

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO, COR E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA PROBIÓTICA PRODUZIDA COM EXTRATO DE SOJA VERDE

Augusto Tiberio Figueira¹, Cynthia Jurkiewicz Kunigk²

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

² Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Bebidas probióticas a base de soja tem sido uma alternativa aos leites fermentados. Considerando a soja verde como um novo ingrediente para a produção de bebida fermentada probiótica, esse trabalho teve como objetivo comparar os teores de açúcares, amido, cor, viabilidade de bactérias probióticas e aceitação sensorial de extratos hidrossolúveis de soja verde e madura fermentados por microrganismos probióticos. Os resultados mostraram teores mais elevados de sacarose e amido nos grãos de soja verde em relação à soja madura, e redução de 54% do teor de sacarose e de 10 vezes do teor de amido durante o amadurecimento. No extrato produzido com soja verde, o teor de sacarose foi cerca de 4,3 vezes maior que no extrato produzido com soja madura, enquanto os teores de frutose e glicose não apresentaram diferença significativa entre os dois extratos. Houve diminuição significativa da coloração verde da bebida logo na primeira semana, enquanto a amostra só escureceu de forma significativa após um mês de armazenamento. As contagens dos microrganismos probióticos se mantiveram acima de 10^7 UFC/ml durante todo o período de armazenamento, indicando a viabilidade do meio para a sobrevivência das bactérias. A análise sensorial não mostrou preferência significativa entre as bebidas de soja verde e madura..*

Introdução

A soja, devido às suas propriedades funcionais e nutricionais, tem crescido em interesse pelos consumidores e pela indústria de alimentos nas mais diversas aplicações, sendo uma das safras mais difundidas graças à abundância de elementos nutritivos, como proteínas, ácidos graxos insaturados, lecitina, isoflavonas, aminoácidos livres, polipeptídeos e minerais diversos (Yang e Li, 2010).

Como substituinte de derivados de leite, o extrato hidrossolúvel de soja, tem sido utilizado no desenvolvimento de novos produtos. Uma vez que produtos a base de soja ainda apresentam certa restrição pelos consumidores no ocidente, uma forma de melhorar sua aceitação é a fermentação com bactérias probióticas, que ao mesmo tempo, aumenta o valor nutricional do produto (Rossi et al., 1999). Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem ser utilizadas para tal processo, promovendo a diminuição do sabor residual do grão e dos teores de oligossacarídeos não digeríveis, como rafinose e estequiose (Hou et al., 2000).

O interesse pela soja verde também tem aumentado por consumidores que buscam uma alimentação saudável, mas que ao mesmo tempo procuram melhores características sensoriais (Saldivar et al., 2011). A soja verde ou “edamame” é colhida quando os grãos ainda estão imaturos, resultando em um produto com teores mais elevados de açúcares, menor teor de oligossacarídeos de difícil digestão, estaquiose e rafinose, e características sensoriais superiores ao do grão maduro (Redondo-Cuenca et al., 2006).

Embora a soja verde seja uma nova opção de consumo, atualmente não existem alimentos produzidos com seu extrato hidrossolúvel. Dessa forma, torna-se interessante a produção de uma bebida a base de soja verde probiótica, uma vez que ela permite aliar as características da soja verde aos benefícios dos microrganismos probióticos, melhorando os atributos sensoriais do mesmo e conferindo benefícios à saúde.

Visando a soja verde para a produção de bebida fermentada probiótica, esse trabalho teve como objetivo comparar os teores de açúcares, amido, cor, viabilidade de bactérias probióticas e aceitação sensorial de extratos hidrossolúveis de soja verde e madura fermentados por microrganismos probióticos.

Material e Métodos

Grãos de soja verde e madura

Foram utilizados grãos de soja BRS 232, colhidos no estadio de maturação R6 (soja verde) e R8 (soja madura), fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Os grãos de soja verde foram liofilizados em liofilizador (Enterprise I, Terroni) e armazenados sob refrigeração e os grãos de soja madura armazenados em temperatura ambiente.

Os grãos de soja utilizados para a análise de açúcares, amido, foram triturados e peneirados em peneira de 500 µm de abertura de malha.

Produção dos extratos de soja

Para o preparo do extrato de soja madura, a soja foi macerada por 2 horas, a 80°C, e a água descartada. Os grãos foram triturados em liquidificador com água mineral, na proporção de 6 partes de água para uma parte de soja. Em seguida, a mistura passou por tratamento térmico a 100°C durante 10 minutos em Thermomix (Vorwerk, Alemanha), sendo posteriormente filtrado em peneira de abertura de malha de 500 µm. O filtrado foi pasteurizado a 95°C por 5 minutos também em Thermomix.

Para o preparo do extrato de soja verde, os grãos foram hidratados por 10 minutos em água mineral, a temperatura ambiente, e separados em uma peneira. A seguir, foi feita a cominuição dos grãos em água, na proporção de 1 parte de grãos hidratados para 2,4 partes de água mineral, em homogenizador (Thermomix, Vorwerke) na velocidade 10 (10.200 rpm) por 3 minutos em temperatura de 90°C. A mistura permaneceu em agitação por 2,5 minutos a 90°C e por mais 2,5 minutos a 80°C, e foi filtrada em peneiras com abertura de malha de 500 e 350 µm.

Para a fermentação dos extratos, foi utilizada a cultura láctica liofilizada ABT-4 (Christian Hansen, Dinamarca), na concentração de 0,02%, composta por *Lactobacillus acidophilus* (La-5), *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Streptococcus thermophilus*. Os extratos foram incubado a 37°C até que o pH atingisse 4,7 a 4,8.

Os extratos hidrossolúveis e os extratos fermentados utilizados para a análise de açúcares e amido foram liofilizados, e peneirados em peneira de 500 µm de abertura de malha.

Avaliação do teor de sacarose, D-glicose e D-frutose

A análise de açúcares foi realizada utilizando o kit SUCROSE, D-FRUCTOSE AND D-GLUCOSE, da empresa Megazyme International. Uma amostra de 1 g foi adicionada a um balão volumétrico de 100 ml contendo 60ml de água destilada e mantido a temperatura de 60 °C. Ao balão foram adicionados 5 ml de uma solução de hexaferrocianeto de potássio (36,0 g.L⁻¹), 5ml de uma solução de sulfato de zinco heptahidratado (7,20 g.L⁻¹) e 10 ml de uma solução de hidróxido de sódio (0,1 mol.L⁻¹), a fim de clarificar a amostra, e eliminar possíveis interferência durante a análise espectrofotométrica. O volume do balão foi completado com água destilada, homogenizado e seu conteúdo filtrado e separado. Todas as amostras foram analisadas em banho termostático a 27 °C e as determinações de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro UV-VIS (CARY 1E, VARIAN)

Para a análise de sacarose, inicialmente foi adicionado 0,20 ml de solução de β-frutosidase (pH 4,6) e 0,10 ml da amostra filtrada, em uma cubeta de plástico UV (Brand).

A a mistura foi homogenizada por inversão e incubada por 5 minutos. A seguir, foi adicionado 1,90 ml de água destilada, 0,10 ml de solução tampão (pH 7,6) e 0,10 ml de solução de NADP⁺ e ATP, homogenizada novamente e incubada por 3 minutos, e realizada a leitura de absorbância. Após a leitura, 0,02 ml de solução de hexokinase e glicose-6-fosfato dehidrogenase foram adicionados, e a solução foi incubada por 5 minutos, tendo sua absorção lida em seguida.

As análises de glicose e frutose foram realizadas simultaneamente. Em cubeta plástico UV (Brand), foi adicionado 0,10 ml da amostra filtrada, 2,10 ml de água destilada, 0,10 ml de solução tampão (pH 7,6) e 0,10 ml da solução de NADP⁺ e ATP. Foi realizada a homogeneização e a leitura de absorbância após 3 minutos de incubação. A seguir, foi adicionado 0,02 ml da suspensão de hexokinase e glicose-6-fosfato dehidrogenase, e a leitura da absorbância após 5 minutos de incubação. Por fim, 0,02 ml de uma suspensão de fosfoglicose isomerase foi adicionada, e uma terceira leitura da absorbância foi realizada após 10 minutos de incubação.

Para ambas as análises foi feito um branco, substituindo a amostra por água destilada.

Avaliação do teor de amido total

A análise de amido total foi realizada nos grãos de soja verde e madura pelo método de amiloglicosidase/ α -amilase utilizando o kit TOTAL STARCH, da empresa Megazyme International.

Uma amostra de 100 mg foi adicionada em tubo plástico de centrífuga com 5,0 ml de álcool etílico (80% v/v), incubada a 85 °C por cinco minutos e agitada em vórtex. Mais 5,0 ml de álcool foram adicionados ao tubo, e esse foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 10 ml de álcool etílico (80%) foi adicionado, seguido de agitação em vórtex e uma segunda centrifugação. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 3 ml de uma solução contendo α -amilase termoestável e o tubo foi incubado em banho fervente por 20 minutos, com agitação em vórtex a cada 4 minutos a fim de homogenizar totalmente seu conteúdo. O tubo foi transferido para um banho a 50 °C até sua temperatura estabilizar, e 0,1 ml de uma solução de amiloglicosidase foi adicionada. O tubo foi agitado em vórtex e incubado por 30 minutos. O volume do tubo foi completado com água destilada até atingir a marca de 10 ml, e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,10 ml foi retirada em duplicata e adicionada a tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado 3,0 ml de reagente GOPOD e incubado no escuro a 50 °C por 20 minutos. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Cary 1E, Varian Inc.).

Análise de umidade

A análise de umidade foi feita pelo método de Karl Fischer, (Metrohm AG, Titrino plus 870). Uma massa de 200 mg de amostra foi adicionada ao equipamento em triplicata, e o valor de umidade foi obtido a partir de uma média de três leituras.

Análise da Cor do Extrato de Soja Verde

A cor do extrato hidrossolúveis de soja verde fermentado foi determinada em intervalos de 7 dias, durante 30 dias de armazenamento a 4°C. Os parâmetros L*, a* b*, do sistema CIELAB, foram determinados com o espectrofotômetro Color Quest XE (HunterLab, Alemanha). Foram realizadas medidas de 3 amostras independentes de cada extrato e para cada amostra foram feitas três leituras dos parâmetros L*, a* e b* em cubeta de quartzo com capacidade de 20 mL.

Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no extrato já fermentado a fim de monitorar o número de bactérias probióticas viáveis. Para tal, foi realizada uma análise a cada 7 dias, num período de 5 semanas, iniciando no dia seguinte ao extrato ser fermentado.

Amostras de 10g do extrato fermentado, foram diluídas em 90g de solução salina 0,85% e homogeneizado em Stomacher (Seward) a 260 rpm durante 1 minuto. Foram preparadas diluições decimais sucessivas em solução salina 0,85%.

Para a contagem de *Bifidobacterium animalis*, foi utilizado o meio de cultura ágar MRS (Oxoid), suplementado com 0,10% de cloreto de lítio, 0,5% de solução de dicloxacilina sódica monohidratada (10mg/100ml) e 0,05% de L-cisteína. A inoculação foi feita em profundidade e as placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) durante 72 horas a 37°C (OLIVEIRA e JURKIEWICZ, 2009).

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado o meio de cultura ágar MRS (Oxoid), sem aditivos. A inoculação foi feita em superfície e as placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) por 72 horas a 43°C (OLIVEIRA e JURKIEWICZ, 2009).

Para a análise de *Streptococcus thermophilus* foi utilizado o meio de cultura ágar M17 (Oxoid) suplementado com 5% de solução de lactose a 10%. A inoculação foi feita em profundidade com a adição de sobrecamada. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C (APHA, 2001).

Análise sensorial

Para a realização da análise sensorial, foram produzidas bebidas com sabor abacaxí com hortelã, a partir dos extratos fermentados. A composição da bebida de soja verde consistiu de: 80,8% de extrato de soja verde, 12,0% de polpa de abacaxí (Demarchi), 7,0% de sacarose (União), 0,15% de aroma de abacaxí (Firmenich) e 0,05% de aroma de hortelã. A composição da bebida de soja madura diferiu apenas no conteúdo de extrato hidrossolúvel, que foi reduzido para 66,1% e foi adicionado 14,7 % de água potável, de modo que ambas as formulações apresentassem o mesmo teor de sólidos totais (4,0%).

A análise foi realizada pelo método afetivo, com 76 provadores não treinados de ambos os sexos e faixa etária entre 21 e 51 anos. Cada provador recebeu as duas amostras, com cerca de 30 g cada, separadamente, de forma aleatória. As amostras haviam sido produzidas 4 dias antes e foram mantidas refrigeradas a 4°C. Os provadores avaliaram os produtos quanto a consistência, sabor e opinião geral, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos, abrangendo atribuições entre desgostei extremamente (1) e gostei extremamente (9). Foi também questionada a frequência de consumo de bebidas a base de soja.

Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Teores de açúcares e amido nos grãos de soja e nos extratos hidrossolúveis

Os resultados dos teores de sacarose, glicose, frutose e amido nos grãos, e nos extratos hidrossolúveis estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Teor de sacarose, D-glicose, D-frutose e amido (em base seca) em grãos de soja.

Grão de soja	D-glicose (mg/g)	D-frutose (mg/g)	Sacarose (mg/g)	Amido (g/100g)
Verde	1,1 ^b ±0,2	2,6 ^a ±0,7	57 ^a ±3	3,6 ^a ±0,2
Madura	3,8 ^a ±0,6	0,9 ^b ±0,3	26 ^b ±3	0,3 ^b ±0,1

a, b – médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Médias de três réplicas autênticas.

Os grãos de soja verde apresentaram teores de sacarose, frutose e amido mais elevados que os observados para os grãos maduros, entretanto foi observado menor teor de glicose (Tabela 1). A maturação dos grãos reduziu o teor de sacarose em 54 % e o teor de amido em cerca de 10 vezes. Segundo Saldivar (2011) os teores de sacarose e amido para soja verde, determinados para diferentes cultivares, são em média (80 ± 15) mg/g e (10 ± 3) g/100g respectivamente, portanto maiores que os observados no presente estudo para a soja BRS 232,. Essa diferença pode ser atribuída a variedade da soja e ao grau de maturação, já que uma pequena diferenças no tempo de colheita do grão pode causar alterações significativas na composição de açúcares. Para a soja madura BRS 232, Oliveira et al. (2010), determinaram 53 mg/g de sacarose e 0,69 g/100g de amido, valores também superiores aos obtidos no presente estudo.

Tabela 2. Teor de sacarose, D-glicose, D-frutose e Amido (em base seca) em extratos de soja.

Soja	Extrato	D-glicose (mg/g)	D-frutose (mg/g)	Sacarose (mg/g)	Amido (g/100g)
Verde	Não Fermentado	2,4 ^a ±0,3	0,69 ^a ±0,06	51 ^a ±3	3,93 ^a ±0,08
Verde	Fermentado	0,7 ^b ±0,2	1 ^a ±1	3,9 ^c ±0,7	3,95 ^a ±0,06
Madura	Não Fermentado	2,10 ^a ±0,04	0,62 ^a ±0,03	12 ^b ±1	0,26 ^b ±0,04
Madura	Fermentado	0,69 ^b ±0,05	0,62 ^a ±0,04	3,9 ^c ±0,3	0,25 ^b ±0,02

O extrato hidrossolúvel produzido com grãos de soja verde apresentou um teor de sacarose 4,3 vezes maior que o valor determinado para extrato produzido com os grãos maduros, enquanto os teores de glicose e frutose não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Após a fermentação os teores dos açúcares não diferiram significativamente ($p > 0,05$) para as duas bebidas, enquanto o teor de amido não foi alterado em relação ao extrato não fermentado (Tabela 2).

Cor dos extratos fermentados durante o armazenamento

Os resultados das análises de cor do extrato de hidrossolúvel de soja verde fermentado e armazenado por 29 dias a 4°C, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros L*, a* e b* durante o armazenamento.

Tempo	L*	a*	b*	ΔE
1	76,1±0,1	-2,88±0,01	16,22±0,01	-
8	75,8±0,1	-0,95±0,01	16,51±0,08	1,96±0,02
15	75,6±0,1	-0,22±0,15	15,97±0,05	2,36±0,02
22	75,8±0,2	-0,16±0,08	15,79±0,01	2,52±0,02
29	75,4±0,2	0,09±0,12	15,80±0,07	2,63±0,03

Apenas após um mês de armazenamento houve diferença significativa no parâmetro L*, indicando um escurecimento nas amostras. Para o parâmetro a*, a diferença foi significativa a partir do sétimo dia, indicando a diminuição de intensidade do verde já uma semana após a produção. O parâmetro b* apresentou diferença significativa a partir da terceira semana, mostrando a diminuição de intensidade da cor amarela na bebida.

Contagem de microrganismos durante o armazenamento dos extratos

O resultado da contagem dos microrganismos probióticos e de *Sterptococcus thermophilus* no extrato fermentado armazenado por 29 dias a 4°C estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Contagem de microrganismos durante o armazenamento do extrato fermentado de soja verde e madura (em log UFC.g⁻¹).

Tempo (dias)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Bifidobacterium animalis</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
	Verde	Madura	Verde	Madura	Verde	Madura
1	7,72 ± 0,04	7,80 ± 0,05	8,57 ± 0,04	8,19 ± 0,09	8,6 ± 0,1	8,22 ± 0,06
29	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,4 ± 0,1	8,1 ± 0,2	8,4 ± 0,1	8,1 ± 0,2

As contagens de *Bifidobacterium animalis* permaneceram acima de 10⁸ UFC·ml⁻¹, nas bebidas produzidas com soja verde e madura, durante todo o período de armazenamento, indicando a viabilidade do meio para sobrevivência do microrganismo probiótico. O número de *L. acidophilus* também permaneceu estável durante o armazenamento nos dois extratos fermentados.

Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial estão apresentados na tabela 5 e nas Figuras 1, 2 e 3.

Tabela 5. Nota média para os atributos, sabor, consistência e opinião geral, para as bebidas produzidas com extrato de soja verde e soja madura.

Bebida	Sabor	Consistência	Opinião Geral
Soja Verde	5,4 ^a	6,0 ^a ±2	5,6 ^a
Soja Madura	6,0 ^a	5,6 ^a ±2	6,0 ^a

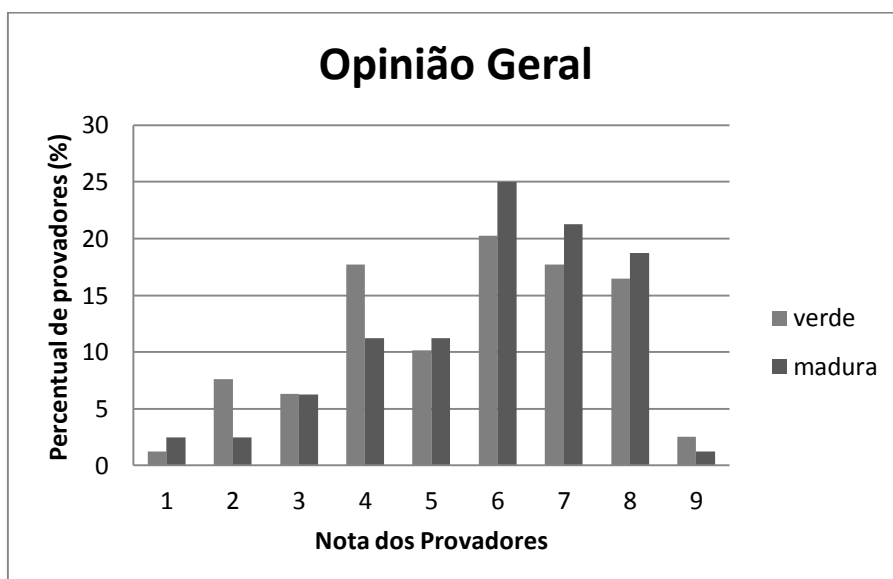


Figura 1 – Distribuição das notas da análise sensorial referente à opinião geral sobre as bebidas.

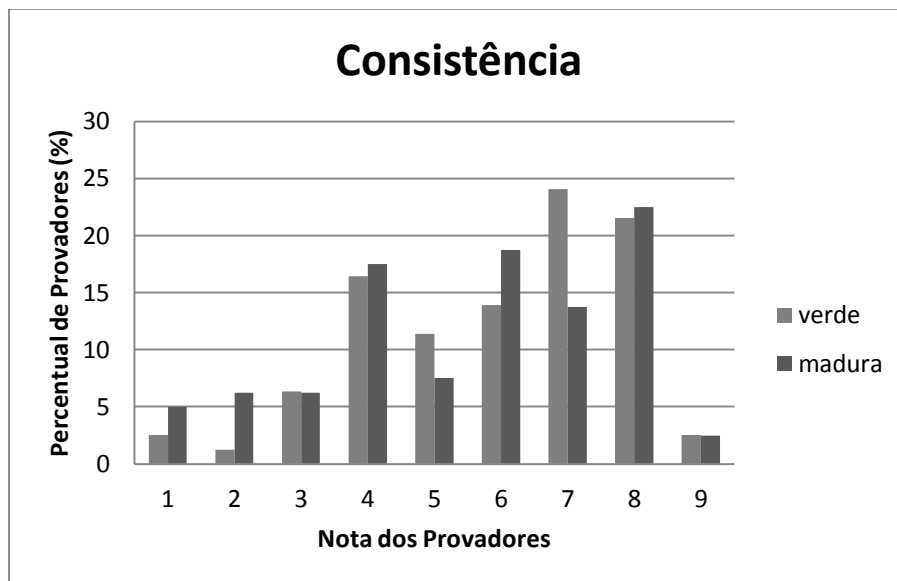


Figura 2 Distribuição das notas da análise sensorial referente à consistência das bebidas.

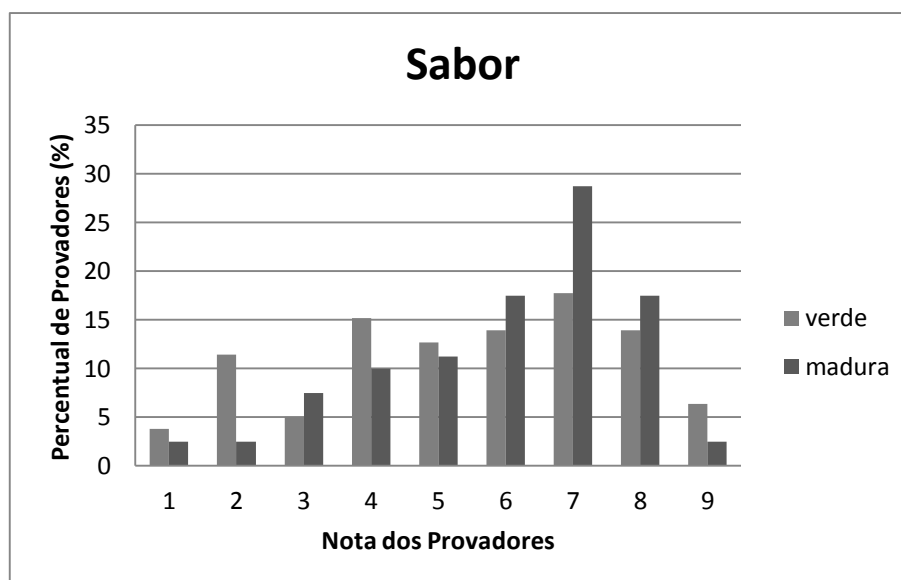


Figura 3 – Distribuição das notas da análise sensorial referente ao sabor das bebidas.

A análise sensorial mostrou aceitação regular das duas bebidas por parte dos provadores. A nota média acerca da opinião geral das bebidas produzidas com soja verde e madura foram 5,6 e 6,0, respectivamente, o que corresponde a “gostei ligeiramente” na escala hedônica de preferência. Para os três atributos avaliados, opinião geral, sabor e consistência, não foi verificada diferença significativa na preferência dos provadores, portanto a hipótese levantada inicialmente de que a bebida produzida com extrato de soja verde teria características sensoriais superiores às da bebida produzida com extrato de soja madura não foi confirmada.

Conclusões

O extrato hidrossolúvel de soja verde apresentou teor de açúcares mais elevado que o extrato produzido a partir de soja madura. Após a fermentação ambos os extratos apresentaram composição de açúcares e amido semelhantes e contagem de células viáveis de probióticos muito próximas. As bebidas produzidas a partir dos extratos fermentados não

diferiram em relação à preferência dos provadores. Durante o armazenamento o extrato de soja verde apresentou alteração de cor.

Referências Bibliográficas

- Oliveira, L. B.; Jurkiewicz, C. Influência de inulina e goma acácia na viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado simbiótico. *Braz. J. of Food Technol.*, v. 12, p. 138-144, 2009.
- Oliveira, M. A.; Carrão-Panizzi, M. C.; Mandarino, J. M. G.; Leite, R. S.; Campos Filho, P. J.; Vicentini, M. B.; Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (*Glycine max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. *Braz. J. Food Technol.*, v.13, n. 1, p. 23-29, 2010.
- Saldivar, X.; Wang, Y.; Chen, P.; Hou, A.; Changes in chemical composition during soybean seed development. *Food Chemistry*, 124(4), 1369-1375, 2011.
- Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M. J; Rodríguez-Sevilla, M. D.; Mateos-Aparício, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*glycine max*). *Food Chemistry*, v.101, p. 1216-1222, 2006.
- Rossi, E. A.; Vendramini, R. C.; Carlos, I. Z.; Pei, Y. C.; Valdez, G. F. Development of novel fermented soymilk product with potencial probiotic properties. *Eur. Food Res. Thechnol.*, v.209, p. 305-307, 1999.
- Yang M, Li L. Physicochemical, textural and sensory characteristics of probiotic soy yogurt prepared from germinated soybean. *Food Technology and Biotechnology*. 2010.
- Hou, J. W.;Yu, R. C.; Chou, C. C.; Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Res. Int.* 33, 393–397. (2000)