

# FERMENTAÇÃO DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA VERDE POR BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Fernanda Arré Chiarella <sup>1</sup>; Cynthia Jurkiewicz Kunigk <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

<sup>2</sup> Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

**Resumo.** *A soja verde é um tipo especial de soja, colhida quando os grãos ainda estão imaturos, resultando em um produto com características sensoriais superiores às do grão maduro. De forma a combinar os benefícios à saúde do consumo de soja verde e de microrganismos probióticos, este projeto teve como objetivos: desenvolver o processo de obtenção de extrato hidrossolúvel de soja verde de modo a atingir a concentração mínima de 3,0% de proteínas, exigida pela legislação brasileira; e avaliar a viabilidade de bactérias probióticas na bebida fermentada produzida com extrato hidrossolúvel de soja verde. Os resultados mostraram que há influência significativa da temperatura da água na etapa de trituração dos grãos na produção do extrato. Com o aumento da temperatura eleva o teor de proteínas, mas diminui a massa de extrato. A maior massa de proteína extraída do grão ocorre para temperaturas entre 45°C e 60°C. A velocidade de trituração não influencia o teor de proteínas no extrato hidrossolúvel de soja verde. A adição de prébiótico ao extrato hidrossolúvel de soja verde não teve influência significativa na viabilidade da população de bactérias probióticas durante o armazenamento das bebidas.*

## Introdução

Os consumidores modernos estão cada vez mais interessados em sua saúde pessoal, e esperam que os alimentos, além de saborosos e atraentes, também sejam seguros e saudáveis. A soja é um grão muito utilizado na produção de alimentos voltados ao público que busca alimentos saudáveis, além disso, trata-se de uma matéria prima que apresenta elevado teor de proteínas se comparado com o leite, tornando-se uma alternativa ao consumo de leite e produtos lácteos (Smiderle, 2006).

Cultivada pelos chineses, há mais de cinco mil anos, a soja é um dos alimentos mais completos e versáteis que o homem conhece. Além de suas propriedades nutricionais, a soja apresenta grande potencial para atuar na manutenção da saúde e na redução de risco de diversas doenças crônicas.

A colheita da soja verde ocorre quando a semente ainda está imatura e preenche de 80 a 90% do tamanho da vagem. Esta colheita antes do tempo resulta em grãos maiores do que sua versão após o amadurecimento e com teores de amido, sacarose e frutose mais elevados, conferindo sabor mais adocicado (Mendonça e Panizzi, 2003). A soja verde apresenta grãos com boa aparência, considerados com melhor sabor e textura, necessitam menor tempo de cozimento, devido principalmente aos níveis mais altos de ácido fítico, que torna os grãos tenros e de cocção rápida (Charlo et al, 2008).

Uma maneira de melhorar a qualidade sensorial de extrato solúvel de soja é através da fermentação láctica, aliada à suplementação com sacarose. (Behrens, Roig, Silva, 2004). O processo tecnológico da fermentação é conhecido por aumentar o valor nutricional e, ao mesmo tempo, melhorar a aceitabilidade dos produtos derivados da soja. (Rossi *et al.*, 1999).

A adição de microrganismos probióticos ao extrato hidrossolúvel de soja aumenta as propriedades funcionais da bebida fermentada. A definição que é atualmente aceita internacionalmente para probióticos é de “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). O alimento que contiver probióticos é considerado funcional, ou seja, alimentos que além de

possuírem o fator nutricional também apresentem característica de promover a saúde (Sanders, 1998; Roberfroid, 2007).

Para um produto ser considerado probiótico, deve oferecer uma quantidade mínima de  $10^8$  a  $10^9$  UFC bactérias probióticas na porção diária (Brasil, 2008).

A combinação de ingredientes prebióticos, como fruto-oligossacarídeo e inulina, e microrganismos probióticos, também tem sido uma estratégia utilizada a fim de agregar propriedades funcionais aos alimentos.

Os prebióticos são definidos como ‘ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal e resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro’ (Roberfroid, 2007; Wang, 2009).

Os ingredientes prebióticos, além dos benefícios à saúde, podem também auxiliar a sobrevivência de bactérias probióticas no alimento durante a estocagem e durante a passagem pelo trato gastrintestinal (Oliveira e Jurkiewicz, 2009).

Produtos derivados da soja têm se revelado veículos apropriados de culturas probióticas. O grão de soja é rico em proteínas de alta qualidade e, também, contém oligossacarídeos, como a rafinose e a estaquiase, que não são digeridos pelos humanos, mas são metabolizados por bactérias probióticas (Liener, 1994). A fermentação do extrato solúvel de soja com bactérias probióticas traz benefícios múltiplos, no sentido de reduzir os oligossacarídeos causadores de flatulência e conservar melhor o produto, contribuindo também, para a saúde do consumidor (Champagne, Gardner, Roy, 2005).

Tendo em vista a demanda por produtos alternativos ao leite, e a crescente busca por produtos que confirmem saudabilidade por parte dos consumidores, o desenvolvimento de um produto simbiótico com base em soja verde é extremamente interessante, pois além de ser um produto inovador, ainda não existente no Brasil, une os benefícios do consumo da soja com a adição de substâncias prebióticas e microrganismos probióticos.

De forma a combinar os benefícios à saúde do consumo de soja verde e de microrganismos probióticos, este projeto tem como objetivos: desenvolver o processo de obtenção de extrato hidrossolúvel de soja verde de modo a atingir a concentração mínima de 3,0% de proteínas, exigida pela legislação brasileira (Brasil, 2005); avaliar o processo de fermentação e a viabilidade de bactérias probióticas na bebida fermentada produzida com extrato hidrossolúvel de soja verde.

## **Material e Métodos**

### Grãos de soja verde

Foram utilizados os grãos pré-cozidos e congelados, importados da China, da marca Veggie, comercialmente disponíveis e os grãos da cultivar BRS 232, fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, branqueados em água fervente por 5 min e mantidos congelados.

### Processo padrão para preparo do extrato hidrossolúvel de soja

O processo inicial (denominado processo padrão) para obtenção do extrato hidrossolúvel de soja verde teve como referência a metodologia desenvolvida por Batistini *et al*, 2011.

Os grãos de soja foram macerados em água fervente por 5 minutos (1 L de água para 300 g de grãos) e a água descartada.

A cominuição dos grãos de soja cozidos foi realizada em liquidificador, utilizando a proporção mássica de três partes de soja para sete partes de água filtrada.

A mistura foi filtrada em chapéu chinês, onde boa parte dos sólidos em suspensão, principalmente as fibras insolúveis, foi removida. O filtrado obtido é o extrato hidrossolúvel de soja.

### Otimização do processo de produção do extrato hidrossolúvel de soja verde

Foi utilizada a soja da marca Veggio na proporção de 1:3 (uma parte de soja para três partes de água). A preparação do extrato foi realizada segundo procedimento a seguir.

Foram transferidos para o homogeneizador (Thermomix, Vorweker), 450 mL de água filtrada que foi aquecida a uma temperatura estabelecida para o ensaio, conforme apresentado na tabela 1. Para as temperaturas abaixo da ambiente, a água foi previamente resfriada. Quando a temperatura da água atingia o valor estabelecido, 150 g de soja verde da marca Veggio, previamente descongelada, eram adicionados. A soja foi triturada por três minutos na velocidade 10 do Thermomix, correspondente a aproximadamente 10.000 rpm, e mantida sob agitação na velocidade de aproximadamente 100 rpm pelo tempo estabelecido para o ensaio, conforme tabela 1.

A temperatura da mistura soja e água foi determinada antes do início da trituração, ao final de três minutos da trituração e após o tempo de agitação.

A soja triturada foi filtrada em peneira de 500 mesh e em seguida em peneira de 355 mesh. O filtrado obtido foi denominado extrato hidrossolúvel de soja verde. A massa de extrato e de resíduo retido em ambas as peneiras foi determinada para posterior realização do balanço de massa. O teor de proteína foi determinado no extrato hidrossolúvel de soja e no resíduo para todas as condições avaliadas.

Os experimentos foram realizados em duplicata de acordo com um planejamento Composto Central para duas variáveis. A tabela 1 apresenta os níveis estudados das duas variáveis e as condições dos nove tratamentos realizados.

Tabela 1 – Níveis das variáveis avaliadas e as condições experimentais dos nove tratamentos realizados.

Tratamento	Variável Temperatura ( $X_1$ )		Variável tempo ( $X_2$ )	
	Níveis codificados	Níveis reais ( $^{\circ}\text{C}$ )	Níveis codificados	Níveis reais (min)
A0	-1	25	-1	5
C0	1	85	-1	5
A1	-1	25	1	15
C1	1	85	1	15
D1	0	55	-1,41	0
D3	0	55	1,41	20
E1	-1,41	13	0	10
F1	1,41	97	0	10
D2	0	55	0	10

### Avaliação da velocidade de trituração dos grãos de soja no teor de proteínas do extrato hidrossolúvel

A produção do extrato hidrossolúvel de soja verde foi realizada utilizando a velocidade de trituração 10 e 7 correspondentes à aproximadamente 10.000 e 5.600 rpm.

A determinação da granulometria do resíduo foi determinada de acordo com o seguinte procedimento:

O resíduo foi transferido para uma placa de vidro de 15 cm de diâmetro juntamente com esferas de vidro e a massa determinada.

As placas foram colocadas em uma estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  e a cada hora a mistura foi revolvida com o auxílio de um bastão de vidro. O resíduo e as esferas de vidro foram transferidos para um conjunto de peneiras vibratórias, na qual as aberturas das malhas variaram de 0,212 a 2,00 mm e mantidos sob agitação por 30 minutos. A massa de resíduo retida em cada peneira foi determinada.

### Processo de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja

Ao extrato hidrossolúvel de soja verde (Veggie e Embrapa) produzido de acordo com o processo padrão, foi adicionado 8,0% do prebiótico FOS (Orafti®P 95, Beneo Orafti). Após a adição de FOS, o extrato foi pasteurizado a 75 °C por 15 s, resfriado a 37 °C e inoculado com a cultura ABT-4 (Chr. Hansen), composta por: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Streptococcus thermophilus*, na concentração de 0,02%. Como controle, foi realizada a fermentação do extrato sem a adição de prebiótico.

O extrato inoculado foi incubado a 37 °C em estufa, e a fermentação monitorada através das análises de pH e acidez titulável, até atingir pH entre 4,7 e 4,8.

Após a fermentação, o extrato foi armazenado a 5 °C. As análises microbiológicas, de pH e de acidez titulável, foram realizadas a cada 7 dias.

### Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas na bebida fermentada, conforme descrito por Oliveira e Jurkiewicz (2011), após 1, 8, 15, 22 e 28 dias de armazenamento da bebida a 5 °C.

Para o preparo da amostra foi utilizado 10 g de bebida, diluída em 90 g de solução salina 0,95% estéril. A mistura foi homogeneizada em Stomacher (Seward) por 1 minuto à 260 rpm. Em seguida, foram realizadas as sucessivas diluições, utilizando 10 mL da diluição anterior em 90 mL de solução salina 0,95% estéril.

Para a análise de *Bifidobacterium animalis* foi utilizada a técnica de inoculação em profundidade. Foi utilizado o agar MRS (Oxoid) suplementado com 0,5% de solução de dicloxacilina sódica monohidratada a 0,01%, 1,0 % de solução de cloreto de lítio a 10% e 0,5% de solução de L-cisteína a 10%. As placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) a 37 °C durante 72 horas.

Para a análise de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizada a técnica de inoculação em superfície. Adicionou-se 0,1 mL da amostra diluída na superfície do agar MRS (Oxoid), espalhando-a com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) a 43 °C durante 72 horas em estufa incubadora B.O.D.

Para a análise de *Streptococcus thermophilus* foi utilizada a técnica de inoculação em profundidade com adição de sobrecamada. Adicionou-se 1 mL da amostra diluída na placa de Petri e verteu-se o meio de cultura Agar M17 (Oxoid) adicionado de 5% de solução de lactose a 10%. Após a solidificação adicionou-se uma pequena camada de meio. As placas foram incubadas a 37 °C durante 72 horas.

### Análises físico-químicas

O pH e a acidez titulável, expressa em % de ácido láctico, do extrato hidrossolúvel de soja verde, foram determinadas conforme descrito na A.O.A.C. (1995) e Instituto Adolfo Lutz (2008, p. 103), respectivamente.

O teor de umidade no grão de soja verde foi determinado segundo análise de secagem direta em estufa a 105 °C (Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 98).

Para a determinação do teor de proteínas no grão e no extrato hidrossolúvel de soja verde foi utilizado o método de Kjeldahl modificado (Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 124). Em tubos de digestão, foi adicionado 0,3 g amostra, 1,5 g de catalisador e 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Os tubos foram colocados no digestor em temperatura baixa, e depois elevada gradativamente até 300-400 °C. A digestão foi acompanhada até obter uma solução límpida e translúcida, sem pontos pretos. As amostras digeridas foram neutralizadas com solução de NaOH 50% e destiladas até obter 100 mL de destilado. O destilado foi titulado com HCl 0,02 mol/L até viragem para cor original do indicador fenolftaleína. A conversão de nitrogênio em proteína foi realizada pelo uso do fator 6,25 (Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 122; ANVISA, 2005).

## Resultados e Discussão

### Teor de umidade e proteína nos grãos de soja verde

O teor de umidade determinado para a soja Veggie foi de 70,1% e de proteína  $13 \pm 2\%$  em base úmida. Para a soja da variedade BRS 232, da Embrapa, o teor de umidade obtido foi de 67,1 % e de proteínas de  $12,2 \pm 0,4$ .

### Influência da temperatura da água e do tempo de agitação no teor de proteínas do extrato hidrossolúvel de soja verde

O teor de proteína no extrato hidrossolúvel de soja importada da China (Veggie), produzido de acordo com o método padrão foi de  $(3,11 \pm 0,08) \%$ . Para os extratos produzidos de acordo com as condições descritas na tabela 1, os teores de proteína e massa de extrato estão apresentados na tabela 2. Os teores de proteínas e as massas de resíduo dos diferentes processos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2 - Teor de proteína no extrato hidrossolúvel de soja e massa de extrato obtida nos diferentes processos de obtenção de extrato hidrossolúvel de soja verde.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	% Proteína no extrato		Massa extrato (g)	
A0	25	5	2,82	3,15	461	490
C0	85	5	3,28	3,39	384	423
A1	25	15	2,74	3,02	461	492
C1	85	15	3,29	3,44	427	433
E1	13	10	2,33	2,74	476	461
F1	97	10	3,32	3,29	381	*
E1	55	3	3,13	2,97	463	427
D1	55	17	2,58	2,89	*	459
D2	55	10	2,86	3,45	454	422
D2	55	10	3,29	3,21	444	466

\*valores não determinados

Tabela 3. Teor de proteína no resíduo e massa de resíduo obtida nos diferentes processos de obtenção de extrato hidrossolúvel de soja verde.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	% Proteína no resíduo		Massa resíduo (g)	
A0	25	5	4,32	4,14	74	89
C0	85	5	3,06	3,83	142	144
A1	25	15	3,23	4,22	99	83
C1	85	15	*	3,81	122	130
E1	13	10	4,36	3,81	83	115
F1	97	10	3,58	3,77	137	166
E1	55	3	4,08	3,66	90	140
D1	55	17	*	3,97	*	112
D2	55	10	*	4,03	111	161
D2	55	10	4,26	4,12	141	83

A análise do Planejamento Composto Central mostrou que a temperatura da água influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de proteína nos extratos, a massa de extrato hidrossolúvel e a massa de resíduo. A temperatura também influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a massa de proteínas no extrato hidrossolúvel de soja, que foi calculada pela multiplicação da massa de extrato pelo seu teor de proteínas. Os fatores avaliados não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) a porcentagem de proteína no resíduo. O tempo de agitação do extrato não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ )

nenhuma das variáveis respostas analisadas. Os coeficientes dos termos considerados no modelo para cada variável resposta avaliada estão apresentados na tabela 4.

De acordo com os coeficientes dos modelos (tabela 4), verifica-se que o aumento da temperatura ocasiona um aumento linear na porcentagem de proteínas no extrato. A maior porcentagem de proteínas no extrato (entre 3,2 e 3,4 %) é obtida para temperaturas acima de 60°C (figura 1A).

Embora o teor de proteína no extrato seja maior para temperaturas mais elevadas, a massa de extrato hidrossolúvel diminui linearmente com o aumento da temperatura, o que pode ser observado pelos coeficientes do modelo para esta variável (tabela 4). Para determinar a temperatura ótima para extração da proteína da soja verde foi calculada massa de proteínas no extrato. Os coeficientes do modelo e sua representação (figura 1B) permitem verificar que na faixa de temperatura entre 45°C e 65°C ocorre a maior extração de proteínas no extrato.

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes de regressão para as diferentes variáveis respostas.

Variável resposta	Termo	Coefficiente	p-valor
% proteína no extrato	constante	3,06	
	temperatura	0,24	0,001
	tempo	-0,07	0,254
Massa de extrato (g)	constante	443	
	temperatura	-28,4	0,000
Massa de resíduo (g)	constante	116,9	
	temperatura	21,4	0,001
Massa proteína no extrato (g)	constante	14,3	
	temperatura (linear)	-0,033	0,914
	tempo	0,119	0,716
	temperatura (quadrático)	-0,957	-0,021

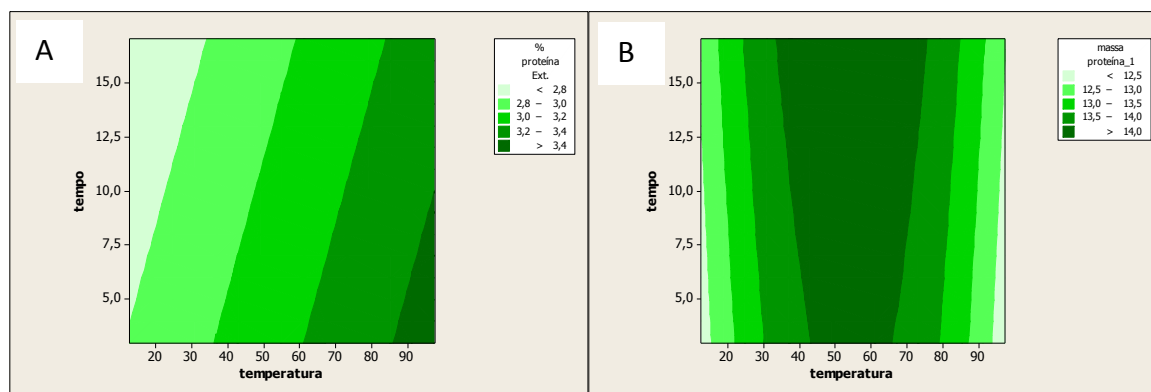


Figura 1. A- % de proteína no extrato no extrato hidrossolúvel de soja. B- Massa de proteína no extrato hidrossolúvel de soja em função da temperatura da água e tempo de agitação.

#### Influência da velocidade de trituração no teor de proteínas do extrato de soja

Para o tratamento C0 foi avaliada a influência da velocidade de trituração (10.000 e 5.600 rpm) no teor de proteínas no extrato hidrossolúvel de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados na tabela 5.

A partir da análise estatística Teste-t, verificou-se que o aumento da velocidade de trituração dos grãos não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) o teor de proteínas nos extratos de soja hidrossolúvel, que atingiu cerca de 3,3% (Tabela 5).

Tabela 5 – Teor de proteína nos extratos e granulometria dos resíduos nos processos realizados com diferentes velocidades de trituração.

Velocidade rpm	% Proteína no extrato	Área Superficial partícula (cm <sup>2</sup> /g)	Número médio de partículas (partículas/g)	Diâmetro médio de partículas (mm)
5.600	3,2±0,1	54	8,3·10 <sup>3</sup>	74
10.000	3,3±0,1	69	1,7·10 <sup>4</sup>	58

O aumento da velocidade de trituração dos grãos aumentou o número de partículas no resíduo e a área superficial das partículas. Por outro lado, observou-se que o diâmetro médio das partículas foi reduzido em cerca de 22 % com o aumento da velocidade de trituração de 5600 para 10000 rpm.

#### Fermentação do extrato de soja e sobrevivência das bactérias probióticas durante o armazenamento da bebida

A variação do pH e da acidez titulável, expressa em % de ácido lático, durante o processo de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja verde, contendo ou não o prebiótico (FOS) nas duas variedades de soja verde estudadas, estão apresentadas nas figuras 2 e 3, respectivamente:

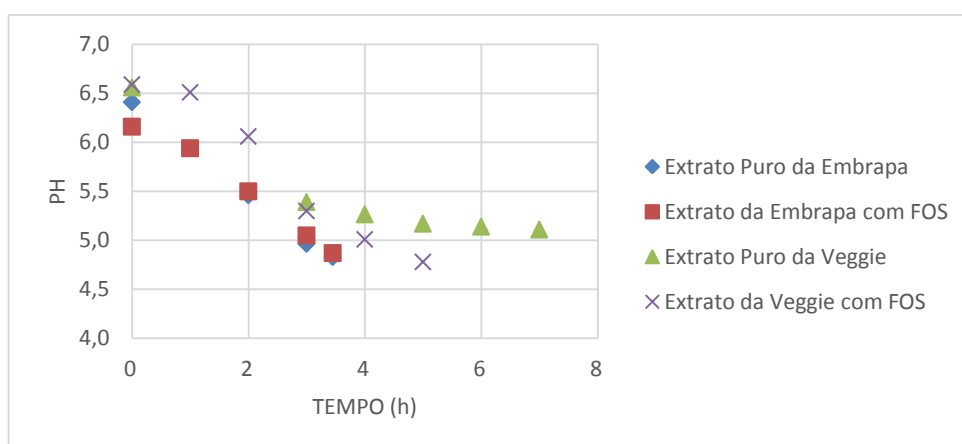


Figura 2 - Variação do pH durante a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja verde.

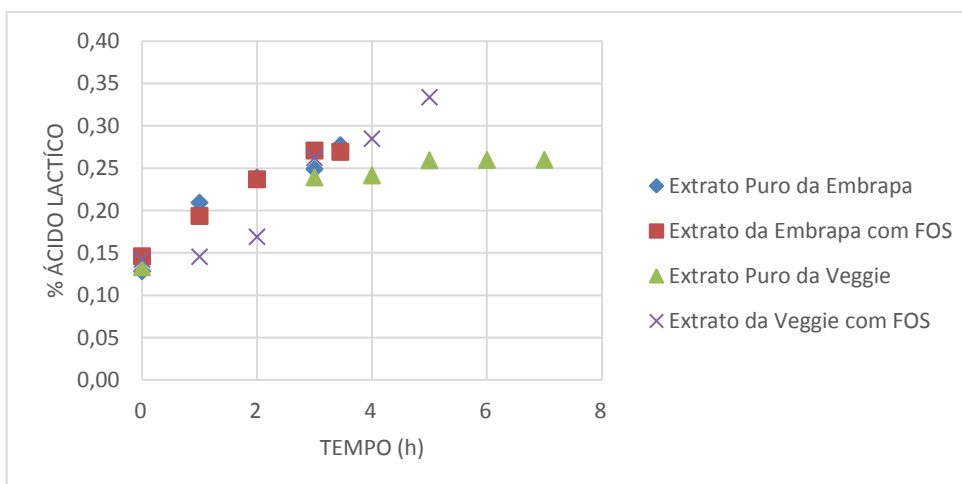


Figura 3 - Variação da acidez titulável, expressa em % de ácido lático durante a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja verde.

A variação do pH do extrato hidrossolúvel de soja verde da Embrapa com ou sem adição de FOS apresentaram comportamento muito semelhante durante a fermentação pela cultura ABT. O extrato da marca Veggie com adição de FOS apresentou um tempo de fermentação superior, cerca de 5 h, em relação aos extratos produzidos com a soja da Embrapa, cerca de 3 h e 45 min, (figura 2). O extrato da marca Veggie sem adição de FOS não atingiu pH de 4,8 mesmo após 7 h de fermentação.

A acidez final do extrato de soja verde da Embrapa fermentado com FOS foi de 0,27% e a acidez do extrato sem adição de prebiótico estabilizou em 0,28%, não diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ). O extrato puro da Veggie obteve os menores valores de acidez, onde o valor final foi de 0,26%, e o extrato fermentado da Veggie com prebiótico resultou nos maiores valores de acidez, 0,33% (figura 3). Esses resultados indicam que o extrato de soja verde apresenta deficiência em nutrientes, impedindo que os micro-organismos metabolizem os carboidratos, convertendo-os em ácido lático.

Nas figuras 4, 5 e 6 estão apresentadas as contagens de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Streptococcus thermophilus*, respectivamente, durante o armazenamento a 5 °C das bebidas fermentadas de extrato de soja verde.

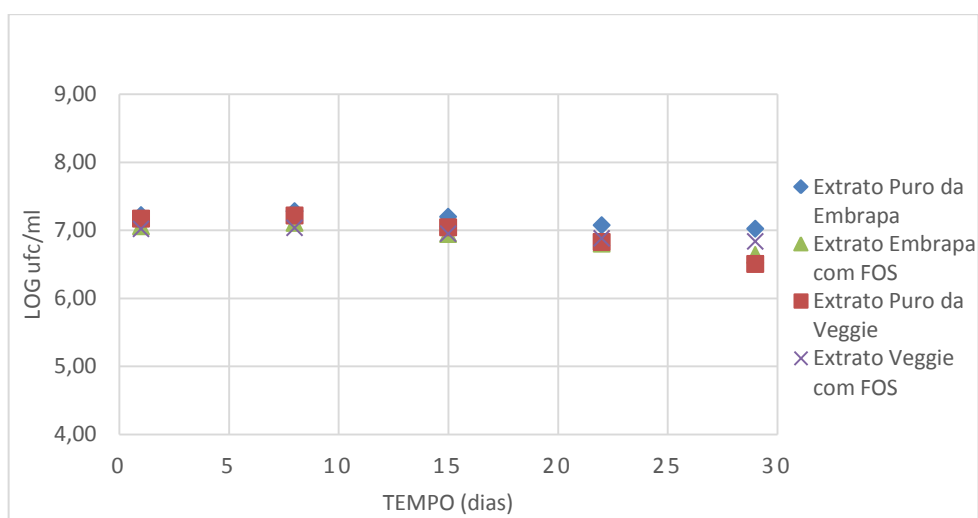


Figura 4 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus*, durante o armazenamento a 5 °C das bebidas fermentadas de soja verde.

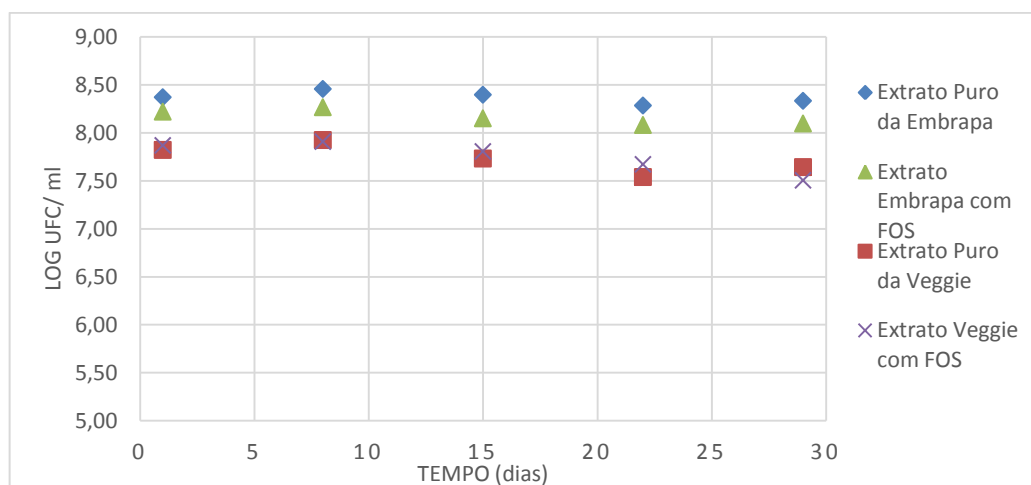


Figura 5 - Contagem de *Bifidobacterium animalis*, durante o armazenamento a 5 °C das bebidas fermentadas de soja verde.



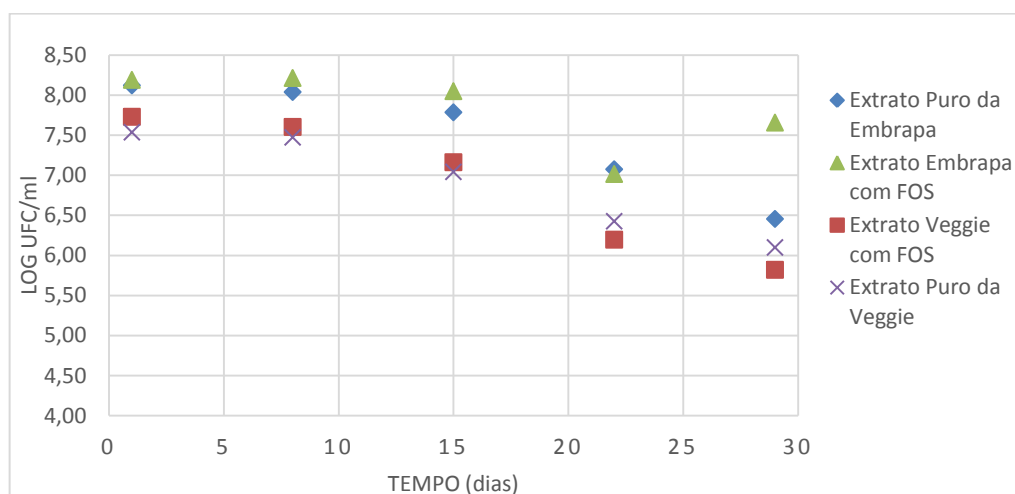


Figura 6 - Contagem de *Streptococcus thermophilus*, durante o armazenamento a 5 °C das bebidas fermentadas de soja verde.

Os extratos fermentados com e sem prebiótico apresentaram uma contagem inicial de *Lactobacillus acidophilus* de aproximadamente 7 log UFC/mL, não havendo diferença significativa entre as sojas e a adição ou não de prebióticos. Durante os 22 dias de armazenamento a redução de microrganismos não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Para a população de *Bifidobacterium animalis* a contagem inicial foi maior no extrato produzido com a soja Embrapa com cerca de 8,3 log UFC/mL e o extrato com soja Veggie obteve contagem inicial de 7,8 log UFC/mL. A adição de FOS não influenciou significativamente a população de *B. animalis* para ambas as variedades de soja. A contagem inicial de *S. thermophilus* na bebida produzida com soja da Embrapa era de 8,2 log UFC/mL enquanto na bebida com soja Veggie, cerca de 7,5 log UFC/mL. A redução da população de *S. thermophilus* durante os 29 dias de armazenamento, foi maior na bebida com soja Veggie.

## Conclusões

A temperatura da água na etapa de trituração dos grãos de soja verde na produção do extrato hidrossolúvel influencia significamente a porcentagem de proteínas no extrato, a massa de extrato hidrossolúvel e a massa de resíduo. A faixa de maior extração de proteína encontra-se entre 45°C e 65°C. O tempo de agitação do extrato, antes da filtração, não influencia significativamente o teor de proteínas no extrato.

O aumento da velocidade de trituração do grão de soja não influencia significamente no teor de proteína do extrato, e sim no diâmetro médio das partículas.

A adição do prebiótico (FOS) ao extrato hidrossolúvel de soja verde da variedade chinesa foi necessária para a fermentação e redução do pH até 4,8. O prebiótico não influenciou a fermentação do extrato produzido com soja da Embrapa. A população das bactérias *L. acidophilus* e *B. animalis* permaneceu acima de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL, respectivamente, durante os 29 dias de armazenamento das bebidas.

## Referências Bibliográficas

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária -. Resolução RDC n. 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis”. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18. Ed. Maryland: AOAC International, 2011.

- Battistini, C.; Koga, C. Y.; Ichimura, E. S.; Arakelian, M. M. Desenvolvimento de bebida fermentada simbiótica com base em soja verde sabor melão. Trabalho de Conclusão de Curso. São Caetano do Sul, SP. CEUN-IMT, 2011, 93p.
- Behrens, J.H.; Roing, S.M.; Silva, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. *Acta Aliment*, v.33, p.101-109, 2004.
- Brasil (2011). Alimentos com Alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas, 2008. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em 11 jul. 2014.
- Charlo, H. C. de O. et al. Desempenho de genótipos de soja-hortaliça de ciclo precoce [Glycine max (L.) Merrill] em diferentes densidades. *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v.32, n.2, p. 630-634, mar./abr., 2008.
- Champagne, C. P.; Gardner, N. J.; Roy, D. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, p. 61-84, 2005.
- Fao; Who Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, 2002.
- Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1 ed., Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2008. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br>. Acesso em 02 set. 2013.
- Liener, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.34, p.31-67, 1994.
- Mendonça, J. L.; Carrão-Panizzi, M. C. Comunicado técnico. Embrapa, Brasília, DF, 2003.
- Oliveira, L. B.; Jurkiewicz, C. H. Influência de inulina e goma acacia na viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado simbiótico. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 2, p. 138 – 144, 2009.
- Roberfroid, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 11, p. 2493S-2502S, 2007.
- Rossi, E.A.; Vendramini, R.C.; Carlos, I.Z.; Pei, Y.C.; Valdez, G.F. Development of novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *Eur. Food Res. Technol.*, v.209, p. 305-307, 1999.
- Saldivar, X.; Wang, Y.; Chen, P.; Hou, A. Changes in chemical composition during soybean development. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1369 – 1375, 2011.
- Sanders, M. E. Overview of Functional Foods: Emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v. 8, n. 5-6. Glencoe Ct., Littleton, 1998.
- Sicherer, S. H.; Sampson, H. A. Food allergy. *J. Allergy Clin Immunol*, v. 125, n. 2, p. 118, 2010.
- Smiderle, O. J. Soja verde para alimentação humana - alternativa para agricultura familiar. Roraima, 2006. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br>>. Acesso em: 22 jul. 2014.
- Wang, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, v. 42, p. 8-12, 2009.