



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DO RIO DE JANEIRO**

**Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Campus Rio de Janeiro

Muriel da Silva Carneiro

**PROCESSAMENTO DE BEBIDAS DE SOJA OBTIDAS A PARTIR  
DO GRÃO, DA FARINHA E DO EXTRATO EM PÓ E  
FERMENTADAS POR PROBIÓTICOS**

Rio de Janeiro, 2015.

Muriel da Silva Carneiro

**PROCESSAMENTO DE BEBIDAS DE SOJA OBTIDAS A PARTIR  
DO GRÃO, DA FARINHA E DO EXTRATO EM PÓ E  
FERMENTADAS POR PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique de Miranda Walter

Rio de Janeiro-RJ, 2015.

Dedico este trabalho a todos que acreditaram no meu sonho, que me apoiaram durante a caminhada dos anos do mestrado, me dando forças para que eu conseguisse atingir meus objetivos.

Em especial aos meus pais Jorge e Marilsa, meus grandes incentivadores e que se sentem orgulhosos por mais essa vitória.  
Aos meus amigos e familiares por entenderem a minha ausência durante esse tempo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia que me proporcionou um ensino de qualidade e gratuito.

A EMPRABA-CTAA pelo auxílio na realização das análises, pela sabedoria e convívio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Walter e pela paciência, tolerância e orientação.

A Prof<sup>ª</sup>. Márcia Cristina Silva por toda ajuda, incentivo e frases amigas.

A todos os professores do Curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?

Só levo a certeza de que muito pouco eu sei

Nada sei.

(Tocando em Frente) Almir Sater

CARNEIRO, MS. Processamento de bebidas de soja obtidas a partir do grão, da farinha e do extrato em pó e fermentadas por probióticos. 58f. (Dissertação). Programa de Pós Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

## RESUMO

As bebidas probióticas fermentadas à base de soja são uma opção disponibilizada para o mercado de bebidas lácteas, sucos e outros alimentos líquidos. Para a indústria de alimentos atender ao desafio da demanda de novos produtos a simplificação tecnológica do processo produtivo é um dos fatores facilitadores a inserção de mercado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação de processo para fermentação, por bactérias probióticas, de bases líquidas de soja obtidas a partir do grão, da farinha e do extrato em pó, de modo a dispor de tecnologia para produção industrial da bebida com diferentes matérias-primas. As bases líquidas foram submetidas ao mesmo processo base de formulação com sacarose, fosfato tricálcico e sorbato de potássio dispersos em água. Em seguida as bebidas de soja foram pasteurizadas a 70°C/2min e resfriadas a 42°C, para fermentação até pH final de 4,9 a 4,8 por *Bifidobacterium animalis* e por *Lactobacillus acidophilus*. No final do processo, as bebidas fermentadas foram resfriadas, embaladas em garrafas plásticas e estocadas a 8°C. As bactérias probióticas apresentaram potencial fermentativo nas três bases líquidas estudadas e as bebidas finais atenderam à legislação brasileira que estabelece a concentração mínima de 8 log UFC por porção (100mL da bebida) durante pelo menos 45 dias de estocagem refrigerada a 8°C. Assim, foi comprovada a adequação do processo para as três matérias-primas, que com este Mestrado Profissional passou a ser uma tecnologia conjunto Embrapa e IFRJ para a sociedade brasileira.

**Palavras-Chave:** Bebida de soja. Extrato de soja em pó. Farinha de soja. Probióticos.

CARNEIRO, MS. Processamento de bebidas de soja obtidas a partir do grão, da farinha e do extrato em pó e fermentadas por probióticos. 58f. (Dissertação). Programa de Pós Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

## ABSTRACT

Soy based beverages fermented probiotic are an available option for the consumer market of dairy beverages, juices and others liquid foods. For the food industry meets the challenge of the demand for new products the technological simplification of the production processes is a factor to facilitate the market insertion. The objective of this study was to evaluate the adequacy of the fermentation process by probiotic bacteria of liquid foundations derived from soy grain, flour and powdered extract, in order to dispose a technology to the industrial production of beverages with different raw materials. Liquid bases were subjected to the same process and formulated with sucrose, tricalcium phosphate and potassium sorbate dispersed in water. Then the soy beverages were pasteurized at 70°C/2 min and cooled to 42°C for fermentation by *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* to final pH of 4,9 to 4.8. At the end of the process the fermented beverages were cooled, packed in plastic bottles, and stored at 8°C. Probiotic bacteria showed fermentation potential for the three studied soy formulations and the final beverages attended the Brazilian legislation. It was established the minimum concentration of 8 log CFU per serving (100 ml of the beverage) for at least 45 days in refrigerated storage at 8°C. Thus, it was proven the adequacy of the process for the three raw materials, that with this Professional Master became a joint technology work of Embrapa and IFRJ to the Brazilian society.

**Keywords:** Soy beverage. Probiotics. Types of soy.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1	Produção mundial de soja – safra 2015/2016.	7
Figura 2	Distribuição espacial da sojicultura brasileira	8
Figura 3	Fluxograma de processo das bebidas de soja fermentadas com probióticos	17



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção agrícola brasileira safra 2015 (em tonelada).	7
Tabela 2	Composição centesimal das matérias primas (base úmida, em g/100g).	22
Tabela 3	Viabilidade de bactérias probióticas (log UFC/mL) nas três bebidas de soja fermentadas durante a estocagem refrigerada a 8° C.	25
Tabela 4	Enumeração de bolores e leveduras (log UFC/mL) nas três bebidas de soja fermentadas durante a estocagem refrigerada a 8° C.	27
Tabela 5	Valores de pH e acidez das bebidas de soja antes fermentação e após fermentação com bactérias probiótica, durante a estocagem refrigerada a 8 °C.	28
Tabela 6	Composição centesimal das bebidas de soja fermentadas com probióticos (base úmida, em g/100g).	30
Tabela 7	Tempo de fermentação das bebidas de soja fermentadas com probióticos (em horas).	31

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA	3
3	OBJETIVO	5
3.1	OBJETIVO GERAL	5
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4	REVISÃO DE LITERATURA	6
4.1	BREVE HISTÓRICO DA SOJA	6
4.2	PRODUÇÃO MUNDIAL DE SOJA	6
4.3	COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS	8
4.4	SOJA COMO ALIMENTO FUNCIONAL	9
4.5	PROBIÓTICO	10
4.6	PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS FERMENTADOS	13
5	MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1	MATERIAL	16
5.2	MÉTODO	16
5.2.1	Preparação das bases líquidas de soja	16
5.2.2	Produção das bebidas de soja fermentadas com probióticos	18
5.2.3	Análises físico-químicas	19
5.2.3.1	pH	19
5.2.3.2	Acidez total	20
5.2.3.3	Composição centesimal	20
5.2.4	Análises microbiológicas	20
5.2.4.1	Viabilidade dos microrganismos probióticos	21
5.2.4.2	Qualidade higiênico-sanitária	21
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1	AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	22
6.2	VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NAS BEBIDAS DE SOJA FERMENTADAS	24
6.3	AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA	26
6.4	AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DAS BEBIDAS DE SOJA COM PROBIÓTICOS	27

6.5	CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	29
6.6	TEMPO DE FERMENTAÇÃO	31
7	CONCLUSÃO	32
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	33
9	ANEXOS	42

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade vive em um ritmo cada vez mais acelerado e, devido às mudanças dos hábitos alimentares e do estilo de vida, surgem diferentes problemas de saúde e doenças. Dessa forma, os alimentos saudáveis com propriedades funcionais são uma excelente alternativa para melhorar a qualidade de vida, o bem-estar e prevenir doenças. Neste contexto, observa-se um número crescente de pessoas em busca de uma alimentação saudável, de alimentos funcionais, com elevada concentração de fibras, com teores reduzidos de gorduras e de açúcares (SAAD *et al.*, 2013).

Os alimentos funcionais caracterizam-se por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas não degenerativas, como câncer e diabetes, dentre outras (BRASIL, 2008; SAAD *et al.*, 2013).

Internacionalmente, utiliza-se a definição de que probióticos: são microrganismos vivos, que administrados em quantidades suficientes, conferem benefícios à microbiota intestinal humana (SANDERS, 2009). As principais bactérias consideradas benéficas a flora intestinal mais utilizadas pela indústria são as espécies de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium animalis*. Para que haja um efeito clínico considerado probiótico, a quantidade mínima viável deve estar situada na faixa de 8 a 9 log UFC/mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo (CHARTERIS, 1998 *apud* MANZONI *et al.*, 2008; BRASIL, 2008).

O papel cada vez mais influente da indústria de alimentos sobre a dieta e estilo de vida da população vem acompanhado do desafio de atender a demanda dos consumidores por produtos que sejam saborosos, visualmente atrativos e que, ao mesmo tempo, visem à saúde e o bem-estar (SAAD *et al.*, 2011). As bebidas vegetais são uma alternativa aos produtos lácteos, estão entre os itens que mais crescem no segmento de não alcoólicos. A demanda por bebidas a base de soja, castanhas, grãos, sementes e outros cereais cresce em todas as regiões do globo. Seja por adesão aos produtos saudáveis ou por intolerância à lactose, o certo é que cada vez mais consumidores são atraídos pelos produtos fabricados com vegetais (PARRA, 2015). O extrato de soja tem sido usado como meio de cultura para o crescimento de bactérias ácido-lácticas, além do desenvolvimento de produtos fermentados como o queijo (tofu) e o iogurte de soja (GARRO *et al.*, 2004).

Os desafios no preparo de uma bebida probiótica fermentada à base de soja estão baseados em três aspectos principais: 1) a capacidade das bactérias crescerem e atingirem população mínima compatível com produto probiótico; 2) manter a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento refrigerado do produto, bem como haver prevalência no trato digestivo do consumidor; e, 3) ser um produto com boa aceitabilidade sensorial (MACHADO, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

Perante as demandas dos consumidores e um cenário agroindustrial competitivo, é necessário inovar e criar condições para que essas iniciativas sejam incentivadas e implementadas, em especial nas empresas de menor porte. A estas, a formação de bases sólidas de conhecimento, bem como a estruturação de redes de colaboração e inovação, torna-se fundamental para a própria permanência no mercado (FIESP; ITAL, 2010).

No Brasil, o consumo de soja, na forma natural, ainda é restrito, devido, dentre outros fatores, ao seu sabor, considerado desagradável ao paladar da maioria das pessoas. Por se tratar de uma fonte protéica de alta qualidade e de baixo custo, além de conter compostos bioativos como as isoflavonas, a indústria de alimentos vem progressivamente disponibilizando produtos da soja. Entre esses produtos destacam-se o extrato aquoso de soja, puro e formulado com outras bebidas de frutas e aromas, bem como as bebidas fermentadas de soja.

As bebidas de soja são consumidas por pessoas de todas as idades, principalmente crianças com baixa tolerância ao leite de origem animal, mulheres que querem prevenir sintomas da menopausa e consumidores em busca de uma alimentação saudável. A fermentação, por ser uma técnica simples, de baixo custo e conhecida principalmente por melhorar as características sensoriais e nutricionais dos alimentos, é uma opção tecnológica vantajosa para aumentar o consumo de soja no Brasil e países onde a oleaginosa não faz parte da dieta tradicional da população.

A bebida fermentada de soja com probióticos, enfoque principal deste projeto, foi desenvolvida a partir de conhecimentos e experiência de pesquisadores e colaboradores da Embrapa Agroindústria de Alimentos e que originaram uma bebida fermentada de soja, através de dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (TRINDADE, 1996). Esse desenvolvimento também possibilitou à Embrapa Agroindústria de Alimentos participar, como Instituto de pesquisa parceiro da empresa Ecobrás Centro Ecobiótico do Brasil Ltda., no primeiro edital do programa Rio Inovação da FAPERJ. A transferência da tecnologia de produção da bebida fermentada de soja da Embrapa para a Ecobras contribuiu no desenvolvimento de uma linha de produtos com a marca comercial Yosoy.

Na presente pesquisa, uma bebida de soja produzida de acordo com processo da Embrapa (FELBERG *et al.*, 2009), bem como formulações elaboradas a partir de farinha de

soja e de extrato de soja em pó comerciais, amplamente disponíveis no mercado, foram submetidas ao processo tecnológico de fermentação por bactérias probióticas também desenvolvido na Embrapa (WALTER, 2014).

Assim, este trabalho vem ao resgate e ampliação da importância de uma tecnologia desenvolvida pela Embrapa e instituições parceiras, neste caso específico do Instituto Federal do Rio de Janeiro, contando também com o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Monsanto, bem como parceria com a empresa de consultoria e projetos agroindústrias Gestão Láctea para que seja possível transformar pesquisa em produto industrial.

Os trabalhos desenvolvidos neste Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Rio de Janeiro estão alinhados com a Embrapa, especificamente: (i) ao documento “Visão 2014 – 2034: O futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira” (EMBRAPA, 2014), especialmente ao “Macrotema 7: Segurança dos alimentos, nutrição e saúde”; (ii) às prioridades do portfólio “Alimentos, nutrição e saúde”; (iii) à agenda de prioridades da Embrapa Agroindústria de Alimentos, no tema “Qualidade de Alimentos”; e (iv) ao projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de bebidas fermentadas de soja com funcionalidade probiótica”, edital de chamada 07/2012 - Convênio Embrapa/Monsanto.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a adequação de processo de fermentação, por bactérias probióticas, de bases líquidas de soja obtidas a partir do grão, da farinha e do extrato em pó, de modo a dispor de tecnologia para produção industrial da bebida com diferentes matérias-primas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Elaborar bebidas de soja fermentadas com *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* BI-05 e *Lactobacillus acidophilus* La-14.
- 3.2.2 Determinar a concentração das bactérias probióticas durante a estocagem refrigerada das bebidas.
- 3.2.3 Estudar a composição centesimal e a estabilidade físico-química das bebidas de soja fermentadas com probióticos durante a estocagem.
- 3.2.4 Estabelecer o período de conservação das bebidas de soja fermentadas com probióticos.



## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 BREVE HISTÓRICO DA SOJA

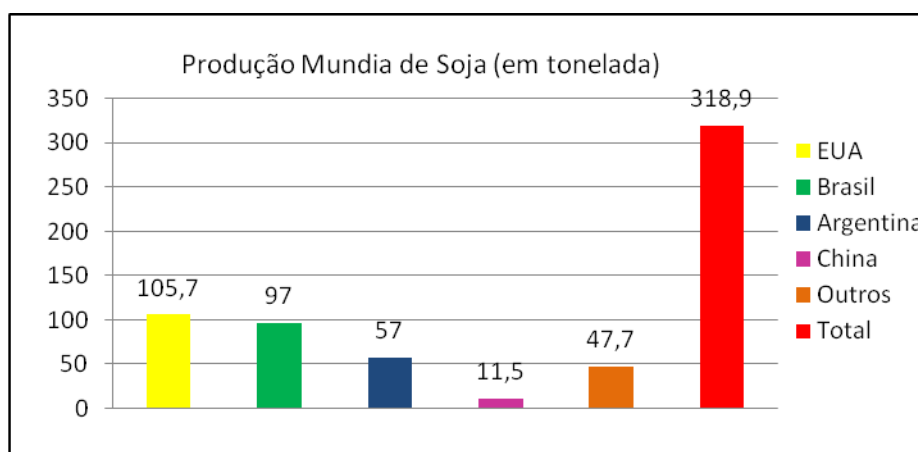
Originária da Ásia, a soja (*Glicinemax (L.) Merril*) tem as primeiras citações sobre o grão a partir período entre 2883 e 2838 a.C, quando a soja era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milho. Um dos primeiros registros do grão está no livro "Pen Ts'ao Kong Mu", que descrevia as plantas da China ao Imperador Sheng-Nung. Para alguns autores, as referências à soja são ainda mais antigas, remetendo ao "Livro de Odes", publicado em chinês arcaico (EMBRAPA SOJA, 2015).

Através dos Estados Unidos (EUA), em 1882, a soja é trazida para o Brasil, porém o primeiro registro de cultivo no país data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Mas foi somente a partir dos anos 40 que ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS: área cultivada de 640 ha, produção de 450 toneladas e rendimento de 700 kg/ha. Nesse mesmo ano instalou-se a primeira indústria processadora de soja do país (Santa Rosa, RS) e, em 1949, com produção de 25.000 toneladas, o Brasil figurou pela primeira vez como produtor de soja nas estatísticas internacionais (EMBRAPA SOJA, 2015).

### 4.2 PRODUÇÃO MUNDIAL DE SOJA

A soja faz parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial. É o quarto grão mais consumido e produzido globalmente, atrás de milho, trigo e arroz, além de ser a principal oleaginosa cultivada anualmente no mundo (HIRAKURI, 2014).

O United States Department of Agriculture (USDA) estima que produção global da soja, para a safra 2015/16, alcance um novo recorde de 318,9 milhões de toneladas (FIESP, 2015). O maior produtor mundial de soja são os EUA, seguido do Brasil e Argentina, onde juntos produzem cerca de 81% dos grãos consumidos, conforme mostra a figura 1.



Fonte: Safra Mundial de Soja 2015/16, FIESP, 2015.

Figura 1 Produção mundial de soja – safra 2015/2016.

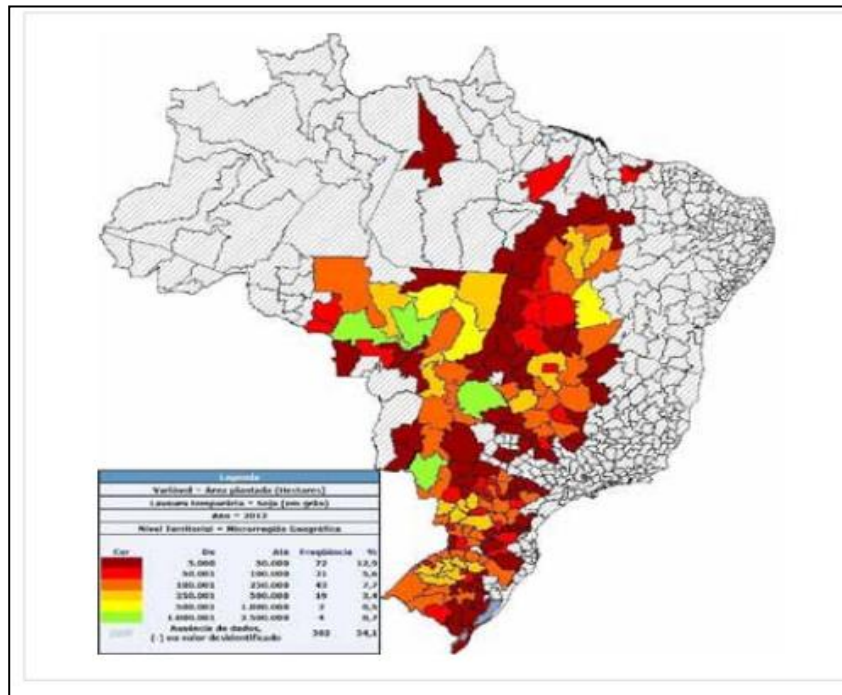
No Brasil, a soja é a segunda maior cultura agrícola brasileira, ficando apenas atrás da cana-de-açúcar e também foi que mais cresceu nas últimas três décadas, conforme mostra a tabela 1. Atualmente, estima-se que a produção corresponda entre 49% a 52,9% da área plantada em grãos do país (HIRAKURI, 2014).

Tabela 1. Produção agrícola brasileira - safra 2015 (em tonelada).

Cana de Açúcar	678.298,39
Soja	96.442,52
Milho	80.322,20
Laranja	13.809,68
Arroz	12.390,74

Fonte: IBGE, 2015.

Cultivada especialmente nas regiões Centro Oeste e Sul do país, conforme mostra figura 2, a soja se firmou como um dos produtos mais destacados da agricultura nacional e na balança comercial.



Fonte: HIRAKURI, 2014.

Figura 2. Distribuição espacial da sojicultura brasileira.

#### 4.3 COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

A soja tem recebido uma grande atenção da comunidade científica, principalmente devido ao seu perfil de nutrientes. Ela possui carboidratos complexos, proteínas, fibras solúveis e insolúveis, oligossacarídeos e fitoquímicos. É frequentemente descrita como uma fonte rica em proteínas já que sua composição apresenta uma média de 30 a 45% de proteínas, 20 a 25% de carboidratos e 15 a 25% de lipídios. Contém ainda minerais como o ferro, zinco, magnésio, potássio, cálcio, manganês e selênio, e vitaminas como o retinol, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido fólico (DALEPRANE, 2007).

Conceitualmente, a farinha de soja é o produto obtido pela moagem do grão de soja previamente descascado e parcialmente desengordurado (BRASIL, 1978), porém tecnicamente ela é um subproduto obtido através da extração do óleo do grão da soja. As principais etapas de produção da farinha de soja consistem em: separação das cascas, extração, dessolventização, secagem, moagem. As cascas são retiradas visando facilitar a performance de extração do óleo dos grãos. A qualidade de extração é indispensável para manter as características essenciais da soja. A massa resultante da separação do óleo da soja segue para o dessolventizador e tostador que tem por finalidade eliminar todo o hexano

absorvido pelo farelo. A dessolventização possui diversos estágios com aquecimento indiretos e um direto com vapor d'água, até que por fim a farinha chegue a etapa de secagem. Depois desta etapa do processo define-se o tipo de produto que será produzido, ou seja, farelo de soja para consumo animal ou as farinhas que servirão de base protéica para a fabricação de diferentes produtos para a alimentação humana (MARSON, 2010).

O extrato de soja é o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação de grãos de soja, uma emulsão do tipo óleo em água com a fase contínua constituída por uma dispersão de proteínas complexas. O grão de soja é submetido a processamento tecnológico que consiste em tratamento do produto por calor após maceração e moagem dos grãos de soja em água, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (CRUZ et al., 2009; @limentus, 2015). As principais etapas de produção do extrato de soja consistem em: descascamento, maceração e extração. Inicialmente, ocorre a retirada da casca de soja visando à melhora do sabor do extrato hidrossolúvel (devido à eliminação dos compostos adstringentes da casca). Em seguida o grão é levado à maceração, onde absorve água. Durante essa etapa, se for utilizado calor pode haver a inativação das enzimas lipoxigenases e assim a eliminação do sabor desagradável, amargo e adstringente característico dos extratos de soja. Através da desintegração do grão (moagem/trituração) e adição de água quente é realizado o processo de extração de proteínas. Pode ocorrer também a retirada de fibras após a trituração (@limentus, 2015).

#### 4.4 SOJA COMO ALIMENTO FUNCIONAL

Os alimentos funcionais possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (ROBERFROID, 2007).

Com o aumento acentuado da prevalência de doenças cardiovasculares e tumores no século XX, houve interesse em estudar as populações onde a prevalência dessas enfermidades é baixa. Estes estudos indicaram que hábitos de vida, incluindo os alimentares, eram fatores de proteção, aliados à herança genética (AMARAL, 2006). Estudos epidemiológicos têm mostrado que fraturas por osteoporose, doenças cardiovasculares, sintomas pós-menopausa e alguns tipos de câncer tem menor incidência em asiáticos quando comparados às suas

contrapartes ocidentais. A fratura do quadril, por exemplo, é 50 - 60% menos freqüente entre mulheres asiáticas do que em ocidentais (ROUDSARI *et al.*, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária classifica a proteína de soja como alimento funcional em sua lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais. Recomenda o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja para ajudar a reduzir o colesterol, associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. (BRASIL, 2008).

O consumo de alimentos derivados da soja é vantajoso por várias razões: além de ser uma fonte de proteína de alta qualidade, é também rico em vários compostos de ação biológica. Esses compostos vêm sendo descobertos por pesquisadores colocando a soja entre os alimentos mais importantes do milênio, por terem atuação na preservação da saúde humana. Entre esses compostos podemos citar: as saponinas, os fitoesteróis, os fitatos, os inibidores de protease, ácido fenólico, açúcares complexos, ácidos graxos ômega-3, lecitina, boro, vitamina E (tocoferol), ácido fólico e os isoflavonóides (PAXTON, 1998). Os alimentos a base de soja também podem conter oligossacarídeos, tais como rafinose e estaquiose, que podem apresentar função prebiótica, ou seja, promover o desenvolvimento dos probióticos no intestino (DONKOR *et al.*, 2007).

#### 4.5 PROBIÓTICO

O conceito de probiótico é bem antigo, no início da década de 1950, pesquisas já abordavam o uso de probióticos, no emprego da restauração da saúde de indivíduos desnutridos (KOLLATH, 1953). O termo probiótico deriva do grego e significa pró-vida, sendo o antônimo de antibiótico, que significa contra a vida. Inicialmente, probiótico foi definido como: “organismos vivos que quando ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal do hospedeiro” (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004). Atualmente, a legislação brasileira define probiótico como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002).

Para o microrganismo ser denominado probiótico deve apresentar: tolerância à acidez, ao suco gástrico e bile, sendo capazes de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal; aderir à mucosa intestinal humana; produzir substâncias antimicrobianas, com concomitante inibição

de patógenos, ou seja, efeito imunomodulador; propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (GOMES e MALCATA, 1999).

A viabilidade e a atividade metabólica desses microrganismos benéficos devem ser mantidas durante todas as fases e operações do processamento do alimento, desde a elaboração até a sua ingestão pelo consumidor, sendo também capaz de sobreviver no trato gastrointestinal (SANZ, 2007). Para o alimento seja considerado probiótico, a quantidade mínima viável de microrganismos, deve estar situada na faixa de 8 a 9 log UFC/mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo (CHARTERIS, 1998 apud MANZONI *et al.*, 2008; BRASIL, 2008).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002).

A ingestão de alimentos contendo probióticos proporciona melhoria dos movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes; o equilíbrio da flora intestinal; a prevenção e/ou controle das 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 e a redução de inflamações (SAAD, 2006).

Comercialmente, as bactérias mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ressaltando-se que a seleção dessas bactérias possui como base os seguintes critérios: a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Entre os requisitos, inclui-se, ainda, a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não estar associada a outras doenças, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

As bifidobactérias são caracterizadas por serem microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, anaeróbios estritos com morfologia celular variável (GOMES e MALCATA, 1999). No entanto, toleram concentrações de oxigênio moderadamente altas, têm metabolismo fermentativo e resistem de forma satisfatória aos

valores de pH ácido, por estas razões, são as mais usadas em produtos fermentados probióticos (MARGOLLES *et al.*, 2011).

As *Bifidobacterium animalis* são conhecidas por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitamina B, inibirem a multiplicação de patógenos, reduzirem a concentração de amônia e colesterol no sangue e ajudarem a restabelecer a microbiota normal após tratamento com antibiótico (KOMATSU *et al.*, 2008).

Os *Lactobacillus* são caracterizados geralmente como gram-positivos, não formadores de esporos e podem ser aerotolerantes ou anaeróbios restritos (O’SULLIVAN, 2006). São indicados por promover inúmeros benefícios à saúde, incluindo efeitos antimicrobianos contra patógenos, antitumorais, anticolesterol, imunomodulação, anti-diabetes, tratamento contra a diarreia e intolerância à lactose, por sintetizarem ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (SAZAWAL *et al.*, 2006; NAGPAL *et al.*, 2010). Quando comparado a outras espécies probióticas a capacidade do *Lactobacillus acidophilus* em tolerar baixas concentrações de oxigênio e resistir ao pH de leite fermentado (pH 4,6) contribuem para sua utilização na produção de leite fermentado (GOMES e MALCATA, 1999).

Em função de seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, essas bactérias apresentam um grande interesse do ponto de vista industrial, pois estão envolvidas no desenvolvimento de uma classe de produtos com um grande potencial de mercado na indústria de alimentos nacional e internacional - os probióticos, prebióticos e simbióticos (BARRETO, 2003). 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). As bactérias probióticas utilizadas na produção em escala industrial e de processamento devem ser apropriadas para cada tipo de produto e manter-se com boa viabilidade durante o armazenamento. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos. Conseqüentemente, em alimentos fermentados, o pH tende a ser bastante reduzido e o desempenho desses microorganismos é baixo. Por esse motivo, os produtos com menor vida de prateleira, como o iogurte e leites fermentados, são os mais comumente utilizados como veículos de probióticos. (STANTON *et al.*, 1998).

#### 4.6 PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS FERMENTADOS

De acordo com Brasil (2007), “leites fermentados são os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microorganismos específicos”.

A produção dos leites fermentados segue quase sempre as mesmas etapas que podem ser resumidas em: escolha da matéria-prima, tratamento térmico, resfriamento, inoculação, interrupção da fermentação e armazenamento (SILVA, 1978).

Leites fermentados têm se constituído em importantes componentes da dieta do homem devido não somente às suas características tecnológicas e sensoriais, mas também, às suas propriedades nutricionais e terapêuticas (SCUTTI e ROSSI, 1996). Os benefícios adicionais associados ao consumo de leites fermentados contendo bactérias bífidas e lactobacilos incluem modulação da intolerância à lactose, redução de constipação intestinal em idosos, redução das diarreias e diminuição da absorção de amônia por indivíduos acometidos de encefalopatia portal sistêmica (FERREIRA, 1997).

A procura de alternativas ao iogurte produzido com leite de vaca está crescendo devido a alguns problemas de alergenicidade às proteínas do leite, ao interesse por alimentos vegetarianos, à introdução de derivados de soja na dieta ocidental, entre outros (FERRAGUT *et al.*, 2009).

A fermentação com culturas lácticas representa uma das alternativas tecnológicas de transformação do extrato de soja, o qual tem se mostrado substrato adequado para o crescimento e atividade dessas bactérias devido aos oligossacarídeos, aminoácidos e peptídeos presentes no grão que estimulam o crescimento microbiano (MACHADO, 2007). Além disso, por ser uma técnica simples, de baixo custo e conhecida principalmente por melhorar as características sensoriais e nutricionais dos alimentos, é uma solução para aumentar o consumo do extrato de soja no Brasil (COURI *et al.*, 2006).

A fermentação é um método de preservação largamente utilizado desde os primórdios da civilização, pela ausência de métodos de refrigeração ou pasteurização. Historicamente, o processo de fermentação envolvia a coagulação do leite por microorganismos presentes no meio, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria-prima (ALM *apud* ROBINSON, 1991). Estima-se que a prática de fermentação começou a ser utilizada pelo homem há cerca de 10 mil anos. Provavelmente, a



descoberta dessa técnica tenha sido ao acaso, onde povos nômades ao transportarem o leite em estômago de animais perceberam que ocorriam mudanças neste alimento e que estas mudanças aumentavam o tempo de conservação do produto (TAMIME e ROBINSON, 1999). Conceitualmente, define-se fermentação como um processo que utiliza o crescimento controlado de microrganismos selecionados, capazes de modificar sua textura, sabor e aroma, como também suas propriedades nutricionais.

A fermentação láctica é largamente utilizada na preservação dos alimentos. Bactérias ácido-láticas são talvez os microrganismos desejáveis mais difundidos em alimentos fermentados, encontrados em produtos de cereais fermentados, leites, queijos e carnes fermentadas. As bactérias produtoras de ácido láctico convertem o carboidrato disponível para ácido láctico, assim baixando o pH e, se a fermentação for prolongada, mudam o meio para um mais adequado para o crescimento (AQUARONE, 2001). Na fermentação de produtos pouco ácidos como leite e carnes, realizada com objetivo de aumentar a concentração de microrganismos fermentadores, para reduzir o tempo de fermentação e inibir o crescimento de patógenos e deterioradores, adiciona-se uma determinada quantidade de microrganismos selecionados, com o objetivo de iniciar a fermentação; essa cultura de microrganismos é conhecida como "cultura *starter*".

Ao contrário do que se pensa, a aplicação de barreiras ou obstáculos como método de conservação é um conceito antigo, utilizado desde o Egito antigo, no processo de mumificação, onde eram combinados a redução da atividade da água, aumento do pH e uso de conservantes obtidos de plantas aromáticas e especiarias (LEISTNER e GOULD, 2002).

O estudo das interações entre os fatores intrínsecos (características do alimento) e extrínsecos (ambiente em que o alimento se encontra) que interferem na capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos nos alimentos originou o conceito dos obstáculos de Leistner que, em inglês, é conhecido como "*hurdle theory*" (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A teoria de obstáculos de Leistner é baseada na interação entre as diferentes tecnologias de conservação ou barreiras que conjuntamente, fazem com que os alimentos se tornem microbiologicamente estáveis, mantenham sua qualidade sensorial e nutritiva e possam cumprir seu papel econômico. Assim, para cada alimento, há um conjunto de obstáculos integrados a seu processamento que devem manter os microrganismos sob controle, impedindo-os de ultrapassar essas barreiras, para que o alimento não sofra deterioração ou cause danos à saúde do consumidor. Por exemplo, na fabricação de iogurtes,

as tecnologias utilizadas são a acidificação, mediante a adição de microrganismos úteis, e a refrigeração. O número de obstáculos para a preservação dos alimentos e a tecnologia de obstáculos constituirá a chave para a conservação de alimentos no futuro (CARDOSO, 2011).

A segurança de alimentos está relacionada à possibilidade de sua contaminação física, química ou biológica, provocando as doenças transmitidas por alimentos (DTA). A produção de alimentos inócuos exige a implantação de práticas que garantam a qualidade higiênico-sanitária dos produtos.

A adoção das boas práticas de fabricação representa uma importante ferramenta para o alcance de níveis adequados de segurança alimentar, contribuindo significativamente para a garantia da qualidade do produto final (COURI *et al.*, 2006).

As boas práticas de fabricação (BPF) são atos de higiene que devem ser adotadas pelas indústrias de alimentos e obedecidas pelos manipuladores desde a aquisição das matérias-primas, durante o processamento, até o consumidor. O objetivo das BPF é evitar a ocorrência de doenças provocadas pelo consumo de alimentos contaminados.

Silva Junior (2007) define boas práticas de fabricação como normas de procedimentos para atingir um determinado padrão de identidade e qualidade de um produto e/ou serviço na área de alimentos, cuja eficácia e efetividade devem ser avaliadas através de inspeção e/ou investigação.

Um programa de boas práticas contempla os mais diversos aspectos da indústria, que vão desde a qualidade da matéria-prima e dos ingredientes, incluindo a especificação de produtos e a seleção de fornecedores, a qualidade da água, bem como o registro em formulários adequados de todos os procedimentos da empresa, até as recomendações de construção das instalações e de higiene. Além da redução de riscos, as BPF possibilitam um ambiente de trabalho mais eficiente, otimizando todo o processo de produção (COURI *et al.*, 2006).

As empresas estão buscando a implantação das boas práticas de fabricação, devido à competitividade, melhoria contínua, exigência do mercado consumidor e, principalmente, à segurança alimentar dos seus produtos, por meio do desenvolvimento de sistemas de gestão e controle de qualidade e treinamentos dos colaboradores, criando, assim, um diferencial na área da indústria (SILVA e CORREIA, 2009).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

As bebidas foram elaboradas em Planta Piloto de Processamento de Alimentos e analisadas nos Laboratórios de Cromatografia Líquida, Físico-Química e Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

### 5.1 MATERIAL

As bebidas de soja foram preparadas com três tipos de matérias-primas: i) grãos de soja da variedade BRS – 232 (GS); ii) extrato de soja em pó; iii) farinha de soja. O grão empregado na produção da farinha de soja também era da variedade BRS – 232, enquanto a variedade do grão empregado na produção extrato de soja em pó era desconhecido.

Os aditivos utilizados na formulação das bebidas incluem: sacarose (Camil Alimentos, Araquari - SC), fosfato tricálcico (Granotec do Brasil S.A., Curitiba - PR) e sorbato de potássio (Tate & Lyle Gemacom Tech Ind. e Com. S.A., Juiz de Fora - MG).

Os fermentos probióticos empregados foram os seguintes: *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* BB-12 (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda., Valinhos - SP) e *Lactobacillus acidophilus* La-14 (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda., Valinhos - SP). Os fermentos foram adquiridos na forma liofilizada, em sacos laminados, e armazenados em congelador até o momento de uso.

### 5.2 MÉTODO

#### 5.2.1 Preparação das bases líquidas de soja

As três bases líquidas foram produzidas a partir dos seguintes processos, conforme Figura 3: base líquida obtida pelo processamento do grão em extrato de soja líquido (ESL); base líquida obtida a partir da farinha de soja (FS) e base líquida obtida do extrato de soja em pó (ESP).

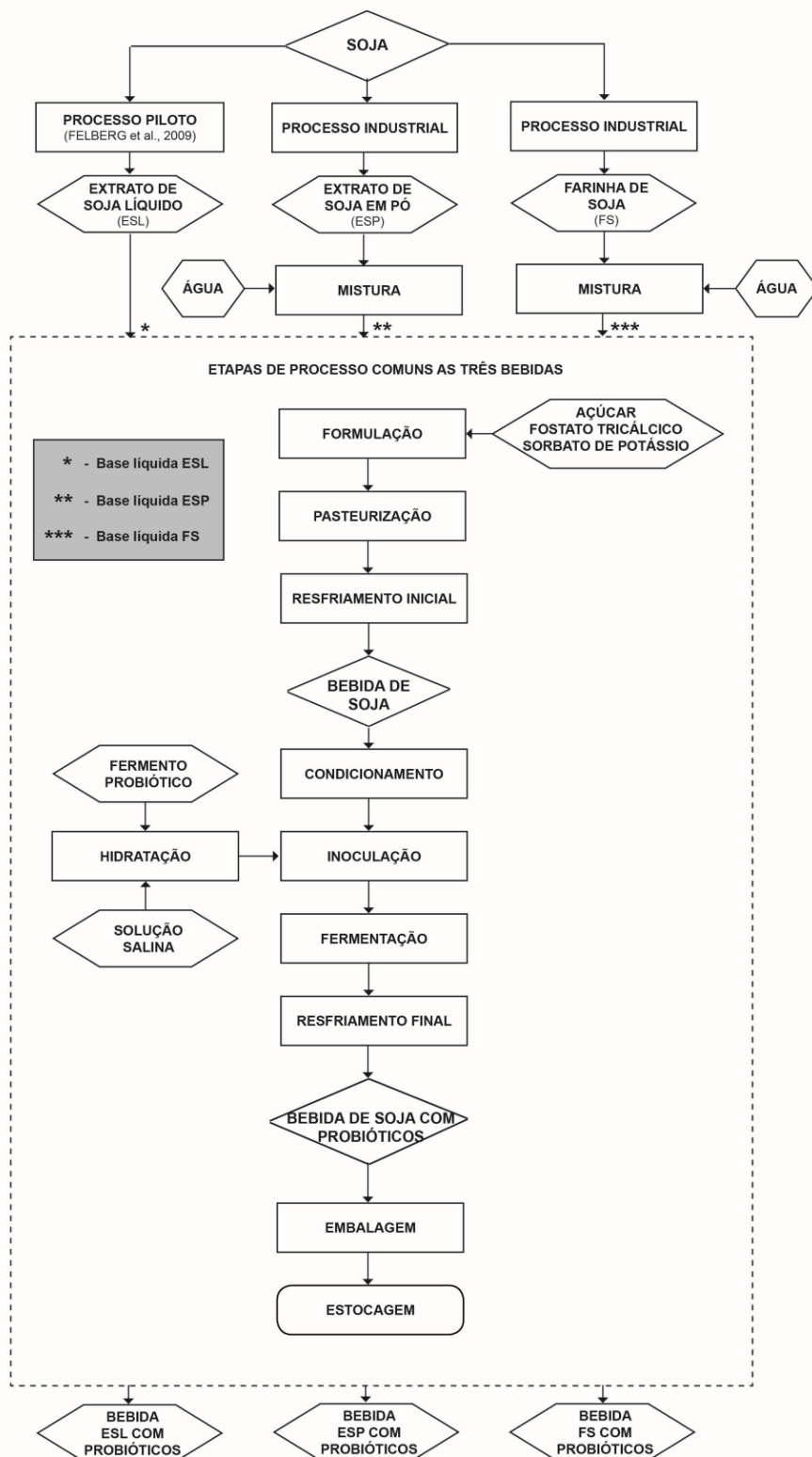


Figura 3 Fluxograma de processo das bebidas de soja fermentadas com probióticos.

A base líquida ESL foi obtida de acordo com o processo descrito em Felberg *et al.* (2009). Os grãos de soja foram descascados, cozidos e, após trituração, procedeu-se a centrifugação utilizando membrana para separação da okara, fração composta por fibras, proteína, lipídios e outros constituintes.

A base líquida FS foi elaborada a partir da mistura da farinha com água. A base líquida ESP foi produzida da mesma forma, pela mistura do pó com água. Em seguida, as três bases líquidas de soja foram submetidas ao processamento para produção das bebidas fermentadas com probióticos.

A farinha de soja empregada nos experimentos foi obtida pela moagem do grão de soja descascado, sem a adição de água ou qualquer outra substância, e posteriormente torrados, não havendo extração ou filtração para a retirada das fibras do produto. Essa farinha contém tanto os sólidos solúveis quanto a okara do cotilédone do grão.

O extrato de soja em pó utilizado consiste em um ingrediente alimentício obtido em processo tecnológico que inclui uma etapa de secagem em *spray-dryer* do extrato líquido do grão. Esse produto não contém a okara, sendo composto essencialmente dos sólidos solúveis do cotilédone, da mesma forma que a ESL.

Os métodos de elaboração da bebida fermentada de soja, os físico-químicos e os microbiológicos utilizados em todo o processo de produção e acompanhamento da evolução da fermentação e da estabilidade da bebida fermentada são descritos a seguir. Os métodos físico-químicos e microbiológicos utilizados no período de análise de vida de prateleira do produto tiveram a periodicidade de 1, 4 e 6 semanas.

### **5.2.2 Produção das bebidas de soja fermentadas com probióticos**

Os três tipos de bebidas de soja empregadas na fermentação com probióticos foram os seguintes: i) bebida elaborada a partir do extrato de soja líquido (ESL), obtida de acordo com Felberg *et al.* (2009); ii) bebida elaborada pela reconstituição do extrato de soja em pó (ESP); iii) bebida elaborada pela formulação da farinha de soja (FS) com água.

A primeira etapa de processo após preparação das bebidas de soja foi a mistura de 6 % (m/m) de sacarose, 6% (m/v) de extrato de soja em pó, 6% de farinha de soja, bebida de soja, 0,4% de fosfato tricálcico e 0,1% de sorbato de potássio.

Os ingredientes e aditivos foram adicionados à água e misturados em jarras de alumínio com auxílio de colher de aço inoxidável. As bebidas foram aquecidas e submetidas à

pasteurização lenta em fogão até atingir a faixa de temperatura de 70 a 75°C por 2 min. O resfriamento foi efetuado em um banho de água a temperatura ambiente até as bebidas atingirem a faixa de temperatura de 45 a 40°C. Durante todo o processo, as jarras de alumínio permaneceram tampadas, de modo a minimizar a contaminação ambiental. As tampas das jarras de alumínio tinham perfurações que permitiam a inserção das sondas de medida de temperatura e pH.

Os recipientes com as bebidas já resfriadas foram acondicionados em banho termostático sem agitação, mantida a temperatura constante de 44°C. Paralelamente ao processo de resfriamento da bebida, ocorria o processo de preparo de cada cultura a partir da reconstituição de 1,0 g da cultura liofilizada em 33 ml de solução salina 0,5%, pelo período de vinte minutos. Durante o período de reconstituição da cultura, a cada 5 minutos a solução era agitada de forma delicada. A inoculação se deu a partir da adição de 10 mL da solução salina contendo inóculo, medidos em pipeta volumétrica automática em cada jarra das bebidas de soja, com breve homogeneização aos 2 e 4 minutos posteriores a incubação (WALTER, 2014).

O processo de fermentação da bebida foi acompanhado sistematicamente através da medição do valor do pH. O acompanhamento do processo de fermentação seguiu até os valores atingirem a faixa entre 4,90 - 4,80. O monitoramento do pH foi realizado com o auxílio do potenciômetro portátil (Mettler Toledo, SevenGo Duo PH/Cond SG23 – Schwerzenbach, Suíça), por inserção direta do eletrodo (Mettler Toledo, InLab Expert Pro-ISM-IP67).

Conforme atingiam o valor de pH entre a faixa determinada as jarras contendo as bebidas foram imersas em banho de gelo e as bebidas resfriadas a temperatura inferior a 10°C. A estocagem foi efetuada em câmara fria a  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **5.2.3 Análises físico-químicas**

#### **5.2.3.1 pH**

Os valores de pH foram determinados por método eletrométrico em potenciômetro digital calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, de acordo com o método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2010).

### 5.2.3.2 Acidez total

A determinação da acidez total foi realizada conforme método volumétrico, por titulação com NaOH 0,1 M, de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

### 5.2.3.3 Composição centesimal

A composição centesimal das bebidas fermentadas de soja de foi determinada segundo as seguintes metodologias:

5.2.3.3.1 *Umidade*: método gravimétrico, com temperatura de 70°C, com adição de nitrogênio, até peso constante da amostra (IAL, 1985);

5.2.3.3.2 *Cinzas*: método gravimétrico por incineração, com temperatura de 550°C, com adição de oxigênio, até peso constante da amostra (IAL, 1985);

5.2.3.3.3 *Proteína bruta*: metodologia de Kjeldahl (AOAC, 2010) por digestão com adição de ácido sulfúrico, destilação e titulação com ácido clorídrico 0,1N. O fator de correção utilizado foi 6,25;

5.2.3.3.4 *Fibra alimentar*: enzimático-gravimétrico, por hidrólise dos amidos e digestão enzimática com protease, com posterior precipitação das fibras solúveis, filtração, secagem e pesagem (IAL, 2008);

5.2.3.3.5 *Lipídios totais*: método por hidrólise ácida (Extrator automático de gordura), conforme *Association of the Official Analytical Chemists - AOCS* (2005);

5.2.3.3.6 *Carboidratos*: calculado pela diferença centesimal da soma da umidade, cinzas, lipídios, proteínas e fibra alimentar, segundo a legislação vigente (BRASIL, 2003).

## 5.2.4 Análises microbiológicas

### 5.2.4.1 Viabilidade dos microrganismos probióticos

A contagem total de bactérias lácticas foi realizada nos tempos 1, 4 e 6 semanas de armazenamento a 8°C, nas amostras das bebidas de soja fermentadas: ESL, ESP e FS. O método utilizado foi o de contagem em placa, que é a técnica mais utilizada na determinação do tamanho de uma população bacteriana e quantifica apenas células viáveis. Empregando o método de diluição em série, de cada amostra foi retirado, assepticamente, alíquota de 10 mL

e transferida para um frasco de diluição contendo 90 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). A partir dessa diluição inicial, foram feitas seis diluições subsequentes de 1 ml da diluição em 9 ml de água peptonada, obtendo a diluição  $10^{-7}$ . Visando garantir nenhuma ocorrência de erro na contagem do número de células viáveis por saturação da placa, 1mL de amostra das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  foi semeado em placa de Petri com meio MRS utilizando a técnica de semeadura em profundidade (*pour-plate*) com adição de sobrecamada (THARMARAJ, 2003).

As placas de contendo *Bifidobacterium animalis* foram incubadas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de atmosfera de CO<sub>2</sub>, dentro de estufa a 35 °C por 48 horas. As placas contendo *Lactobacillus acidophilus* foram encubadas em estufas, sem o uso de jarras de anaerobiose, de acordo com o descrito em *International Dairy Federation - IDF* (1995)

#### 5.2.4.2 Qualidade higiênico-sanitária

Nas análises microbiológicas para verificação da qualidade higiênico-sanitária dos produtos foram realizadas contagem de coliformes a 45°C, bolores e leveduras, *Salmonella sp*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, de acordo com a metodologia da *American Public Health Association - APHA* (2001).



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A tabela 2 apresenta a composição centesimal, em base úmida, do grão de soja, da soja descascada, da farinha de soja e do extrato de soja.

Tabela 2. Composição centesimal das matérias primas (base úmida, em g/100g).

Análises (g/100g)	Grão de soja	Grão descascado	Extrato em pó	Farinha de soja
Umidade	8,16	7,02	5,60	3,93
Cinzas	4,58	4,71	5,71	3,33
Proteína	33,56	35,94	47,63	42,38
Carboidrato	16,88	16,62	27,39	9,52
Lipídio	22,04	24,56	10,64	29,12
Fibra	14,78	11,15	3,04	11,72

Os grãos de soja utilizados são ricos em proteínas contendo aproximadamente 33,56 a 35,94 g/100g em sua composição, possui baixo teor de lipídios 22,04 a 24,56 g/100g. Tais resultados evidenciam a boa qualidade nutricional da soja, por ser composta por maior quantidade de proteínas do que de lipídios. Silva (2005) encontrou resultados um pouco superiores para os teores de proteínas e inferiores de lipídios: 39,7 e 19 g/100g, respectivamente.

Mesmo com os altos teores de proteína presentes nos grãos de soja, o extrato em pó apresentou maior concentração do nutriente, dentre as quatro matérias-primas analisadas. O extrato em pó tem 47,63 g/100g de proteína em sua composição, sendo superior ao mínimo recomendado pela legislação, que determina 40 g/100g (BRASIL, 2005). Cabral et al. (1993) sugere que o extrato de soja em pó, por ser obtido por os grãos de soja descascados, provavelmente sofra um aumento relativo dos teores protéicos. No entanto é o mais pobre em fibras, apresentando 3,04 g/100 g, valor cinco vezes menor que o grão de soja inteiro com 14,78 g/100g.

Na farinha de soja foi encontrado maior teor de lipídio: 29,12 g/100g. Os teores de lipídio dos grãos de soja não diferem muito do teor encontrado na farinha, 22,04 g/100g para o grão de soja inteiro e 24,56 g/100g para o grão de soja descascado. Para a semelhança, destaca-se o

fato da farinha utilizada ser integral, sem processo de desengorduração. O extrato de soja em pó apresentou menor teor de gordura, assim acredita-se que tenha ocorrido processo de extração do lipídio.

Neste trabalho, a farinha de soja foi assim classificada perante as características tecnológicas de seu processo de obtenção, que em essência envolve a moagem do grão descascado. No processamento da farinha de soja utilizada, não ocorre à formação de emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos, distinção do processo tecnológico dos extratos de soja. O processo de obtenção da farinha de soja é menos oneroso, pois os grãos de soja são triturados, sem a adição de água ou qualquer outra substância, e posteriormente secos ou torrados, não havendo extração do óleo de soja ou filtração para a retirada das fibras do produto (SEIBEL, 2009).

A revogada Resolução CNNPA nº 14/78 (BRASIL, 1978) conceituava a farinha de soja como “produto obtido a partir dos grãos de soja convenientemente processados até a obtenção da farinha desengordurada”. Entretanto, ressalta-se que de acordo com a legislação em vigor esse produto pode ser classificado como extrato de soja em pó (BRASIL, 2005). Na atual legislação, a designação de farinha ou extrato foi fixada de acordo o teor proteico mínimo, independente do processo de obtenção, forma de apresentação, finalidade de uso e características específicas.

O extrato de soja, também conhecido como “leite” de soja, era conceituado segundo processamento como " produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial" (BRASIL, 1978). O processo de produção do “leite” de soja não é capaz de extrair todo o conteúdo de proteínas e dos diversos nutrientes presentes, resultando um subproduto que consiste em uma “massa inerte” do processo de extração. Este subproduto, denominado pelos orientais de okara, apresenta um valor nutritivo semelhante ao produto de origem (soja) com um elevado teor de proteínas de grande qualidade. As indústrias que elaboram o extrato de soja destinam o okara, quase que em sua totalidade à alimentação animal ou descartam-no como lixo (PINTO e CASTRO, 2008).

No entanto, a Resolução-RDC nº 268/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005), revoga a CNNPA nº 14/78, e passa a definir os produtos de soja a partir do teor protéico mínimo e não mais tecnologia empregada no preparo, sendo facultativo o emprego de expressões

consagradas pelo uso, processo de obtenção, forma de apresentação, finalidade de uso ou característica específica.

Segundo Marson (2010), a indústria de processamento divide em duas partes iguais a obtenção de qualquer produto oriundo da soja: a preparação e a extração. A primeira etapa que é a de preparação consiste na quebra dos grãos, separação de cascas, condicionamento, laminação, expansão e secador de massa. E a segunda etapa do processo que é a extração onde se define o tipo de produto que será produzido, podendo ser farelo de soja para consumo animal ou as farinhas, que servirão de base protéica para a fabricação de diferentes produtos para a alimentação humana como, por exemplo, o leite e o suco a base de soja. Ou também podendo ser a produção de óleo de soja. Tal definição ilustra o conceito estabelecido pela RDC 268/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005), onde o processo tecnológico utilizado para a obtenção do produto final não é o determinante para o emprego das expressões extrato e farinha.

## 6.2 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NAS BEBIDAS DE SOJA FERMENTADAS

A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* nas bebidas fermentas de soja elaboradas a partir do ESL, ESP e da FS durante a estocagem refrigerada a 8°C é apresentada na tabela 3. Para o alimento seja considerado probiótico, a quantidade mínima viável de microrganismos, deve estar situada na faixa de 8 a 9 log UFC/mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Considerando uma porção de bebida de soja de 100 mL, a concentração mínima de probióticos deve estar na ordem de  $10^6$  UFC/mL, em notação logarítma o equivalente a 6 log UFC/mL.

Durante as seis semanas de estocagem estudadas as análises microbiológicas indicaram uma redução na concentração das duas bactérias probiótica estudadas na ordem de 1 ciclo logarítmico, independente da base líquida de soja empregada na produção das bebidas fermentadas.

Tabela 3. Viabilidade de bactérias probióticas (log UFC/mL) nas três bebidas de soja fermentadas durante a estocagem refrigerada a 8° C.

Bactéria	Bebida*	Processo	Semana 1	Semana 4	Semana 6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ESL	1	5,54	6,00	6,56
		2	6,65	6,97	NR*
		3	6,61	7,28	6,00
	ESP	1	7,88	8,40	NR*
		2	7,69	6,80	6,00
		3	8,40	NR*	6,00
	FS	1	7,11	7,00	6,00
		2	7,11	7,81	6,80
		3	6,78	6,00	NR*
<i>Bifidobacterium animalis</i>	ESL	1	7,70	8,23	6,00
		2	7,28	8,20	NR*
		3	8,70	7,40	NR*
	ESP	1	7,88	8,26	7,18
		2	8,18	8,79	NR*
		3	8,72	7,91	6,66
	FS	1	6,80	7,99	6,00
		2	5,18	6,00	NR*
		3	7,49	6,00	6,94

\*Bebida fermentada com bactéria probiótica elaborada a partir da seguinte base líquida de soja: ESL (extrato de soja líquido); ESP (extrato de soja em pó); FS (farinha de soja). \*NR não realizado.

Em duas bebidas de soja fermentada – ESL e ESP, que utilizaram o extrato de soja líquido e em pó, respectivamente, as contagens de *Bifidobacterium* foram superiores as contagens de *Lactobacillus* quando utilizados os mesmos substratos. O comportamento das *Bifidobacterium* apresentou-se também mais estável quando presente no extrato de soja.

Machado (2007), utilizando extrato de soja líquido e *Lactobacillus*, obteve elevado número de células viáveis até a semana 4 de armazenamento do produto, com 8 log UFC/mL, enquanto o resultado encontrado nesse estudo foi 6 log UFC/mL, no mesmo período de vida de prateleira.

Assim como Brandão (2012) obteve resultados superiores aos preconizados encontrando, semana 4 de armazenamento, com contagem de células viáveis na faixa 11 log UFC/mL, com a combinação extrato de soja em pó e *L. acidophilus*, a bebida de soja a partir do extrato de soja em pó - ESP foi a que apresentou a maior contagem de células viáveis. A bebida ES obteve maior concentração, sendo 7 log UFC/mL para *L. acidophilus* e 8 log

UFC/mL *Bifidobacterium*, além de apresentar maior estabilidade dentre as três bebidas, com redução de um ciclo logarítmico ao final das 6 semanas de estocagem refrigerada.

A bebida fermentada FS manteve a viabilidade das células durante o período de armazenamento estudado, porém foi a bebida fermentada com o menor resultado de contagem probiótica, independente do microrganismo.

Alguns fatores do extrato como acidez, ácidos produzidos durante o armazenamento, presença de oxigênio, produção de compostos antimicrobianos e redução de nutrientes no substrato, são citados como responsáveis pela redução da viabilidade e, conseqüentemente, das propriedades probióticas do produto (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001; PUPIN, 2002).

Do ponto de vista tecnológico, os microrganismos probióticos devem possibilitar sua produção em larga escala, resistir aos processamentos, manter acidez estável, apresentar sabores e/ou aromas adequados, bem como textura agradável após a fermentação, além de manter uma contagem de células viáveis durante toda vida útil do produto (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al*, 2002; PRADO *et al.*, 2008).

### 6.3 AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA

As três bebidas de soja fermentada com probióticos foram analisadas em termos de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e Coliformes a 45°C no início e após seis semanas de estocagem. As contagens de células viáveis foram: *Bacillus cereus* <1 UFC/mL; *Staphylococcus aureus* < 1,0; Coliformes foram < 3,0 e ausência de *Salmonella* em 25 mL de amostra. Os resultados sugerem adequada das condição higiênico-sanitária durante o processo. Considerando a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), as bebidas elaboradas encontram-se dentro dos padrões microbiológicos para os produtos a base de soja.

A referida resolução não define para as bebidas a base soja, a quantificação de bolores e leveduras. Silva Junior (2007) define como elevada contagem de bolores e leveduras resultados acima de 5 log UFC/g. A amostra de bebida farinha de soja (FS) fermentada com *Lactobacillus* apresentou, na sexta semana de armazenamento, contagem de bolores e leveduras de 5,18 log UFC/g, superior a referência preconizada por Silva Junior (2007), conforme mostra a tabela 4. As condições de produção da bebida e o tempo de armazenamento pode ser o motivo pela elevada contagem de bolores e leveduras na amostra.

Tabela 4. Enumeração de bolores e leveduras (log UFC/mL) nas três bebidas de soja fermentadas durante a estocagem refrigerada a 8° C.

Bactéria	Bebida*	Processo	Semana 1	Semana 4	Semana 6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	FS	1	3,46	3,48	3,18
		2	2,59	4,85	5,18
		3	2,60	1,00	2,65
	ESP	1	3,38	4,73	4,74
		2	2,58	1,00	1,00
	ESL	1	3,70	1,00	NR*
2		1,00	3,78	NR*	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	FS	1	4,34	2,00	1,00
		2	3,75	2,00	1,00
		3	4,46	2,00	1,00
	ESP	1	4,46	3,65	1,00
		2	2,90	1,00	1,00
		3	4,48	2,00	1,00
	ESL	1	3,00	1,00	NR*
		2	2,93	1,00	NR*
		3	3,30	3,30	NR*

\*Bebida fermentada com bactéria probiótica elaborada a partir da seguinte base líquida de soja: ESL (extrato de soja líquido); ESP (extrato de soja em pó); FS (farinha de soja). \*Não Realizado.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DAS BEBIDAS DE SOJA COM PROBIÓTICOS

De acordo com a tabela 5, podemos observar a variação de pH e a formação de ácido láctico na bebida durante o processo de armazenamento. As amostras analisadas antes da fermentação indicam valores de pH na faixa de entre 6,92 a 7,02 e concentração de ácido láctico na ordem de 0,03 a 0,07g/100g. Os valores de pH do extrato de soja são compatíveis aos resultados aguardados no período que antecede a fermentação.

Tabela 5. Valores de pH e acidez das bebidas de soja antes fermentação e após fermentação com bactérias probiótica, durante a estocagem refrigerada a 8 °C.

Bactéria	Processo	Bebida*	Antes da Fermentação		Semana 1		Semana 4		Semana 6	
			pH	Acidez (g/100g)	pH	Acidez (g/100g)	pH	Acidez (g/100g)	pH	Acidez (g/100g)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	FS	NR*	0,03	4,85	0,28	4,72	0,28	4,71	0,30
	2		NR*	NR*	4,83	0,27	4,79	0,33	4,78	0,31
	3		6,92	NR*	4,72	0,26	NR*	NR*	NR*	NR*
	1	ESP	NR*	0,06	4,74	0,38	4,50	0,48	4,57	0,49
	2		NR*	NR*	4,67	0,44	4,63	0,47	NR*	NR*
	3		6,98	NR*	4,59	0,46	4,41	0,54	NR*	NR*
	1	ESL	NR*	0,06	4,64	0,43	6,36	0,10	4,53	0,45
	2		NR*	0,05	4,69	0,41	4,57	0,45	NR*	NR*
	3		7,01	NR*	4,74	0,37	NR*	NR*	NR*	NR*
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	FS	6,92	0,04	5,03	0,28	5,09	0,27	5,08	0,26
	2		NR*	0,07	5,01	0,28	5,10	0,27	5,06	0,26
	3		6,94	NR*	5,05	0,25	NR*	NR*	NR*	NR*
	1	ESP	6,97	0,06	4,94	0,45	4,98	0,45	4,98	0,42
	2		NR*	0,06	4,98	0,40	5,02	0,38	4,99	0,39
	3		6,97	NR*	4,96	0,39	NR*	NR*	NR*	NR*
	1	ESL	6,99	0,06	5,03	0,37	5,05	0,36	5,10	0,38
	2		NR*	0,03	5,00	0,39	5,05	0,45	5,04	0,45
	3		7,02	NR*	5,07	0,31	NR*	NR*	NR*	NR*

\*Bebida fermentada com bactéria probiótica elaborada a partir da seguinte base líquida soja: ESL (extrato de soja líquido); ESP (extrato de soja em pó); FS (farinha de soja).\*Não Realizado.

Após a fermentação o pH reduziu de forma esperada, sendo os valores mais baixos apresentados pelo *Lactobacillus*, faixa de 4,59 até 4,85. Já o pH para *Bifidobacterium* se mantiveram na faixa entre 4,94 e 5,07, valores ótimos para seu adequado manutenção da viabilidade das bactérias, segundo o processo estabelecido por Walter (2014). A acidez titulável, expressa em ácido lático, ao final da fermentação na semana 1 foi semelhante para ambas bactérias, com valores entre 0,25 – 0,45 g/100g, para *Bifidobacterium* e entre 0,26 – 0,46 g/100g para *Lactobacillus*. Valores semelhantes a concentração de acidez de 0,46 encontrado por Marin (2014), para o mesmo período.

O comportamento das bebidas de soja fermentadas durante a vida de prateleira foi monitorado e, de modo geral, houve leve diminuição dos valores de pH para *Lactobacillus*, da

semana 1 para a semana 4, e estabilidade nas concentrações de ácido láctico para ambos microrganismos. Zacarchenco (2003), em estudo com leites fermentados por *Bifidobacterium*, apresentou o maior pH (5,06) aos 21 dias de estocagem, valores próximos aos encontrado para *Bifidobacterium*. O pH é um dos principais fatores que influenciam a produção de ácido láctico, pois a atividade catalítica das enzimas e a atividade metabólica dos microrganismos dependem do pH extra celular (SILVA e MANCILHA, 1991).

O comportamento da vida de prateleira da semana 6 foi semelhante ao da semana 4: discreta alteração de pH em algumas bebidas fermentadas por *Lactobacillus* e estabilidade nos valores de pH nas fermentadas por *Bifidobacterium* e concentrações de ácido láctico. Ácidos fracos, como por exemplo, o ácido láctico inibe o crescimento bacteriano, porque com a queda do pH externo, o ácido é protonado logo que é exportado para fora das bactérias. Descarregado, ele se difunde de volta para a célula e dissocia-se devido ao pH superior intracelular. A célula então tem que usar ATP para bombear os prótons para fora, ocorrendo a perda de energia, que causa a parada do crescimento e conseqüentemente a morte das bactérias. Além disso, ocorre autólise das células em alta concentração de ácido láctico (HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL, 1997).

A partir dos resultados alcançados para a quantificação do ácido láctico nas bebidas de soja fermentadas com probióticos é possível observar um aumento da concentração deste ácido em função do processo de fermentação de 0,03 para 0,49 g/100g. Porém, a concentração final de ácido láctico não está dentro do valor indicado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, para a concentração final de ácido láctico a qual deve estar entre 0,6-1,5% (BRASIL, 2007).

## 6.5 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal, calculada em base úmida, das diferentes bebidas de soja está descrita na tabela 6. Conforme demonstrado, não houve diferenças relevantes nos teores de cinzas, proteínas e carboidratos.



Tabela 6. Composição centesimal das bebidas de soja fermentadas com probióticos (base úmida, em g/100g).

Bactéria	Processo	Bebida de Soja	Umidade	Cinzas	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
			Semana 1				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	FS	86,68	0,71	2,75	8,13	1,73
	1	ESP	87,37	0,81	2,63	8,63	0,56
	1	ESL	87,06	0,67	2,50	9,27	0,5
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	FS	86,47	0,82	2,94	8,03	1,74
	2		86,88	0,62	2,75	7,96	1,79
	1	ESP	86,73	0,83	2,94	9,16	0,34
	2		87,22	0,80	2,81	8,61	0,56
	1	ESL	86,55	0,79	2,81	9,32	0,53
	2		86,65	0,70	2,75	9,47	0,43
			Semana 6				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	FS	87,16	0,55	3,00	7,62	1,67
	2		85,91	0,62	2,94	7,30	2,04
	1	ESP	86,74	0,77	3,06	8,09	1,34
	1	ESL	86,20	0,61	2,75	9,42	1,02
	2		86,44	0,70	2,75	8,41	1,70
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	FS	86,18	0,60	3,13	8,12	1,93
	2		87,14	0,62	2,38	8,21	1,65
	1	ESP	86,28	0,77	3,06	8,43	1,46
	2		86,89	0,75	2,75	8,49	1,12
	1	ESL	87,87	0,74	2,88	6,74	1,78
	2		85,93	0,77	2,81	8,89	1,60

\*Bebida fermentada com bactéria probiótica elaborada a partir da seguinte base líquida de soja: ESL (extrato de soja líquido); ESP (extrato de soja em pó); BFS (farinha de soja).

Os valores encontrados para proteínas, na bebida de soja fermentada com probiótico obtida pela utilização do extrato em pó, entre 2,63 e 3,06 g/100g, foram inferiores aos relatados por Pereira *et al.* (2009) e Bowles e Demiate (2006), utilizando também extrato de soja em pó encontraram 45,67 e de 33 g/100g, em base seca, para as proteínas, respectivamente. A diferença entre os resultados pode ser relacionada com a taxa e formas de extração e que resulta diretamente na concentração dos compostos contidos no extrato (BOWLES e DEMIATE, 2006).

A farinha de soja integral utilizada para a obtenção da bebida de farinha de soja apresentou maiores teores de lipídios quando comparada a bebida onde foi utilizado o grão para o preparo do extrato líquido e o extrato em pó. Delaplane (2007), ao usar farinha de soja

integral obteve teores de lipídios de 17,61 e 19,54 g/100g, sendo resultados superiores aos encontrados neste trabalho que estiveram entre a faixa de 12,83 e 13,97 g/100g.

## 6.6 TEMPO DE FERMENTAÇÃO

A Tabela 7 apresenta a variação do pH das bebidas de soja em resposta ao tempo de fermentação necessário para que o pH da bebida atingisse os valores de pH entre 4,8 a 4,9, conforme descrito por Walter (2014). Pode-se observar que os valores de pH inicial variaram entre 6,67 e 8,4, diminuindo durante a fermentação.

Tabela 7. Tempo de fermentação das bebidas de soja fermentadas com probióticos.

Bactéria	Processo	Bebida de Soja	pH Inicial	pH Final	pH Variação	Tempo de fermentação
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	FS	6,81	4,85	1,96	04:14
	2		6,73	4,83	1,90	04:21
	1	ESL	8,40	4,64	3,76	04:13
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	FS	6,73	5,03	1,70	05:16
	2		6,73	5,01	1,72	04:58
	1	ESP	6,68	4,94	1,74	04:16
	2		6,67	4,98	1,69	03:35
	1	ESL	6,73	5,00	1,73	04:53
	2		6,73	5,07	1,66	05:31

\*Bebida fermentada com bactéria probiótica elaborada a partir da seguinte base líquida de soja: ESL (extrato de soja líquido); ESP (extrato de soja em pó); BFS (farinha de soja).

O menor tempo de fermentação das bebidas de soja encontrado utilizando *Lactobacillus acidophilus* como bactérias fermentadoras foi de 04h13min, sendo apenas 8 minutos inferior ao tempo máximo de fermentação utilizando a mesma bactéria. O tempo de fermentação das bebidas de soja fermentadas por *Bifidobacterium animalis* foi de 05h31min o processo mais longo e de 03h35min o processo mais curto. O processo utilizando extrato de soja em pó resultou no procedimento mais curto. Bernal (2004), utilizando *Bifidobacterium animalis*, obteve tempo de fermentação de 14h00min para atingir o pH final foi de 4,80 para uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja.

## 7 CONCLUSÃO

Perante os resultados desse estudo conclui-se que as diferentes matérias-primas a base de soja são bons substratos para o crescimento dos probióticos, podendo ser utilizada na produção da bebida fermentada. Foi comprovada a possível de elaboração das bebidas probióticas fermentadas à base de soja formuladas a partir de extratos de soja em pó e da farinha de soja, matérias-primas disponíveis no mercado, ao invés do processo tradicional a partir do grão, num processo de produção simplificado e versátil.

Durante as seis semanas de vida de prateleira avaliadas, as bebidas de soja fermentadas, independente da matéria-prima de origem utilizadas na sua elaboração: farinha de soja, extrato de soja em pó e extrato de soja líquido, atenderam à legislação brasileira que exige a presença mínima de 8 log UFC de microrganismos probióticos por porção da bebida (100mL). Logo, os produtos obtidos são alimentos funcionais por conter probióticos de acordo com os requisitos legais.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

@limentus: alimentos e novas tecnologias na ufrgs. Extrato de Soja. Porto Alegre, RS, 2015. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus/objetos-de-aprendizagem/soja/extrato-de-soja> . Acesso em 11 novembro 2015.

ALM, L. The therapeutic effects of various cultures - an overview *apud* ROBINSON, R.K. Therapeutic Properties of Fermented Milks. *Elsevier Applied Science*, London, p. 45–64, 1991.

AMARAL, V.M.G. *A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde*. 2006. 86f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

American Public Health Association - APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington, p.676, 2001.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official Methods of Analysis*. 18 ed., 3<sup>a</sup> rev. Washington, DC, 2010.

Association of the Official Analytical Chemists - AOCS. *Official and tentative methods of analysis*. Arlington, 2005.

AQUARONE, E. *Biotecnologia industrial, Volume IV: Biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo, SP: Editora Blucher, 2001.

BARRETO, G.P.M. et al. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Revista Braz. J. Food Technol.*, v.6, n.1, p.119-126, jan./jun., 2003.

BERNAL, O.L.M. *Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos*. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos.) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BOWLES, S.; DEMIATE, I.M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, 2006.

BRANDÃO, H.C.A.D.N.T.M. *Utilização do extrato hidrossolúvel de soja na elaboração da bebida fermentada simbiótica*. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Cascavel, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Resolução MERCOSUL/GMC/RES. Nº 47/97, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC N.º 2, de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja, Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de Soja. Brasília, DF, 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Produtos Protéicos de Origem Vegetal. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, DF, 2008.

CABRAL, L.C.; SERNA SALVADOR, S.O.; TINSLEY, A.M. Effects of dehulling and storage conditions on cooking requirements and chemical composition of soybeans. *Archimology Latinoamerica Nutrition*, v.45, n.1, p.36-40, 1993.

CARDOSO, S. *Elaboração e avaliação de projetos para agroindústrias: Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural do SEAD/UFRGS*. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS, 2011.

CHARTERIS, W.P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 51, n.4, p. 123-136, 1998 *apud* MANZONI, M.S.J.; CAVALLINI, D.C.U.; ROSSI, E.A. Efeitos do consumo de probióticos nos lípides sanguíneos. *Revista Alim. Nutr. Araraquara*, São Paulo, v.19, n.3, p. 351-360, jul./set. 2008.

COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C Probióticos e resposta imune. *Revista Ciência Rural. Santa Maria*, Rio Grande do Sul, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

COURI, S.; FELBERG, I.; TERZI, S.; SILVA, C.S. Bebida fermentada de soja. Embrapa Informação Tecnológica, (agroindústria familiar). Brasília, DF, 2006.

CRUZ, N.S. et al. Soymilk treated by ultra high pressure homogenization: acid coagulation properties and characteristics of a soy yogurt product. *Food Hydrocolloids*, v.23, n.2, p.490-496, 2009.

DALEPRANE, J.B. *Avaliação da qualidade nutricional de duas variedades de soja e a influencia de seu consumo nos indicadores de doenças cardiovasculares em ratos senis*. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

DONKOR, O.N. et al. Survival and activity of selected probiotic organism in set-type yogurt during cold storage. *Int. Dairy J.*, n.17, p.657-665, 2007.

EMBRAPA. *Visão 2014 – 2034: O futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira*. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/agropensa/documento-visao>>. Acesso em 28 novembro 2015.

EMBRAPA SOJA. História da Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia>>. Acesso em 24 julho 2015.

FELBERG, I. et al. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.29, n.3, p. 609-617, jul.-set. 2009.

FERRAGUT, V. et al. Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *Journal of Food Engineering*, v.92 p.63–69, 2009.

FERREIRA, C.L.L.F. Valor Nutricional e Bioterapêutico de Leites Fermentados, *Revista Leite & Derivados. Ipsis Gráfica e Editora S.A.* n.36, Set /Out., 1997.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - FIESP. Safra Mundial de Soja 2015/16 - 3º Levantamento do USDA. Disponível em: [http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2015/07/boletim\\_safra-mundial-soja\\_julho2015.pdf](http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2015/07/boletim_safra-mundial-soja_julho2015.pdf)>. Acesso em 24 julho 2015.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - FIESP. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL. Brasil Food Trends 2020. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/publicacoes-agronegocio/brasil-food-trends-2020/>>. Acesso em: 1 jul. 2011. São Paulo. 2010.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GARRO, M.S.; VALDEZ, G.F.; GIORI, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiology*, v. 21, p. 511–518, 2004.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Food Science & Technology*, v. 10, p. 139-157, 1999.

HIRAKURI, M.H. *O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro*. Embrapa Soja. Londrina, PR., 2014.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 301–307, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA - IBGE. Disponível em <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201506\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201506_5.shtm)>. Acesso em 24 julho 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. 3. ed. São Paulo, v.1, p.533, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. 4. ed. São Paulo, p.1020, 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. *Bulletin of the IDF*, n. 306, p. 23-33, 1995.

KOLLATH, W. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, v.8, p.7–16, 1953.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v. 44, n 3, jul./set. 2008.

LEISTNER, L.; GOULD, G.W. *Hurdle technologies: combination treatment for food stability, safety and quality*. Food Engineering Series. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

MACHADO, M.R.G. *Bebida de soja fermentada com Lactobacillus acidophilus: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional*. 2007. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILAN, C.G.; SANCHEZ, B.; GUEIMONDE, M. *Bifidobacterium*. In: Liu D, editor. *Molecular Detection of human bacterial pathogens*. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group; p. 45–57, 2011.

MARIN, M. Caracterização Físico-Química e Sensorial de Bebida Probiótica de Soja. *Revista B.CEPPA*, Curitiba, v. 32, n. 1, p. 93-104, jan./jun. 2014.

MARSON, L.P. *A produção de derivados da soja e sua aceitação pelo mercado consumidor*. 2010. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior em Tecnologia em Alimentos), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2010.



NAGPAL, R.; KUMAR, A.; ARORA, S. In-vitro probiotic potential of lactobacilli from indigenous milk products. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, v.5, n.2, p. 103-110, 2010.

O'SULLIVAN, D. J. *Primary Sources of Probiotic Cultures* apud AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I.; JUNEJA, V.K. *Probiotics in food safety and human health*, 2006.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, 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, p.1-21, 2002.

PARRA, C.D. Guia do engarrafador moderno 2015. A bola da vez. Disponível em <<http://engarrafadormoderno.com.br/mercado/bola-da-vez>>. Acesso em 05 dezembro 2015.

PAXTON, J.S. Soy Protein: Your Key To Better Health , Phytoestrogens: The Biochemistry, Physiology, and Implications for Human Health of Soy Isoflavones – *AM J. ClinNutri.*, 1998.

PEREIRA, M.O. et al. Elaboração de uma bebida probiótica fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de frutas. *Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 5 n. 3 Set./Dez. 2009.

PINTO, D.D.J.; CASTRO, P.S. Estudo preliminar da secagem do okara (resíduo do extrato aquoso de soja) para inativação dos fatores anti-nutricionais e conservação. *Braz. J. FoodTechnol.*, 2008.

PRADO, F.C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*. Barking, v.41, n.2, p. 111-123, 2008.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO. ALIMENTOS FUNCIONAIS E BIOTECNOLOGIA, Campinas, p. 133-145, 2002.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLARINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEM, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v 13, p. 3-11, 2002.

ROBERFROID, M. Probiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, v.137, p.830S–837S, 2007.

ROUDSARI et al. Assessment of soy phytoestrogens effects on bone turnover indicators in menopausal women with osteopenia in Iran: a before and after clinical *Trial. Nutrition Journal*. v.4, p.30, 2005.

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

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas*. São Paulo: Editora Varela, 2011.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT Food Science and Technology*, London, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SANDERS, M.E. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Functional Food Reviews*, Hamilton, v. 1, n.1, p. 3-12, 2009.

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.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, v.17, p. 1284-1289, 2007.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R.E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, p. 374-382, 2006.

SCUTTI, L.F.; ROSSI, E.A. Propriedades Profiláticas e Terapêuticas das Culturas Láticas. *Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, Caderno de Nutrição 12*, p.9-18, 1996.

SEIBEL, N.F. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [Glycine Max (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. *Braz. J. Food Technol.*, v. 12, n. 2, p. 113-122, abr./jun. 2009.

SILVA JUNIOR, E.A. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação*. 6ª edição. São Paulo, SP: Livraria Varela, 2007.

SILVA, J.B. *Caracterização química, físico-química e sensorial de extratos de soja em pó*. 2005. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

SILVA, L.A.; CORREIA, A.F.K. Manual de boas práticas de fabricação para indústria fracionadora de alimentos. *Revista de Ciência & Tecnologia*, v.16, n. 32, p. 39-57, jul./dez, 2009.

SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Aproveitamento de agroindustriais: acido latico uma alternativa. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.37-40, 1991.

SILVA, T.J.P. Processamento de produtos lácteos fermentados. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*. v. 33, n. 198, p. 18-22, 1978.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. “Probiotic cheese”. *International Dairy Journal*, v.8, p.491-496, 1998.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. *Yoghurt Science and Technology*. 2ª Edition. Cambridge, England. Woodhead Publishing Limited, 1999.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, n.86, p.2288–2296, 2003.

TRINDADE, C.S.F. *Desenvolvimento e caracterização sensorial, física, química e nutricional de “iogurte” de soja*. 1996, 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

ZACARCHENCO, P.B. *Leites fermentados por Streptococcus thermophilus adicionados de Lactobacillus acidophilus e Bifidobacterium longum: isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados*. 2003. 181p. Tese. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

WALTER, E.H.M. Desenvolvimento de bebidas fermentadas de soja com funcionalidade probiótica. In: **ANAIS... V WORKSHOP EMBRAPA/MONSANTO**, 2014, Brasília, 24 e 25 de setembro de 2014.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Check-List de Processamento

	Tratamento	Repetição	Data	Símbolo				
	LA BFS	1						
	LA BES	1						
	LA BEL	1						
	BB BFS	1						
	BB BES	1						
	BB BEL	1						
	<b>Etapa 1</b>							
( )	Retirar brincos e anéis/lavar as mãos							
( )	Verificar o nível/qualidade da água no banho d`água							
( )	Ligar banho d`água							
( )	Retirar os padrões de calibração do pH e O2 dissolvido da geladeira							
( )	Separar o restante do material:	Etiquetas, garrafas						
( )	Lavar o material, principalmente embaixo da tampa do banho							
( )	Identificar os frascos de amostra							
( )	Calibrar pHmetro e medidor de O2							
( )	Refratômetro							
	<b>Etapa 2</b>							
( )	<b>Preparar as 6 formulações</b>							
( )	<b>Tipo de pó</b>							
	<b>Formulação da bebida</b>			<b>Quantidade (g)</b>				

	<b>Ingrediente</b>		<b>Extrato Líquido</b>	<b>Extrato Pó</b>	<b>Farinha</b>				
	Água								
	Açúcar								
	Extrato de Soja em Pó								
	Sorbato de potássio								
	Fosfato tricálcico								
	<b>Total da bebida</b>								
	Bebida retirada antes de adição do fermento								
	<b>Total da bebida e ser fermentada</b>								
	Total da bebida considerando o 0% de preparado de fruta								
	Fermento								
	Bebida fermentada retirada antes de adição do preparado								
	<b>Total de bebida ferm adicionada de preparado de fruta</b>								
	<b>Total da bebida considerando o 0% de preparado de fruta</b>								
	<b>Etapa 2</b>								
( )	<b>Pasteurização</b>	70-75°C/2min							
( )	<b>Resfriamento</b>	≈ 40-45°C							
( )	<b>Etapa 3</b>								
( )	<b>Condicionamento da bebida</b>	Banho a 44°C e Bebida a 42°C							
	<b>Etapa 4</b>								
( )	<b>Coleta de amostras, conforme tabela de amostragem</b>								
( )									
	<b>Medida de pH</b>								

( )	<b>Medida de sólidos solúveis</b>								
( )	<b>Etapa 5</b>								
	<b>Prepararo do inóculo</b>								
	<b>Fermento mãe</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Volume de solução sal. 0,5%</b>						
	LA	0,000							
	BB	0,000							
	<b>Solução sal. 0,5%</b>								
	0,5 g de sal								
	100 g água filtrada								
	<b>Etapa 6</b>								
( )	<b>Condicionamento do inóculo</b>								
	<b>Etapa 7</b>								
( )	<b>Inoculação e mixtura</b>								
( )	<b>Coleta de amostra e resfriamento rápido</b>								

( )	<b>Fermentação</b>									
	<b>Medida de pH e O2 dissolvido</b>									
( )	<b>Resfriamento</b>									
	<b>Etapa 8</b>									
( )	<b>Medida de Sólidos solúveis</b>									
( )	<b>Medida de pH</b>									
( )	<b>Retirada de amostras acidez</b>									
( )	<b>Retirada de amostras micro</b>									
( )	<b>Retirada de amostras congelar</b>									
	<b>Tabela de amostragem</b>									
		Análises								
	<b>Ponto</b>	<b>pH</b>	<b>Brix</b>	<b>Acidez</b>	<b>Probióticos</b>	<b>Micro</b>	<b>Rotulagem</b>	Etiquetas	<b>Volume/ponto</b>	
	Bebida de soja (A)	1	1	2	0	0	1	3		
	Bebida ferm. (D)	1	1	1	1	1	1	4		
	Bebida ferm. 30d	1	1	1	1	0	0	2		
	Bebida ferm. 45d	1	1	1	1	1	1	4		
	<b>Total de amostras</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			
	<b>Volume/amostra</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>50</b>			



	Volume total/analise	0	4	#REF!	100	60	40	150	
	<b>Volume total (mL)</b>	<b>#REF!</b>							<b>0</b>
	Volume retirado antes da fermentação							100	
	Total de amostras p/ 6 trat					9	6	9	

