibra bruta	5,13 ± 0,19	0,17 ± 0,03	1,50 ± 0,06
Carboidratos*	29,15	1,82	12,66

Os valores correspondem à média de 3 repetições com estimativa de desvio padrão.

* Calculados por diferença (Carboidratos = 100 – umidade – cinzas – proteínas – lipídios – fibra bruta).

Os valores da composição química da soja “BRS-213” (Tabela 4) estão de acordo com os valores previamente publicados por Ciabotti et al. (2006), Cai et al. (1997) e Smith e Circle (1978). Porém, vale salientar que é importante determinar-se a composição média dos grãos, pois pode haver variações em função de condições ambientais, do genótipo e local de plantio, que podem afetar a qualidade do extrato (TURATII et al., 1979; TANGO et al., 1984; BHARDWAJ et al., 1999). Na mesma Tabela verifica-se que valores de cinzas, proteínas, lipídios, fibra bruta e carboidratos do extrato de soja são inferiores aos detectados nos grãos de origem, o

que era esperado em função do procedimento adotado, capaz de extrair apenas parte dos principais componentes dos grãos.

Ciabotti e Tarone (2006) também trabalhando com soja “BRS-213”, verificaram no extrato de soja teores de 3,26% de proteína, 1,72% de lipídios, 0,36% de cinzas e 93,79% de umidade, valores portanto similares aos encontrados neste trabalho.

Pêssegos da cultivar Eldorado caracterizam-se pelo tamanho grande, peso médio geralmente em torno de 120g, e forma redondo-cônica com sutura levemente desenvolvida. A película é amarela, com até 50% de pigmentação vermelha, sendo a polpa amarela, firme e aderente ao caroço e com sabor doce-ácido (EMBRAPA, 2007). Não foram encontrados dados relativos à composição centesimal desta cultivar na literatura, contudo, a caracterização da polpa neste estudo pode ser visualizada na Tabela 4.

4.2 Extrato de soja adoçado com sacarose

Na Tabela 5 são apresentadas as médias das respostas analisadas para os parâmetros físico-químicos do extrato de soja adoçado com sacarose utilizado na formulação de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego.

TABELA 5. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT) e viscosidade aparente (VA) do extrato de soja adoçado com sacarose

ENSAIO	S	pH*	SS* (°Brix)	AT* (% ác. láctico)	VA* (mPa)
1	8	6,43	14,6	0,1119 ± 0,005	11
2	8	6,46	14,6	0,1050 ± 0,002	11
3	12	6,49	16,6	0,1392 ± 0,004	42
4	12	6,48	16,8	0,1437 ± 0,001	43
5	10	6,50	18,5	0,1336 ± 0,13	18
6	10	6,36	17,8	0,1324 ± 0,002	18
7	10	6,28	17,8	0,1360 ± 0,002	16
8	10	6,54	18,2	0,1290 ± 0,005	41
9	10	6,28	17,6	0,1311 ± 0,002	19
10	7	6,32	14,6	0,1339 ± 0,005	14
11	13	6,33	20,8	0,1271 ± 0,003	13

S:%sacarose (m/m);

* Os valores correspondem à média de 3 repetições com estimativa de desvio padrão para AT.

Observando-se a Tabela 5, verifica-se que o pH, previamente à fermentação, apresentou valores entre 6,28 e 6,54. Estes valores são próximos aos obtidos por Tashima e Cardello (2003), e estão dentro da faixa esperada para extrato de soja.

De acordo com a Tabela 5, o teor de sólidos solúveis do extrato de soja adoçado com sacarose variou entre 14,6 e 20,8°Brix, valores equivalentes aos sólidos originais extraídos da soja e sacarose.

A acidez titulável do extrato de soja adoçado com sacarose variou de 0,1050 a 0,1437% de ácido láctico conforme a Tabela 5. Este resultado se aproxima de valores encontrados por Machado et al. (2006).

Considerando que a viscosidade é um parâmetro importante em alimentos para o controle de qualidade e aceitabilidade pelos consumidores (COURREGELONGUE et al., 1999; PENNA et al., 2001; YANES et al., 2002), buscou-se analisar o efeito da concentração da sacarose nesta variável. Nesse caso verificou-se que a viscosidade aparente do extrato de soja adoçado com sacarose apresentou-se entre 11 e 43mPa (Tabela 5). Ao aumentar a concentração de sacarose de 8 para 12%, obteve-se um incremento na viscosidade, o que já era

esperado conforme estudos de Oguntunde e Akintoye (1991), segundo os quais a viscosidade é dependente do teor de sólidos totais.

4.3 Extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com *L. acidophilus* – NCFM

Na Tabela 6 estão os resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do extrato de soja adoçado com sacarose após o término da fermentação pela bactéria probiótica *L. acidophilus* – NCFM, porém ainda não adicionado de polpa de pêssego da cultivar Eldorado.

TABELA 6. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com *L. acidophilus* – NCFM

ENSAIO	S	pH*	SS* (°Brix)	AT* (% ác. láctico)	VA* (mPa)	CC** (logUFC.mL ⁻¹)
1	8	4,54	10,00	0,3081 ± 0,008	200	10,32
2	8	4,68	10,40	0,2958 ± 0,009	160	10,29
3	12	4,58	14,20	0,3816 ± 0,017	260	9,51
4	12	4,31	14,00	0,5430 ± 0,002	930	10,02
5	10	4,57	13,00	0,5159 ± 0,005	940	10,41
6	10	4,57	13,00	0,4124 ± 0,003	920	10,36
7	10	4,53	12,80	0,4163 ± 0,002	700	10,89
8	10	4,58	13,00	0,4556 ± 0,006	149	9,67
9	10	4,45	12,60	0,4355 ± 0,007	950	10,46
10	7	4,46	9,80	0,4634 ± 0,005	550	10,31
11	13	4,61	16,20	0,4007 ± 0,001	1030	10,61

S: % sacarose (m/m);

* Os valores correspondem à média de 3 repetições com estimativa de desvio padrão para AT;

** Os valores correspondem à média de 2 repetições.

Através da Tabela 6, verifica-se que o pH do extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com *L. acidophilus* - NCFM apresentou-se em torno de 4,5, valor indicativo do término do processo fermentativo conforme sugerido por Wang et al. (1994), Saxelin (1999) e Oliveira et al. (2001). O tempo de fermentação do extrato

de soja neste estudo foi, em média, de 9 horas em todos os ensaios. Pesquisas precedentes que fermentaram extrato de soja até atingir pH entre 4,0-4,5, com associações ou monoculturas de bactérias lácteas, obtiveram tempos médios de fermentação entre 12 e 24 horas, com preparos de inóculos mais dispendiosos do que o realizado por este estudo (WANG et al., 1994; BEASLEY et al., 2002). Este resultado é importante, pois demonstra que se pode, com a inoculação direta no extrato de soja, obter um produto com fermentação adequada, em períodos significativamente menores. Com isso, restringem-se as operações iniciais de preparo e economiza-se em tempo de fermentação.

Os valores médios do teor de sólidos solúveis do extrato de soja após a fermentação (Tabela 6) foram entre 9,8 e 16,20°Brix, respectivamente para os ensaios com 7 e 13% de sacarose. Comparando-se o teor de sólidos solúveis do extrato adoçado antes do processo fermentativo e ao final (Tabelas 5 e 6), verifica-se que os teores diminuíram entre 14,45 e 32,87%, indicando que parte do substrato foi utilizado pelo *L. acidophilus* - NCFM. Contudo, pesquisas realizadas por Barbosa et al. (2005), Schons et al. (2005), e Machado et al. (2006) não verificaram evidências de consumo de sacarose pelo *L. acidophilus* – NCFM. Deduz-se, dessa forma, que a redução no teor de sólidos solúveis deve-se, provavelmente, ao consumo de componentes que compõem o substrato original como oligossacarídeos (rafinose e estaquiose). Segundo Sanders e Klaenhammer (2001), Barrangou et al. (2003) e Altermann et al. (2005) o *L. acidophilus* - NCFM, através de análise *in silico* de seu genoma parece não haver genes envolvidos no metabolismo de sacarose. No entanto esse microorganismo é capaz de metabolizar uma variedade ampla de carboidratos incluindo mono, dissacarídeos e polissacarídeos, além de carboidratos complexos como os oligossacarídeos. Com base nas referências citadas anteriormente, emite-se a hipótese de que a redução de sólidos solúveis no extrato de soja adoçado e fermentado tenha ocorrido provavelmente pelo consumo dos oligossacarídeos presentes naturalmente na soja como estaquiose e rafinose, e não pelo consumo de sacarose.

O fato do *L. acidophilus* não utilizar a sacarose pode tornar-se um aspecto interessante para a elaboração de uma bebida à base de extrato de soja fermentado e saborizado, na medida em que a bebida preserva o sabor adocicado conferido por esse açúcar, além da participação do aumento da viscosidade (Tabela 6).

A acidez titulável, expressa em ácido láctico, ao final da fermentação manteve-se entre 0,3 e 0,5% (Tabela 6). A pequena variação observada é coerente com as variações de pH.

Comparando os valores de acidez do extrato adoçado (Tabela 5) e do extrato adoçado e fermentado pelo *L. acidophilus* – NCFM (Tabela 6), verifica-se um aumento dos valores dessa variável. Esta variação é decorrente da transformação dos açúcares (estaquiose e rafinose) presentes no extrato de soja em ácidos orgânicos, especialmente o láctico, por meio da fermentação láctica bacteriana.

Na Tabela 6 verifica-se que a viscosidade aparente do extrato de soja adoçado e fermentado (Tabela 6) variou entre 149 e 1030mPa, havendo tendência ao aumento dessa resposta com o incremento na concentração de sacarose, dentro da faixa estudada. Embora a bebida em estudo não tenha a textura característica de iogurtes (formação de coágulo), verifica-se que ocorreu um incremento na viscosidade aparente do produto fermentado, quando comparado com o extrato de soja adoçado (Tabela 5). Em estudos preditivos de Barrangou et al. (2003) e Altermann et al. (2005) foi verificado que linhagens de *L. acidophilus* - NCFM são capazes de produzir biopolímeros a partir de oligossacarídeos. Esses biopolímeros podem, em presença de água, ácidos, açúcares e variações de temperatura, alterar propriedades reológicas do meio, o que pode explicar, ao menos em parte, o incremento da viscosidade aparente.

A contagem de células viáveis de *L. acidophilus* - NCFM ao final da fermentação do extrato de soja adoçado com sacarose apresentada na Tabela 6 indica que o número de unidades formadoras de colônias variou de 9,51 a 10,89, o que corresponde a 10^{10} UFC.mL⁻¹. De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2002), um produto alimentício para ser considerado probiótico deve conter concentrações viáveis do microorganismo acima de 10^6 UFC.mL⁻¹, o que foi perfeitamente contemplado neste estudo até esta etapa.

Pesquisas anteriores já haviam demonstrado que o extrato de soja pode ser usado como um substrato adequado para o crescimento e atividade bioquímica de bactérias probióticas, proporcionando assim ao mercado consumidor um alimento com propriedades funcionais potencializadas (WANG et al., 1994; SCALABRINI et al., 1997; PRASAD et al., 1998; CHOU e HOU, 2000; BEASLEY et al., 2002; MACHADO et al., 2006).

Considerando que a polpa de pêssegos não havia sido adicionada até este momento do estudo, ou seja, ao final da fermentação do extrato adoçado, verificou-se que a concentração de 7 a 13% de sacarose não exerce influência (Tabela 6) no crescimento e na atividade fermentativa da bactéria probiótica *L. acidophilus* - NCFM. Este resultado também foi reportado por Machado et al. (2006) em extratos de soja adicionados com diferentes teores de sacarose.

4.4 Bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados médios referentes às avaliações físico-químicas e microbiológicas da bebida propriamente dita, ou seja, após a adição da polpa de pêssego ao extrato de soja adoçado com sacarose e fermentado com *L. acidophilus* - NCFM.

As avaliações foram realizadas 24h após a adição de polpa de pêssego visando avaliar sua influência sobre a viabilidade da bactéria probiótica em estudo.

TABELA 7. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego

ENSAIO	P	S	pH*	SS* (°Brix)	AT* (% ác. láctico)	VA* (mPa)	CC** (logUFC.mL ⁻¹)
1	10	8	4,30	10,40	0,4359 ± 0,007	540	11,23
2	20	8	4,25	10,60	0,4837 ± 0,007	340	10,18
3	10	12	4,00	14,40	0,5011 ± 0,003	420	10,24
4	20	12	4,31	13,80	0,6689 ± 0,003	730	9,76
5	15	10	4,21	13,00	0,6012 ± 0,004	1030	10,29
6	15	10	4,28	12,80	0,5349 ± 0,002	970	9,67
7	15	10	4,26	12,60	0,5614 ± 0,004	770	10,28
8	7,95	10	4,50	12,80	0,5585 ± 0,005	650	9,78
9	22,05	10	4,35	12,20	0,5872 ± 0,005	730	10,28
10	15	7	4,22	10,40	0,6116 ± 0,005	430	10,23
11	15	13	4,52	15,60	0,5443 ± 0,007	510	10,35

P: % polpa de pêsego (m/m); S: % sacarose (m/m);

* Os valores correspondem à média de 3 repetições com estimativa de desvio padrão para AT;

** Os valores correspondem à média de 2 repetições.

O pH da bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM contendo sacarose e adicionada de polpa de pêsegos variou entre 4,0 e 4,5 como exposto na Tabela 7. As diferenças observadas entre ensaios devem-se aos diferentes percentuais de polpa adicionados. Contudo, não se observam menores valores de pH relativamente às maiores concentrações de polpa de pêsegos.

TABELA 8. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável pH em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssago

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	-0,1308	0,0255	0,0361
Polpa (Q)	0,1553	0,0305	0,0364
Sacarose (L)	0,1888	0,0255	0,0178
Sacarose (Q)	0,1000	0,0305	0,0816
Polpa (L) x Sacarose (L)	-0,1050	0,0361	0,10046

L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

Analisando os efeitos estimados na Tabela 8 pode-se observar que ambas variáveis (sacarose e polpa de pêssago) tiveram influência significativa, a 90% de probabilidade, no pH da bebida em estudo após 24h de adição da polpa de pêssagos. O efeito linear negativo da variável polpa indica que as bebidas formuladas com percentuais maiores de polpa na bebida resulta em menores valores de pH. A adição de 10 a 20% de polpa de pêssago promove um decréscimo neste parâmetro pela presença dos ácidos orgânicos málico e cítrico da fruta.

O efeito linear positivo da sacarose sobre o pH, que corresponde ao aumento do pH, quando se adiciona percentuais crescentes de sacarose na faixa de 8 a 12%, não era um efeito esperado, considerando-se a constatação na etapa anterior (extrato adoçado) de que a sacarose aparentemente não influencia o processo fermentativo. Entretanto, este efeito pode ter sido decorrente do aumento das percentagens de sacarose tenha reduzido as percentagens de extrato de soja e desta forma diminuiu os oligossacarídeos presentes naturalmente neste produto.

TABELA 9. Análise de variância do pH na bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R²
Regressão	0,1436	4	0,0359	11,17826	3,18	0,9494
Resíduo	0,0193	6	0,0032			
Falta de Ajuste	0,0167	4	0,0042	3,2045	9,24	
Erro Puro	0,0026	2	0,0013			
Total	0,1628	10				

SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A fonte de variação da análise ANOVA apresentada na Tabela 9 demonstra que 94,94% da variação dos resultados foi explicada pela regressão. No teste F, o valor calculado foi maior que o valor tabelado, a 90% de significância, podendo estabelecer-se um modelo matemático de 2ª ordem para o parâmetro pH em extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego (Equação 1).

Equação 1

$$\text{pH} = -0,1308P + 0,1888S + 0,1553P^2 + 0,1000S^2$$

Com base no modelo gerado foi construída a superfície de resposta para o pH da bebida (Figura 5).

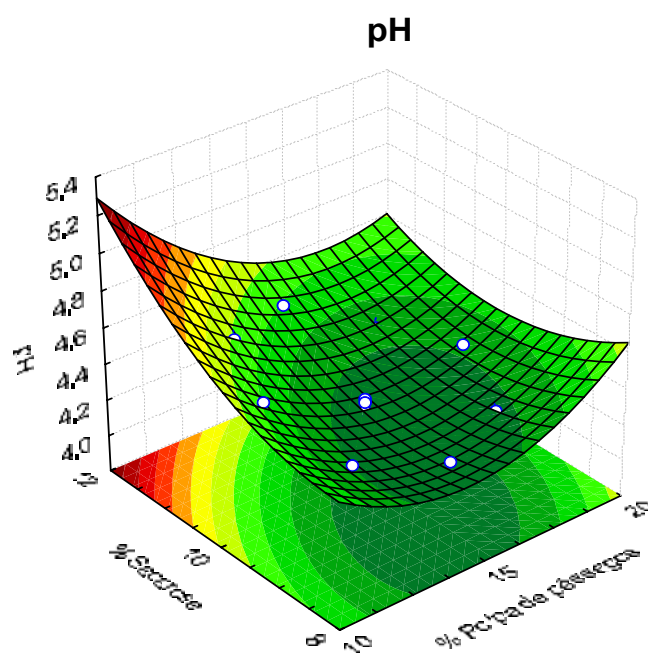


FIGURA 5. Superfície de resposta referente à variável pH em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo.

Observando-se a Tabela 7, verifica-se que o teor sólidos solúveis apresentou valor mínimo de 10,40 e máximo de 15,0°Brix, que correspondem, respectivamente, aos pontos axiais extremos ($-\alpha$ e $+\alpha$) de sacarose. A adição de 10 a 20% de polpa de pêssgo ao extrato de soja adoçado e fermentado atribuiu um pequeno incremento nos valores de sólidos solúveis pelo acréscimo dos constituintes da fruta (açúcares, sais, proteínas, fibras) presentes na polpa.

TABELA 10. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável sólidos solúveis em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	-0,2000	0,2000	0,4226
Sacarose (L)	3,6000	0,2000	0,0031
Polpa (L) x Sacarose (L)	-0,4000	0,2000	0,1835

L= efeito linear.

O teor de sólidos solúveis é significativamente ($p \leq 0,10$) influenciado pela variável independente sacarose. Este efeito é decorrente da adição de sacarose obtendo-se teores crescentes de sólidos solúveis pelo incremento de 8 para 10% de sacarose na formulação da bebida (Tabela 10).

TABELA 11. Análise de variância dos sólidos solúveis em extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R²
Regressão	13,1600	3	4,3867	25,8764	5,39	96,28
Resíduo	0,5086	3	0,1695			
Falta de Ajuste	0,4286	1	0,4286	10,7143	8,53	
Erro Puro	0,0800	2	0,0400			
Total	13,6686	6				

SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A ANOVA da Tabela 11 mostra que 96,28% da variação dos resultados de sólidos solúveis foi explicada pela regressão e o modelo codificado (Equação 2) que evidencia que o comportamento deste parâmetro foi estatisticamente significativo a $p \leq 0,10$ e preditivo, pois atende a premissa (Figura 6) de que o valor de F calculado deve ser no mínimo 3 a 4 vezes superior ao F tabelado (BOX; WETZ, 1973).

Equação 2

Sólidos solúveis = 0,6000S

SÓLIDOS SOLÚVEIS

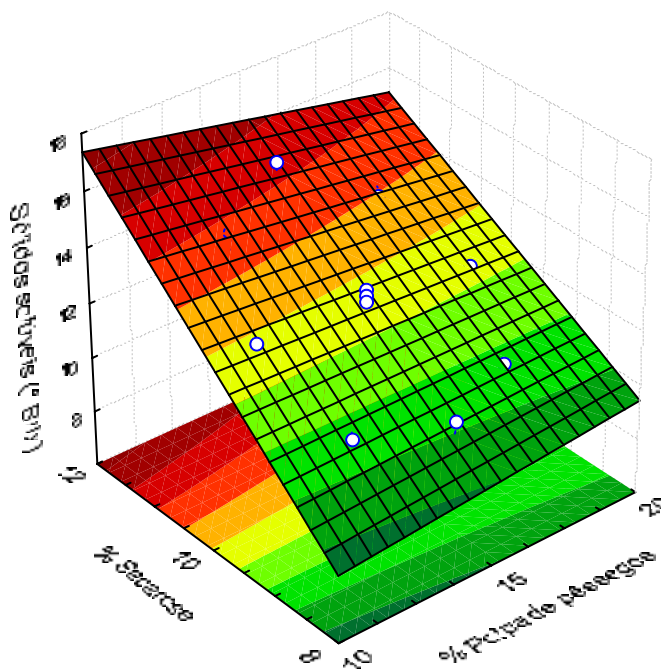


FIGURA 6. Superfície de resposta referente à variável teor de sólidos solúveis em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego.

Na Tabela 7 verifica-se que a acidez titulável da bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego apresentou-se entre 0,4359 e 0,6689% de ácido láctico, referentes aos percentuais mínimos e máximos das variáveis (percentagem de polpa de pêsegos e sacarose). Comparando estes resultados com os da bebida adoçada e fermentada sem a adição de polpa de pêsego (Tabela 6), verifica-se um incremento nos valores de acidez titulável. Este aumento na acidez do extrato de soja saborizado e fermentado após 24 horas da adição de polpa de pêsegos era esperado pela presença de ácidos orgânicos inerentes à fruta.

TABELA 12. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	0,1078	0,0334	0,0840
Sacarose (L)	0,1252	0,0334	0,0643
Polpa (L) x Sacarose (L)	0,0600	0,0334	0,2141

L= efeito linear.

Analisando a Tabela 12, observa-se que as variáveis independentes, polpa e sacarose, mostraram interferência estatisticamente significativa ($p \leq 0,10$) na acidez titulável da bebida à base de extrato de soja fermentado com bactéria probiótica adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego, dentro da faixa de valores estudados. O efeito linear é positivo em ambas variáveis independentes indica que, o aumento das percentagens destes ingredientes (polpa e sacarose), na bebida em estudo, acarreta um aumento na acidez. O aumento das percentagens de polpa acarreta um aumento na acidez da bebida provavelmente pelo acréscimo de ácidos orgânicos naturais da fruta, porém o aumento de sacarose aumentar a acidez foi um resultado não esperado tendo em vista que o *L. acidophilus* - NCFM não possui genes capazes de metabolizar a sacarose e produzir ácidos orgânicos, de acordo com análises *in silico* realizadas por Sanders e Klaenhammer (2001) e Altermann et al. (2005).

TABELA 13. Análise de variância da acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R²
Regressão	0,027291	2	0,01364542	6,0250	4,32	0,8498
Resíduo	0,009059	4	0,00226481			
Falta de Ajuste	0,006831	2	0,00341558	3,0660	9	
Erro Puro	0,002228	2	0,00111403			
Total	0,036350	6				

SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A fonte de variação da ANOVA apresentada na Tabela 13 demonstra que 84,98% da variação dos resultados de sólidos solúveis foi explicada pela regressão

e o modelo codificado (Equação 3) que evidencia que a acidez titulável foi estatisticamente significativo a $p \leq 0,10$, porém não preditivo, pois o valor de F calculado é pouco superior ao F tabelado (BOX; WETZ, 1973).

Equação 3

$$\text{Acidez titulável} = 0,1078P + 0,1252S$$

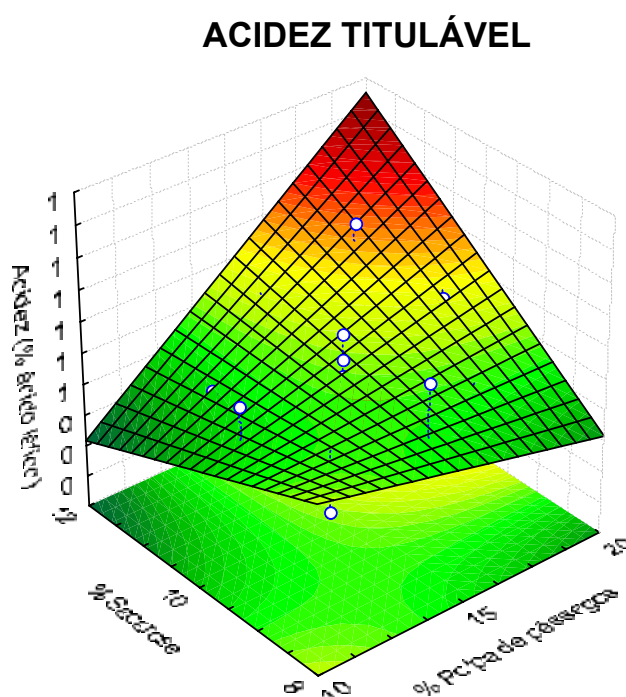


FIGURA 7. Superfície de resposta referente à variável acidez titulável em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.

A análise dos valores médios da viscosidade aparente da bebida observados na Tabela 7 mostra uma variação de 340 a 1030mPa. Estes valores de viscosidade ocorreram nos ensaios 2 e 5 do planejamento experimental, respectivamente. Estes ensaios correspondem às formulações com 20 e 15% de polpa de pêssego e 8 e 10% de sacarose, respectivamente.

Comparando os valores da bebida adoçada e fermentada (Tabela 6) com a bebida adoçada, fermentada e adicionada de polpa de pêssego (Tabela 7), verifica-se um aumento da viscosidade aparente. A adição de polpa de pêssego nas formulações proporciona um aumento da concentração de sólidos solúveis. Desta forma, a quantidade de água livre na bebida diminui, aumentando, assim, a viscosidade (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996). Além disso, a presença de polissacarídeos na polpa, como pectina e celulose, pode ter contribuído para o aumento da viscosidade.

TABELA 14. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	55,8662	96,4070	0,6208
Polpa (Q)	-270,4429	115,0387	0,1431
Sacarose (L)	95,9856	96,4070	0,4243
Sacarose (Q)	-491,7597	115,0387	0,0506
Polpa (L) x Sacarose (L)	255,0000	136,1372	0,2019

L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

Analisando os efeitos estimados das variáveis independentes polpa de pêssego e sacarose (Tabela 14) no parâmetro viscosidade aparente, observa-se que somente a variável sacarose apresenta influência estatisticamente significativa ($p \leq 0,10$).

O efeito quadrático negativo da variável independente sacarose indica que percentuais crescentes deste ingrediente, dentro da faixa estudada, aumentariam a viscosidade, mas um aumento excessivo poderia diminuir esta resposta. De acordo com Oguntunde e Akintoye (1991), a viscosidade aparente depende do teor de sólidos solúveis corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Porém, de acordo com Brandão (1987), um aumento excessivo de sólidos solúveis, em $pH < 4,0$ ou próximo, em iogurtes elaborados a partir do leite, pode promover a contração do coágulo do meio, devido à redução da hidratação das proteínas pela redução da atividade de água, causando o dessoramento com a decorrente diminuição da viscosidade. Outro fato importante é que o aumento excessivo nas percentagens de sacarose pode ter reduzido a solubilidade do meio pela supersaturação com esse

açúcar, acarretando a formação de duas fases com conseqüente redução da viscosidade aparente da bebida em estudo.

TABELA 15. Análise de variância da viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R²
Regressão	260983,4361	1	260983,4361	9,7046	3,36	0,9006
Resíduo	242034,7457	9	26892,7495			
Falta de Ajuste	204968,0790	7	29281,1541	1,5799	9,35	
Erro Puro	37066,6667	2	18533,3333			
Total	503018,1818	10				

SQ= média dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A fonte de variação da ANOVA apresentada na Tabela 15 mostra que 90,06% da variação dos resultados de viscosidade aparente pode ser explicada pela regressão e o modelo codificado que descreve o comportamento da viscosidade aparente foi estatisticamente significativo a 90% de probabilidade (Equação 4). Além disso, pode ser considerada preditiva, pois o valor de F calculado é superior ao tabelado.

Equação 4

Viscosidade aparente = -412,9607S

Assim, foi possível obter a superfície de resposta (Figura 8) que mostra o comportamento da viscosidade aparente da bebida sob influência das variáveis estudadas.

VISCOSIDADE APARENTE

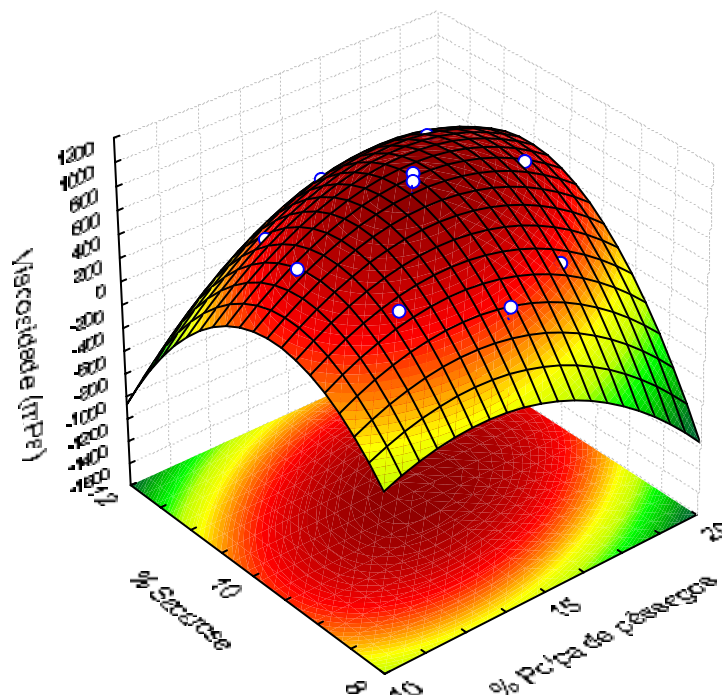


FIGURA 8. Superfície de resposta referente à variável viscosidade aparente em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo.

Verifica-se na Tabela 7 que os valores de contagem de células viáveis obtidos após a adição de polpa de pêssgo em bebida probiótica à base de extrato de soja adoçado e fermentada com *L. acidophilus* - NCFM ocorreram nos ensaios 6 e 1 que correspondem, respectivamente, a $9,67$ e $11,23^{10}$ logUFC.mL⁻¹. Estes ensaios referem-se à utilização de 10 e 15% de polpa de pêssgo e 8 e 10% de sacarose.

Comparando a contagem do extrato de soja adoçado fermentado (Tabela 6) com o extrato adoçado, fermentado e adicionado de polpa de pêssgo (Tabela 7), verifica-se que não houve variação significativa (Figura 9). Este comportamento indica que a elaboração de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo é teoricamente viável, relativamente ao conceito de probiótico, pois mantém os valores de células viáveis preconizado pela legislação (10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹) sem prejuízo aos

parâmetros de qualidade sensorial visto que, um dos fatores limitantes do consumo do extrato de soja puro é seu sabor, odor e os hábitos alimentares. Nesse contexto, este resultado é importante, pois projeta ao mercado consumidor um produto saboroso, tecnologicamente viável e com as características nutricionais da soja aliado com os benefícios à saúde proporcionada pelos probióticos. Além disso, é um produto obtido com inoculação direta no extrato de soja e fermentado em 9 horas.

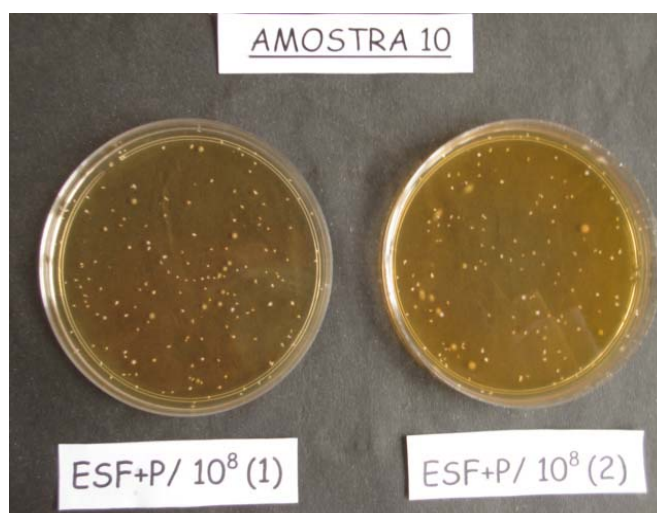


FIGURA 9. Colônias de *L. acidophilus* – NCFM em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo. (ESF+P: extrato de soja adoçado e fermentado e adicionado de polpa de pêssgos; (1) (2): duplicata da diluição 10^8 UFC/mL).

TABELA 16. Efeito estimado, erro puro e grau de significância da variável contagem de células viáveis de *L. acidophilus* - NCFM em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	-0,2069	0,2515	0,4972
Polpa (Q)	0,0470	0,3001	0,8898
Sacarose (L)	-0,3111	0,2515	0,3416
Sacarose (Q)	0,3086	0,3001	0,4119
Polpa (L) x Sacarose (L)	0,2850	0,3551	0,5064

L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

De acordo com a Tabela 16 observa-se que nenhuma variável (% polpa de pêssgo e de sacarose) e suas interações mostraram, dentro da faixa de valores proposto pelo planejamento experimental, interferência estatisticamente significativa

($p \leq 0,10$) na contagem de células viáveis de *L. acidophilus* - NCFM na bebida saborizada. Este resultado indica que a adição de polpa de pêsego e sacarose nas percentagens propostas não influi no crescimento do *L. acidophilus* – NCFM. Este resultado torna-se importante, pois demonstra que a saborização com sacarose e polpa de pêsego não afeta o potencial probiótico da bebida em estudo.

4.5 Bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego, após 7 dias de armazenamento refrigerado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

A Tabela 17 apresenta os valores de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, viscosidade aparente e contagem de células viáveis de *L. acidophilus* – NCFM em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego, após 7 dias de armazenamento refrigerado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

TABELA 17. Valores de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), viscosidade aparente (VA) e contagem de células viáveis (CC) em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego, após 7 dias de armazenamento refrigerado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

ENSAIO	P	S	pH*	SS* (°Brix)	AT* (% ác. láctico)	VA* (mPa)	CC** (logUFC.mL ⁻¹)
1	10	8	4,16	10,40	$0,4398 \pm 0,006$	590	11,13
2	20	8	4,30	10,60	$0,4732 \pm 0,005$	148	11,23
3	10	12	4,45	14,40	$0,5029 \pm 0,000$	300	9,62
4	20	12	4,20	14,40	$0,6740 \pm 0,000$	560	10,29
5	15	10	4,04	13,20	$0,6529 \pm 0,005$	930	9,46
6	15	10	4,29	12,80	$0,5701 \pm 0,002$	900	9,24
7	15	10	4,24	12,80	$0,5648 \pm 0,002$	620	10,07
8	7,95	10	4,17	12,80	$0,5743 \pm 0,003$	550	9,63
9	22,05	10	4,20	12,60	$0,5955 \pm 0,003$	430	10,26
10	15	7	4,25	10,60	$0,6182 \pm 0,002$	310	10,22
11	15	13	4,55	15,60	$0,5452 \pm 0,006$	470	10,50

P: % polpa de pêsego (m/m); S: % sacarose (m/m);

* Os valores correspondem à média de 3 repetições e com estimativa de desvio padrão para AT;

** Os valores correspondem à média de 2 repetições.

A variável pH, após os 7 dias de armazenamento refrigerado da bebida, (Tabela 17) variou entre 4,04 e 4,55, nos ensaios 5 e 11, os quais correspondem, respectivamente, a 10 e 13% de sacarose, ambos com 15% de polpa de fruta. Os resultados obtidos se assemelham ao estudo precedente realizado por Schons et al. (2006) em bebida de soja fermentada com o *L. acidophilus* – NCFM durante o armazenamento a 4°C.

Comparando estes valores de pH com os da bebida antes do armazenamento refrigerado por 7 dias (Tabela 7 e 17), verifica-se uma pequena redução. Segundo Beal (1999), a redução do pH de iogurtes em 7 dias de armazenamento refrigerado a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, está relacionada com a pós-acidificação do meio pelo consumo de carboidratos e produção de ácido láctico demonstrando existência de atividade metabólica das bactérias durante o armazenamento refrigerado. Oliveira e Damin (2000) também observaram ligeira redução de pH após 7 dias de armazenamento refrigerado quando estudaram a viabilidade de bactérias probióticas em leites fermentados.

O teor de sólidos solúveis, após 7 dias de armazenamento refrigerado, variou de 10,40 a 15,60°Brix, conforme verifica-se na Tabela 17. Estes valores mantiveram-se praticamente inalterados quando comparados com os obtidos na bebida recém saborizada (Tabela 7). Este resultado indica que a pós-acidificação da bebida, verificada pela redução do pH durante o armazenamento refrigerado, deve-se pelo lento consumo dos oligossacarídeos naturalmente presentes no extrato de soja e não dos conteúdos de sacarose adicionados à bebida.

De acordo com a Tabela 17, a acidez titulável da bebida potencialmente probiótica variou entre 0,4398 e 0,6740% de ácido láctico, que corresponde, respectivamente, aos pontos extremos (-1 e +1) de ambas variáveis utilizadas no planejamento. Verificou-se uma pós-acidificação lenta ao comparar-se com a bebida antes dos 7 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 7), característica desejável para garantir viabilidade no produto durante a estocagem.

Efetivamente, durante a estocagem refrigerada de bebidas fermentadas, pode haver aumento da acidez titulável. Estas mudanças na acidez do produto ocorrem, em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas e também se relaciona às mudanças nos valores de pH (GURGEL; OLIVEIRA, 1995).

Os valores mínimo e máximo do parâmetro viscosidade aparente variaram de 148 a 930mPa referentes aos ensaios 2 e 5, respectivamente (Tabela 17).

Comparando-se os ensaios de viscosidade da bebida após a adição da polpa de pêssegos (Tabela 7) com a mesma bebida após 7 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 17), verifica-se uma redução no valor deste parâmetro. Embora a bebida não tenha textura característica de iogurte, estudos precedentes indicam que o armazenamento refrigerado de iogurtes não interrompe totalmente o crescimento de bactérias lácticas, as quais mantêm, no entanto, certa atividade metabólica, tendendo a reduzir pH e aumentar a acidez, que acarretam uma diminuição da hidratação das proteínas e contração do coágulo reduzindo desta forma a viscosidade aparente destes produtos (BEHMER, 1999; THAMER et al., 2006). Neste contexto, é possível concluir que a redução da viscosidade aparente da bebida em estudo se deva à contração da rede de biopolímeros formada pelos *L. acidophilus* – NCFM pela pós-acidificação durante o armazenamento refrigerado a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Este decréscimo da viscosidade também pode estar associado à desnaturação das proteínas da soja pelo decréscimo do pH durante o armazenamento refrigerado a valores entre 4,0-4,5, próximo ao ponto isoelétrico destas proteínas (SMITH; CIRCLE, 1972).

A análise dos valores médios da contagem de células viáveis de *L. acidophilus* - NCFM para bebida probiótica saborizada com sacarose e polpa de pêssego, após 7 dias de armazenamento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, observados na Tabela 17 mostra que eles variaram de 9,24 a 11,23logUFC.mL⁻¹. Esses valores correspondem aos ensaios com 20% de polpa e 8% de sacarose e 15% de polpa e 10% de sacarose, respectivamente. A redução de células viáveis foi pequena durante os 7 dias de armazenamento ao comparar-se com as contagens de células viáveis presente após as 24 horas de adição da polpa (Tabela 7). Este resultado reveste-se de importância, tendo em vista que, além da polpa de pêssego não afetar a viabilidade do *L. acidophilus* – NCFM, o potencial probiótico permanece durante um período de 7 dias em armazenamento refrigerado a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Estudos ressaltam que contagens microbianas mais elevadas indicam a possibilidade de garantia do nível mínimo no armazenamento, atendendo aos parâmetros da legislação (OLIVEIRA, 2002; BARRETO et al, 2003). De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2002) o produto alimentício para ser considerado probiótico deve conter concentrações de 10⁶UFC.mL⁻¹ viáveis quando da aquisição

do mesmo. Tal contagem equivale a $6,0 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, o que foi plenamente contemplado neste estudo.

4.6 Avaliação sensorial da bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

A avaliação sensorial é realizada através dos órgãos dos sentidos, principalmente do gosto, olfato e tato, quando um alimento é ingerido. A complexa sensação, que resulta da interação dos sentidos, é usada para medir a qualidade do alimento em programas de controle de qualidade, onde uma equipe ou futuros consumidores podem dar respostas que indicarão a preferência do consumidor, diferenças e preferências entre as amostras, seleção do melhor processo e determinação do grau ou nível de qualidade do produto, bem como, a aceitação de um produto novo (MORAES, 1993).

O teste afetivo de preferência foi escolhido neste estudo com o objetivo de medir a atitude de preferência/escolha em relação as diferentes formulações da bebida. Os testes de preferência são normalmente comparativos, não fornecendo medida da aceitação do produto, a menos que a preferência seja manifestada em relação a um produto de aceitação conhecida (CHAVES; SPROESSER, 1993). Estes testes medem a preferência por meio de seleção, ordenação ou pontuação das amostras utilizando escalas hedônicas ou escalas de atitude (CHAVES, 1993).

Os atributos doçura, acidez, viscosidade e sabor foram avaliados na análise sensorial da bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.

Na Tabela 18 são apresentadas as médias das notas dos provadores em relação à preferência das bebidas com potencial probiótico formuladas com extrato de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêssego e sacarose, conforme planejamento experimental fatorial 2^2 .

TABELA 18. Médias do teste afetivo de preferência de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

ENSAIOS	NÍVEIS REAIS		ATRIBUTOS			
	P	S	Doçura	Acidez	Viscosidade	Sabor
1	10	8	5,50	6,46	5,92	5,96
2	20	8	5,70	6,44	6,32	6,44
3	10	12	6,00	5,40	5,44	4,86
4	20	12	6,40	5,80	5,74	6,00
5	15	10	5,98	6,00	6,12	5,68
6	15	10	6,42	7,80	6,32	6,46
7	15	10	6,28	6,52	6,26	6,52
8	7,95	10	5,60	5,68	5,54	5,42
9	22,05	10	6,32	6,12	6,46	6,14
10	15	7	4,02	4,74	5,44	4,00
11	15	13	7,78	8,02	6,98	7,28

P: % de polpa de pêssego (m/m); S: % de sacarose (m/m);

Obs.: os valores para cada atributo correspondem à média das notas de 50 provadores.

Embora tenha sido utilizada a cultivar BRS 213 cuja baixa atividade de lipoxigenases permite a obtenção de produtos de soja com sabor e aroma mais agradáveis, extratos e bebidas à base de soja apresentam ainda sabor amargo provavelmente devido à presença de saponinas e isoflavonas, o que pode afetar negativamente a aceitabilidade desses produtos. O atributo doçura é a propriedade sensorial que está associada à presença de açúcares ou agentes adoçantes (FERREIRA et al., 2000) os quais podem minimizar o amargor do extrato e a acidez resultante do processo fermentativo.

Diferentes percentagens de sacarose (8 a 12%) e polpa de pêssegos (10 a 20%) foram utilizadas neste estudo a fim de verificar a influência no atributo doçura, cuja intensidade pode ser determinante na futura aceitação da bebida.

Verifica-se que as bebidas formuladas apresentaram ao atributo doçura médias entre 4,02 e 7,78 quanto (Tabela 18), as quais correspondem, respectivamente, aos ensaios 10 e 11, com o mínimo e máximo de sacarose adicionado. Os valores próximos de 4 e 7 atribuídos correspondem,

respectivamente, a “desgostei ligeiramente” e “gostei regularmente”, indicando que o percentual de sacarose (principalmente) utilizado não foi adequado para atender preferência dos consumidores em relação à doçura.

Na Tabela 19 estão apresentados os efeitos estimados, erro puro e grau de significância para doçura da bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego.

TABELA 19. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo doçura em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	0,4050	0,1592	0,1260
Polpa (Q)	-0,2826	0,1900	0,2753
Sacarose (L)	1,6302	0,1592	0,0094
Sacarose (Q)	-0,3429	0,1900	0,2128
Polpa (L) x Sacarose (L)	0,1000	0,2248	0,6999

L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

Observa-se na Tabela 19 que a variável sacarose apresenta significância linear e positiva ($p \leq 0,10$). Este resultado indica que percentuais crescentes de sacarose, dentro da faixa estudada, promoveram o aumento da preferência da bebida em relação à doçura.

TABELA 20. Análise de variância do atributo doçura de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R ²
Regressão	5,2996	4	0,7548	0,3531	3,18	0,7219
Resíduo	2,8068	6	2,1377			
Falta de Ajuste	2,7057	7	2,5871	0,1307	9,35	
Erro Puro	0,1011	2	19,7889			
Total	8,1064	10				

SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A ANOVA da Tabela 20 demonstra que a variação dos resultados não foi explicada pela regressão. No teste F, o valor calculado foi menor que o valor

tabelado ($p \leq 0,10$), impossibilitando o estabelecimento de um modelo matemático de 2ª ordem para o atributo doçura na bebida potencialmente probiótica.

A acidez é uma propriedade sensorial de substâncias puras ou misturas que conferem sabor ácido aos alimentos (CHAVES, 1993). O gosto primário ácido é considerado o mais simples dos gostos. Segundo Chaves e Sproesser (1993), os ácidos são os estímulos ativadores de acidez, mais especificamente os íons de hidrogênio. Em geral quanto mais íons de hidrogênio, mais ácida é a solução.

Na Tabela 18 verifica-se que a bebida mais preferida quanto ao atributo acidez foi aquela do ensaio 11 com 15% de polpa de pêssgo e 13% de sacarose, apresentando média 8,02 que corresponde a “gostei muito” na escala hedônica. A bebida menos preferida quanto a este atributo apresentou média de 4,74 correspondendo a “desgostei ligeiramente” e refere-se ao ensaio 10 com incorporação de 7% de sacarose e 15% de polpa de pêssgo.

TABELA 21. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo acidez em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	0,1900	0,9264	0,8565
Sacarose (L)	-0,8500	0,9264	0,4557
Polpa (L) x Sacarose (L)	0,2100	0,9264	0,8417

L= efeito linear.

Examinando-se a Tabela 21 verifica-se que nenhuma das variáveis (polpa de pêssgo e sacarose) teve influência significativa, a 90% de probabilidade, no atributo acidez. Embora não tenha sido verificada influência significativa das variáveis independentes propostas, há de se considerar que as médias foram muito diferentes, principalmente nos ensaios em que se utilizou os extremos axiais mínimos e máximos de sacarose (7 e 13%), o que correspondeu a médias entre 4 e 8, respectivamente. Este resultado foi decorrente da doçura resultante da adição de sacarose que atenuou a acidez da bebida.

A textura dos alimentos é identificada em parte pela audição e visão, porém é mais facilmente avaliada ao toque ou na boca. A viscosidade de um líquido está associada a textura e é medida sensorialmente através das propriedades de resistência ao escoamento pela boca. De acordo com Tamine e Robinson (1991) e

Tamine (1997), as bebidas fermentadas se destacam no mercado por apresentar viscosidade inferior, ou seja, menor resistência ao escoamento na boca quando comparados com iogurtes.

A adição de outros ingredientes as bebida fermentadas como a sacarose e a polpa de frutas propostas neste estudo podem alterar este comportamento.

Na Tabela 18 verifica-se que relativamente à viscosidade, a bebida obteve médias entre 5,44 (“indiferentes”) e 6,98 (“gostei ligeiramente”), representadas pelos ensaios 10 e 11, nesta ordem, que correspondem a 15% de polpa de pêssago com 7% e 13% de sacarose, respectivamente.

TABELA 22. Efeito estimado, erro puro e grau de significância para o atributo viscosidade em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssago

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	0,3500	0,1026	0,0763
Sacarose (L)	-0,5300	0,1026	0,0355
Polpa (L) x Sacarose (L)	-0,0500	0,1026	0,6743

L= efeito linear.

Analisando a Tabela 22, observa-se que a viscosidade da bebida teve influência significativa ($p \leq 0,10$) das variáveis independentes polpa de pêssago e sacarose. O efeito observado da polpa é linear e positivo, indicando que o aumento da sua concentração de -1 para +1 (níveis codificados), que corresponde a um aumento de 10 para 20%, aumenta a preferência dos consumidores em relação a viscosidade da bebida.

A variável sacarose apresentou efeito linear negativo sobre o atributo viscosidade, o que indica que percentuais crescentes de sacarose, entre 8 e 12%, reduziram a preferência dos consumidores. Estes resultados mostram que a polpa de frutas torna a bebida potencialmente probiótica mais fluída, e a adição de sacarose, mais viscosa, como efetivamente foi verificado nas análises físico-químicas descritas anteriormente.

TABELA 23. Análise de variância do atributo viscosidade de bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	R²
Regressão	0,4034	2	4,9579	0,3333	4,32	0,6037
Resíduo	0,2689	4	14,8730			
Falta Ajuste	0,2479	2	8,0685	0,0850	9,00	
Erro Puro	0,0211	2	94,9367			
Total	0,6723	6				

SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; Fcalc= F calculado; F tab= F tabelado; R²= coeficiente de correlação.

A análise de variância (Tabela 23) evidencia que não é possível estabelecer um modelo matemático para este parâmetro como pode ser visualizado pelo valor de F calculado que se apresenta inferior a valor de F tabelado.

De acordo com Chaves (1993) e Morales (1994), o atributo sabor é a combinação de três propriedades: odor, aroma e paladar. Portanto, sua mensuração e apreciação são mais complexas que cada uma destas propriedades separadamente. A avaliação do sabor em bebida à base de extrato de soja fermentado, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêsego é importante, considerando o caráter inovador deste produto. Além disso, serve de subsídio para verificar se a fermentação do extrato de soja e subsequente saborização resulta em produto com características de sabor aceitáveis pelo consumidor.

Verifica-se na Tabela 18, que as notas médias para a preferência da bebida em relação ao sabor apresentaram-se entre 4,00 e 7,28 que correspondem, respectivamente, a “desgostei ligeiramente” e “gostei regularmente” segundo a escala hedônica utilizada neste estudo. Estas médias são referentes aos ensaios 10 (15% de polpa e 7% sacarose) e 11 (15% de polpa e 13% de sacarose).

TABELA 24. Efeito estimado, erro puro e grau de significância no atributo sabor em bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo

	EFEITO ESTIMADO	ERRO PURO	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (p)
Polpa (L)	0,8100	0,4686	0,2260
Sacarose (L)	-0,7700	0,4686	0,2421
Polpa (L) x Sacarose (L)	0,3300	0,4686	0,5543

L= efeito linear.

Na Tabela 24 verifica-se que não houve influência estatística significativa ($p \leq 0,10$) das variáveis independentes no atributo sabor. Contudo, pela diferença observada entre as notas pode-se inferir que o consumidor tem menor preferência por bebidas com reduzido teor de sacarose e maior preferência em bebidas com maiores percentagens deste ingrediente, quando se adiciona 15% de polpa de pêssgo. Este resultado era esperado visto que a sacarose e o sabor característico de produtos fermentados mascaram o sabor amargo de produtos à base de soja tão indesejáveis pelos consumidores.

Neste contexto, é possível verificar na Tabela 18 que a bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com sacarose e saborizado com polpa de pêssgo que apresentou as maiores médias para todos os atributos foi aquela representada pelo ensaio 11 (Figura 10), que corresponde a 15% de polpa de pêssgo (ponto central) e 13% de sacarose (ponto axial máximo). Este resultado indica que para os valores máximos de sacarose e intermediários de polpa de pêssgo, propostos pelo delineamento experimental aumentam a preferência dos provadores para este produto.

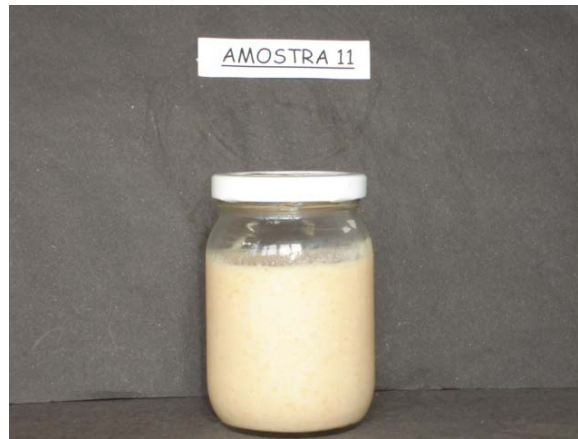


FIGURA 10. Bebida à base de extrato de soja fermentado com *L. acidophilus* – NCFM, adoçado com 13% de sacarose e saborizado com 15% de polpa de pêssego.

5 CONCLUSÕES

É possível produzir um probiótico a partir do extrato de soja, com inoculação direta de *Lactobacillus acidophilus* – NCFM, em períodos relativamente curtos (9h).

A adição de sacarose (8 a 12%) e polpa de pêssego (10 a 20%) não afeta negativamente as características físico-químicas da bebida à base de extrato de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* - NCFM, bem como o seu potencial probiótico, mantendo valores acima do preconizado pela legislação vigente mesmo após 7 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A bebida mais preferida em relação a todos os atributos sensoriais avaliados (doçura, acidez, viscosidade, sabor) correspondeu à formulação com 13% de sacarose (+ α) e 15% de polpa de pêssego (ponto central).

6 BIBLIOGRAFIA

ALTERMANN, E.; RUSSEL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B. L.; McAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.11, p.3906-3912, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). **Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: Howitz, W. 1995.

BARBOSA, E. G.; RODRIGUES, R. S.; MACHADO, M. R. G.; ROMBALDI, C. V. Influência da adição de polpa de pêssegos antes e após fermentação de extrato de soja com bactéria probiótica. 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL. **Anais do simpósio**. Cascavel: CD-ROM, 2006.

BARRANGOU, R.; ALTERMANN, E.; HUTKINS, R.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Funcional and comparative genomic analyses of an operon involved in frutooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.15, p. 8957-8962, 2003.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.120, p.119-126, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995. 299p.

BEAL, C. Combined effects of cultures conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.4, p.673-681, 1999.

BEASLEY, S; TUORILA, H.; SARIS, P. E. J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.159-162, 2003.

BEHMER M.L.Aruda;- **Tecnologia do Leite** – 13ª ed. Revisada e atualizada – São Paulo: Nobel, 1999.

BEHRENS, J. H., ROIG, S. M.; DA SILVA, M. A. P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Boletim SBCTA**, v.34, n.2, p.99-106, 2000.

BHARDWAJ, H.L. et al. Yield and quality of soymilk and tofu made from soybean genotypes grown at four locations. **Crop Science**, v.39, n.2, p.401-405, 1999.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de Lactobacilos e Bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. Campinas, 2005. 226p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

BOX, G. P.; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley & Sons, 1998. 669p.

BOX, G.E.P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation y an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report**, n.9, 1973.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia de fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V.42, n.250, p.38, 1987.

BRASIL. ANVISA/ Ministério da Saúde. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 maio, 1999.

BRASIL. ANVISA/ Ministério da Saúde. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 jan. 2002, p. 191 - 192.

CAI, T. D.; CHANG, K. C.; SHIH, M. C.; HOU, H. J.; JI, M. Comparison of bench and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean varieties. **Food Research Internacional**, v.30, n.9, p.659-668, 1997.

CHAUHAN, S. K.; JOSHI, V. K.; LAL, B. B. Apricot-soy fruit-bar: a new protein-enriched product. **Journal of Food an Technology**, v.30, n.6, p.457-458, 1993.

CHAVES, J. B. P. **Análise sensorial: histórico e desenvolvimento**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 31p.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 81p.

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.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas de grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência Agrotécnica**, v.30, n.5, p.920-929, 2006.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

COURREGELONGUE, S.; SCHILISH, P.; NOBLE, A. C. Using repeated ingestion to determine the effect of sweetness, viscosity and oilness on temporal perception of soymilk adstringency. **Food Quality and Preference**, v.10, p.273-279, 1999.

ENGARRAFADOR MODERNO. **Bebidas à base de soja buscam diferenciais para disputar mercado**. Brasil: Editora Aden, ano XVII, p.10-18, 2006.

FERREIRA, V.L.P. **Análise sensorial**: testes discriminativos e afetivos. Campinas-SP: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. 127p. (Manual: Série Qualidade).

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

FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos: revisão. **Higiene Alimentar**, v.20, n.112, p.22-33, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal Applied Bacteriology**, v.6, p.365-378, 1989.

FURTADO, A. A. L. ; OLIVEIRA, E. A. ; BORGES, S. V. ; MODESTA, R. C. D. . Efeitos da pasteurização térmica sobre as características físico-químicas e sensoriais da polpa de umbu (*Spondias Tuberosa* ARR. Câmara). XX CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2006, Curitiba. CD, 2006.

GILLILAND, S. E. Acidophilus milk products: A review of potencial benefits to consumers. **Journal Dairy Science**, v.72, n.10, p.2483-2494, 1989.

GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **Journal Dairy Science**, v.60, p.1395-1398, 1977.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, n. 64, p.12-22, 1999.

GONZALEZ, S. N., APELLA, M. C., ROMERO, N., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. & OLIVER, G. (1989) **Chem. Pharm. Bull.** 3026–3028, 1989.

GUEDES NETO, L. G.; PENNA, C. F. A. M.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R. *Lactobacillus acidophilus* e a indústria de laticínios. In: **Leite e derivados**, n.66, 2002. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br/leite>>. Acesso em: 19 dez. 2005

GUIMARÃES, O. Mais saúde no cardápio. **O Sulco**, n. 23, p.10-12, 2005.

GULARTE, M. A. **Manual de análise sensorial de alimentos**. 1.ed. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2002. 59p.

GURGEL, M. S. C. C. A., OLIVEIRA, A. J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 38-43, 1995.

HOU, J.; YU, R.; CHOU, C. Changes in some components of soymilk during fermentation with *Bifidobacteria*. **Food Research International**, v.33, p.393-397, 2000.

KIM, H. S., GILLILAND, S. E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal Dairy Science**, v.66, n.5, p.959-966, 1983.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, p.797-811, 2001.

KLAVER, F. A. M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherland Milk Dairy Journal**, v.47, p.151-164, 1993.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, tecnology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999. 532p.

LOURENS-HATTINGH, A.;VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.

MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. S.; BARBOSA, E. G.; SCHONS, P. F.; POLVORA, M. S.; PRATES, D. F.; ROMBALDI, C. V. Fermentado de soja com potencial probiótico. Qualificação de doutorado apresentado no DCTA/UFPel, 2006.

MARSHALL, R.T.; ARBUCKLE, W.S. **Ice cream**. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 349p.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCXHELL, K. D. R. **The simple soybean and your health**. New York: Avery publishing Group, 1994. 260p.

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2.ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1984. 101p.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8.ed. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1993. 93p.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja – suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1996. 259p.

MORALES, A. A. **La evaluación sensorial de los alimentos em la teoria y la práctica**. Espana: Acribia, 1994, 198p.

NAIDU, A. S.; CLEMENS, R. A. **Probiotics: Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. p.431-462.

NAHAISI, M. H. *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. **Developments in Food Microbiology**, p.153-178, 1986.

OGUNTUNDE, A. O.; AKINTOYE, O. A. Measurement and comparison of density, specific heat and viscosity of cow's milk and soymilk. **Journal of Food Engeneering**, v.13, n.3, p.221-230, 1991.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I. REMEUF, F. CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.

OLIVEIRA, M. O.; DAMIN, M. R. Efeitos dos teores de sólidos solúveis e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Anais do Congresso**. 2000.

OLIVEIRA, N. O.; SAVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, 2002.

OTT, A., HUGI, A., BAUMGARTNER, M., CHAINTREAU, A. Sensory investigation of flavour perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.441-450, 2000.

PRASAD, J.; HARSHARANJIT, G.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**. v.8, p.993-1002, 1998.

PUPIN, A. M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO. **Alimentos funcionais e biotecnologia**. Campinas, p.133-145, 2002.

REID, G., SANDERS, M. E., GASKINS, H. R., GIBSON, G. R., MERCENIER, A., RASTALL, R., ROBERFROID, M., ROWLAND, I., CHERBUT, C. & KLAENHAMMER, T. R. **Journal Clinical Gastroenterology**, p.105–118, 2003.

RODRIGUES, H. R. Manual de rotulagem. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 1999. 39p.

RODRIGUES, R. da S. **Caracterização de extratos de soja obtidos de grãos, farinha integral e isolado protéico visando a formulação e avaliação biológica**

(em coelhos) de bebida funcional à base de extrato de soja e polpa de pêssegos. Campinas, 2003. 177p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L. M. C.; CABRAL, L. C.; FARIAS, C. A. A.; DOMINGUES, A. M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **Food Control**, v.14, n.3, p.187-192, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

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.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**, v. 84, n.2, p. 319-331, 2001.

SAXELIN, M., GRENOV, B., SVENSSON, U., FONDÉN, R., RENIERO, R., MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Trends Food Science Technology**, v.10, 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.

SCHONS, P. F.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. S.; POLVORA, M. S.; PRATES, D. F.; ROMBALDI, C. V. Avaliação de bebida de soja fermentada com microorganismos probióticos, durante o armazenamento. 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL. **Anais do simpósio**. Cascavel: CD-ROM, 2006.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends Food Science Technology**, v.10, p.411-417, 1999.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and tecnologia**. Westport: The Avi, 1978. v.1, p. 470.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and tecnologia**. [S.l.]: Avi Publishing, 1972, p. 294.

SREEKUMAR, O., HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **Journal Dairy Science**, v.83, n.5, 2000.

STATÍSTICA for Window – release 50.0 A. Tulsa: Statsoft Inc., 1995.

TAMIME, A.Y. Culturas “starters” lácticas e probióticas. **Leites fermentados e bebidas lácticas: tecnologia e mercado**, ITAL, Campinas, p.2.11-2.22, 1997.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogur Ciência y Tecnología**, Zaragoza, Acribia, 1991. 368p.

TANGO, J. S.; SANTOS, L. C. dos; TURATTI, J. M.; MORI, E. E. M.; SHIROSE, I.; YOTSUYANAGI, K. Caracterização de algumas cultivares de soja para produção de extrato protéico. **Boletim do ITAL**, v.21, n.2, p.157-182, 1984.

TASHIMA, E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (Glicina Max L. Merrill) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 409-428, 2003.

TEJADA-SIMON, M. V.; LEE, J. H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Ingestion of yogurt containing *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **Journal Dairy Science**, v.82, p.649-680, 1999.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p.393-400, 2005.

TOMELIN, B.; PEPLAU, P. *Lactobacillus*: características, processos de fermentação e seus produtos. **Leite e derivados**, n. 84, 2005. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br/leite>> Acesso em: 25 jan. 2005.

TRINDADE, C.S.F.; CASCARDO SILVA, F.; FREITAS, S.; COURY, S. Comportamiento reológico de los yogurts de soya homogenizados y no homogenizados. **Alimentaria**, p.69-73, 1997.

TURATTI, J. M.; SALLES, A. M.; SANTOS, L. C. dos; MORI, E. E. M.; FIGUEIREDO, I. B. Estudos preliminares com cultivares de soja para produção de leite. **Boletim do ITAL**, v.16, n.3, p.289-305, 1979.

VALIM, M. F.; ROSSI, E. A.; SILVA, R. S. F.; BORSATO, D. Sensory acceptance of a functional beverage base don orange juice and soymilk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.2, p.153-156, 2003.

WANG, S.H.; MARINHO, C. S.; CARVALHO, E. P. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.10, p.1539-1601, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreporty_en.pdf>. Acesso em: 23 de agosto de 2005.

YANES, M.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behaviour and sensory properties of milk beverages model systems. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.605-611, 2002.