

DESENVOLVIMENTO DE SOBREMESA FERMENTADA SIMBIÓTICA À BASE DE SOJA VERDE SABOR LIMÃO

Leili Sia Guerreiro¹; Cristiane Maria Barra da Matta²; Cynthia Jurkiewicz²

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

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

Resumo. *O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma sobremesa fermentada simbiótica à base de soja verde sabor limão e avaliar a influência do amido resistente e da inulina na sobrevivência de bactérias probióticas. A sobremesa foi obtida após a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja verde pela cultura probiótica, composta por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Streptococcus thermophilus*. Um planejamento fatorial 2^2 com 2 pontos centrais foi realizado em duplicata, totalizando 12 ensaios, para verificar a influência dos prebióticos, amido resistente e inulina na sobrevivência das bactérias probióticas. A variação da concentração de inulina de 1 para 5% favoreceu a sobrevivência de *L. acidophilus* e *S. thermophilus*. O aumento da concentração de amido resistente de 0,67 para 3,83% influenciou apenas a sobrevivência de *S. thermophilus* na sobremesa armazenada por 22 dias a 5°C. Os prebióticos não influenciaram significativamente a contagem de *B. animalis* na sobremesa, que permaneceu acima de 10^7 UFC.g⁻¹ ao final de 22 dias de estocagem.*

Introdução

O atual cenário do mercado de consumo tem sido caracterizado por buscas de alimentos funcionais e benéficos à saúde, devido a mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores. Além disso, há aqueles consumidores com intolerância a certas substâncias presentes nos alimentos, como a lactose. Sendo assim, a indústria de alimentos tem buscado atender todas essas exigências desenvolvendo produtos que atendam as necessidades dos consumidores.

O consumo de alimentos probióticos e prebióticos estimula a multiplicação de bactérias benéficas no intestino e por consequência inibem a multiplicação de patógenos. Esses alimentos são denominados funcionais, que são alimentos ou ingredientes que além de suas funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos ao organismo, conforme afirma a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil (1999). A associação de ingredientes prebióticos e micro-organismos probióticos é conhecida como simbiótica, portanto, um alimento simbiótico têm as mesmas propriedades de ambas substâncias (Prebiotics and probiotics, 2009).

O amido é uma grande reserva de energia para as plantas e vegetais, pode ser encontrado em raízes, sementes e tubérculos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2010). É constituído por dois polímeros, amilose e amilopectina e é classificado de acordo com sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. O amido resistente pode ser definido como aquele que não é absorvido e/ou digerido no intestino delgado de indivíduos saudáveis (VIEIRA; RIBEIRO, 2011). Pelo fato de não ser digerível, serve como substrato para bactérias probióticas no colon, atuando como prebiótico.

A inulina é um polissacarídeo extraído da raiz da chicória. Sua característica prebiótica está relacionada ao seu fator bifidogênico que estimula as bifidobactérias presentes no cólon, de modo a atuar no sistema imunológico do hospedeiro e a reduzir os níveis das bactérias patogênicas no intestino (SAAD, 2006).

A soja é um grão de consumo mundial crescente, com origem em países com clima temperado, mas com a modificação genética foi possível criar variedades capazes de crescerem em regiões tropicais, sendo o Brasil o segundo maior produtor de soja do mundo.

Esse grão é considerado um alimento com alto valor nutritivo, sendo uma excelente fonte de fibras, carboidratos e proteínas. Do ponto de vista funcional a soja possui substâncias capazes de prevenir algumas doenças, como o câncer de cólon (MORAES, 2009).

Como a soja madura apresenta um sabor residual forte, surgiu à necessidade de novas alternativas que melhorassem a palatabilidade de produtos com esse grão. A alternativa encontrada foi a soja verde, que nada mais é do que a soja madura quando antecipada sua colheita, ainda no estágio verde. Porém, a soja verde oferece melhor digestibilidade por conta do baixo teor de oligossacarídeos e está isenta da ação da lipoxigenase, enzima responsável pela formação de compostos voláteis que conferem o sabor residual (LIU, 1997).

O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma sobremesa simbiótica à base de soja verde e avaliar a influência das substâncias prebióticas, amido resistente e inulina, na sobrevivência dos micro-organismos probióticos durante o armazenamento do produto.

Materiais e Métodos

Produção da sobremesa

O preparo da sobremesa foi dividido em cinco etapas, a obtenção do extrato hidrossolúvel de soja verde, mistura das matérias-primas, pasteurização, fermentação e aromatização.

Inicialmente a soja verde pré-cozida (Veggie) foi aquecida por 7 minutos em água fervente e em seguida a água foi descartada. A soja cozida foi cominuída por 2 minutos em liquidificador (Walita modelo RI) na proporção de uma parte de soja para duas partes de água potável. Posteriormente a massa obtida foi filtrada em chapéu chinês, sendo o filtrado denominado de extrato hidrossolúvel de soja.

A sobremesa foi preparada com 80% de extrato hidrossolúvel de soja, 0,06 de fosfato tricálcio (BKG adicon), 0,80% de carboximetil celulose (CMC – Cekol 30000, Vagler Systems), 9% de sacarose (União) e água potável. Os prebióticos amido resistente (Hi-Maize 290, Corn Products Brasil) e inulina (Orafit GR, Clariant) foram adicionados de acordo com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 1. As matérias-primas em pó foram previamente homogeneizadas e incorporadas ao extrato de soja e à água, sob agitação manual com bastão de vidro.

A mistura acondicionada em béquer foi pasteurizada em banho termostático a 85 °C por 5 minutos e resfriada a 37 °C. A 85 °C o amido já atingiu sua temperatura de gelatinização e as proteínas da soja precipitaram, formando ligações intermoleculares com água, resultando em um gel alimentício, que caracteriza uma sobremesa.

Na etapa de fermentação 0,02% de cultura láctica ABT (CHR HANSEN, composta por *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus*) foi adicionada à mistura e essa foi incubada a 37 °C até atingir pH 5,0. Após o resfriamento a 10°C foram incorporados 0,06% de aroma de torta de Limão (FU-640-198-1– Givaudan) e 6,50% de suco concentrado de limão (Limonjal) em 93,40% de mistura fermentada. Após a aromatização, a sobremesa foi armazenada a 5 °C.

Delineamento experimental

Foi realizado um Planejamento fatorial 2² com 2 pontos centrais em duplicata para verificar a influência dos prebióticos, amido resistente e inulina, na sobrevivência das bactérias probióticas, totalizando 12 ensaios. As variáveis independentes amido resistente (X₁) e inulina (X₂) foram estudadas em 3 níveis (-1, 0, 1). Os níveis codificados e reais das variáveis independentes e as combinações dos 12 ensaios estão apresentados na Tabela 1. Como variáveis dependentes foram consideradas, a população de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Streptococcus thermophilus*, o pH e a acidez da sobremesa com 1, 15 e 22 dias de armazenamento a 5 °C. O tempo de fermentação da sobremesa também foi analisado. A ordem da realização dos ensaios foi aleatória. Os resultados do planejamento

foram avaliados com auxílio do software Minitab™ versão 15 (Minitab INC State College, EUA).

Tabela 1- Condições dos ensaios de acordo com o Planejamento Fatorial.

Ensaio	Amido resistente		Inulina	
	Codificada	Não Codificada	Codificada	Não Codificada
	X ₁	(%)	X ₂	(%)
1	-1	0,67	-1	0,89
2	1	3,83	-1	0,89
3	-1	0,67	1	5,12
4	1	3,83	1	5,12
5	-1	0,67	-1	0,89
6	1	3,83	-1	0,89
7	-1	0,67	1	5,12
8	1	3,83	1	5,12
9	0	2,25	0	3
10	0	2,25	0	3
11	0	2,25	0	3
12	0	2,25	0	3

Análises físico-químicas

Foram determinados o pH e a acidez titulável, em duas replicatas, durante o processo de fermentação e nos dias 1, 15 e 22 de armazenamento da sobremesa a 5 °C. O pH foi determinado em potenciômetro Micronal modelo V, conforme descrito na A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). A acidez titulável, expressa em porcentagem, foi determinada titulando-se 10,0 g de amostra, diluída em 50,0 mL de água destilada, com solução de NaOH a 0,10 mol.L⁻¹ utilizando 2 gotas de fenolftaleína na amostra como indicador.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas na sobremesa, conforme descrito por OLIVEIRA (2009), após 1, 15 e 22 dias de armazenamento do produto a 5 °C.

Uma amostra de 10 g da sobremesa foi inicialmente diluída em 90 g de solução salina 0,85% estéril. Essa mistura foi homogeneizada em Stomacher (Seward) por 1 minuto à rotação de 260 rpm. Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições utilizando 10 mL da diluição anterior em 90 mL de solução salina 0,85% estéril.

Na enumeração de *Bifidobacterium animalis* foi utilizada a técnica de inoculação em profundidade. Primeiramente, adicionou-se 1 mL das duas últimas diluições nas placas de Petri, vertendo o meio de cultura Agar MRS (Oxoid) suplementado com 0,5% de solução de dicloxacilina sódica monohidratada (Sigma) a 0,01%, 1,0% de solução de cloreto de lítio (Vetec) a 10% e 0,5% de solução de L-cisteína a 10% (Vetec) e homogeneizando em seguida. Após a solidificação, as placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) a 37 °C por 72 horas em estufa (marca Fanem modelo 002CB).

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizada a técnica de inoculação em superfície. Adicionou-se 0,1 mL de duas diluições adequadas, nas placas contendo Agar MRS (Oxoid), espalhando-as com o auxílio de alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas em condição de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) a 43 °C por 72 horas em estufa incubadora B.O.D. (marca Marconi modelo MA415).

Para a quantificação de *Streptococcus thermophilus* foi utilizada a técnica de inoculação em profundidade com adição de sobrecamada. Inicialmente, adicionou-se 1 mL de duas últimas diluições nas placas de Petri, vertendo o meio de cultura Agar M17 (Oxoid) adicionado de 5% de solução de lactose (Vetec) 10% e homogeneizando em seguida. Após a solidificação, foi adicionada uma sobrecamada de meio. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em estufa (marca Fanem, modelo 002CB).

Os métodos microbiológicos foram realizados seguindo as instruções do “Bergey’s manual of systematic bacteriology”.

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta o tempo de fermentação de cada ensaio. A análise de variância mostrou que o amido resistente e a inulina não influenciaram significativamente o tempo de fermentação da sobremesa. O tempo médio de fermentação de todos os ensaios foi de (234 ± 11) minutos.

Tabela 2- Tempo de fermentação.

Ensaio	Tempo de fermentação (min).
1	217
2	250
3	225
4	250
5	230
6	230
7	240
8	240
9	217
10	240
11	225
12	240

A partir da avaliação estatística realizada com os valores apresentados na Tabela 3, verificou-se que o amido resistente e a inulina não influenciaram significativamente nos valores de pH da sobremesa, porém influenciaram significativamente a acidez titulável.

Tabela 3- Valores de acidez titulável e pH.

Ensaio	Dias					
	1		15		22	
	Acidez titulável (%)	pH	Acidez titulável (%)	pH	Acidez titulável (%)	pH
1	0,71	4,08	0,63	4,16	0,61	4,11
2	0,46	4,44	0,56	4,28	0,40	4,51
3	0,52	4,32	0,47	4,39	0,46	4,44
4	0,60	4,20	0,58	4,27	0,69	4,24
5	0,55	4,23	0,55	4,10	0,55	4,23
6	0,56	4,26	0,61	4,11	0,36	4,19
7	0,61	4,12	0,69	4,10	0,56	4,36
8	0,56	4,17	0,53	4,19	0,50	4,21
9	0,46	4,36	0,48	4,36	0,51	4,22
10	0,47	4,35	0,47	4,29	0,47	4,29
11	0,44	4,46	0,46	4,45	0,46	4,46
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd - valores não determinados.

O pH médio de todas as formulações de sobremesa manteve-se constante em $(4,3 \pm 0,1)$ durante os 22 dias de armazenamento. Esse valor está próximo ao encontrado por OLIVEIRA (2009) em leite fermentado, que variou em média de $(4,5 \pm 0,1)$ para $(4,2 \pm 0,1)$. A acidez da sobremesa também permaneceu constante, em 0,55%, até o 15º dia de armazenamento. No tempo 22 dias de armazenamento, houve uma interação significativa entre o amido resistente e a inulina na acidez da sobremesa. Observou-se que na sobremesa com amido, um aumento na concentração de inulina, resultou em um aumento da acidez de 0,4 a 0,6 %.

A Tabela 4 apresenta os resultados das contagens microbiológicas durante os tempos 1, 15 e 22 dias de armazenamento para todos os ensaios.

Tabela 4- Resultados das contagens de *L. acidophilus* (La), *B. animalis* (Ba) e *S. thermophilus* (St) nos tempos 1, 15 e 22 dias de armazenamento da sobremesa a 5°C para os 12 ensaios.

Ensaio	Log UFC/g								
	La			Ba			St		
	1	15	22	1	15	22	1	15	22
1	6,84	6,03	5,72	8,07	7,89	8,00	8,07	7,88	7,82
2	6,86	6,67	6,81	7,92	7,54	7,53	8,30	8,19	8,16
3	6,51	6,04	6,91	7,84	7,50	7,38	8,24	8,28	8,08
4	6,91	6,85	6,96	8,02	7,83	7,54	8,27	8,22	7,56
5	6,92	6,67	6,23	8,00	7,89	6,81	8,36	7,90	7,62
6	7,10	6,22	6,73	8,41	8,31	7,94	8,31	8,17	7,88
7	6,82	nd	nd	7,58	7,98	7,42	8,22	8,28	8,10
8	6,70	nd	nd	7,99	7,69	7,53	8,14	8,22	7,90
9	6,78	6,27	5,43	7,75	8,10	7,99	8,14	8,22	7,90
10	7,05	5,58	5,31	7,89	8,05	7,68	8,19	8,28	8,31
11	6,79	5,93	5,93	8,13	7,99	7,87	8,01	8,32	8,36
12	6,56	5,39	5,09	7,66	7,81	nd	8,19	8,29	8,24

nd – valores não determinados

Com 1 e 15 dias de armazenamento, o amido resistente e a inulina não influenciaram significativamente a população de *L. acidophilus*. Em 22 dias de armazenamento, a população de *L. acidophilus*, na sobremesa com maior concentração de inulina e amido apresentou 0,6 Log UFC.g⁻¹ a mais do que nas menores concentrações dos prebióticos. A população de *L. acidophilus* na sobremesa armazenada por 22 dias foi correlacionada com a concentração de amido resistente e inulina através da equação 1, onde x₁ e x₂ representam, respectivamente, a concentração codificada de amido e de inulina. O modelo apresentou um coeficiente de correlação de 0,92.

$$\text{Log UFC. g}^{-1} = 6,65 + 0,27 * x_1 + 0,28 * x_2 \quad (1)$$

Para a população de *B. animalis* não houve influência significativa do amido e da inulina, possivelmente pelo fato da própria soja verde conter nutrientes suficientes para a sobrevivência do micro-organismo.

Em relação à população de *S. thermophilus*, observou-se que no tempo 15 dias de armazenamento o amido resistente e a inulina influenciaram significativamente a contagem. A diferença na contagem do micro-organismo entre as sobremesas com maior e menor concentração do prebiótico foi de 0,20 Log UFC.g⁻¹, para o amido resistente e de 0,30 Log UFC.g⁻¹ para a inulina. Embora a diferença seja estatisticamente significativa, essa variação foi muito pequena, não apresentando uma importância prática. Durante todo o período de armazenamento, a população de *S. thermophilus* permaneceu maior que a dos probióticos, o que também foi observado por Oliveira (2009).

Observa-se pelos resultados da Tabela 5 que após 22 dias de armazenamento da sobremesa a 5 °C todos os ensaios apresentaram contagens de probióticos entre 2,6 x 10⁹ e 1,0 x 10¹⁰ UFC por 100 g de produto, atendendo a recomendação da legislação no consumo diário entre 10⁸ a 10⁹ UFC. A elevada população de probióticos nas sobremesas pode ser atribuída à boa adaptação dos probióticos ao produto, principalmente *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

Tabela 5 - Condições dos ensaios e população total de micro-organismos probióticos na porção de 100 g de sobremesa com 22 dias de armazenamento.

Amido resistente (%)	Inulina (%)	Probióticos* (UFC.porção ⁻¹)
0,67	0,89	1,0 x 10 ¹⁰
3,83	0,89	4,0 x 10 ⁹
0,67	5,12	3,2 x 10 ⁹
3,83	5,12	4,4 x 10 ⁹
0,67	0,89	8,1 x 10 ⁸
3,83	0,89	9,2 x 10 ⁹
0,67	5,12	2,6 x 10 ⁹
3,83	5,12	3,4 x 10 ⁹
2,25	3,00	5,6 x 10 ⁹

A sobrevivência dos microrganismos probióticos na sobremesa desenvolvida à base de soja verde pode ser comparada com a da bebida láctea, conforme visto em alguns estudos. Krüger et al. (2008) desenvolveram uma formulação contendo 30% de extrato hidrossolúvel de soja, 36,6% de leite de vaca e 33,3% de soro e a contagem total de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* foi de 1 x 10⁶ UFC.ml⁻¹ no 22º dia de armazenamento. O leite fermentado simbiótico desenvolvido por Oliveira & Jurkiewicz

(2009) também apresentou $2,2 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ na contagem de *L. acidophilus* e *B. animalis* após 22 dias de armazenamento a 10 °C.

Conclusões

O aumento da concentração de amido e inulina na sobremesa à base de soja verde não influenciou a sobrevivência de *B. animalis*. O aumento da concentração de inulina favoreceu a sobrevivência de *L. acidophilus* na sobremesa armazenada por 22 dias.

A sobremesa a base de soja verde com polpa de limão, mostrou ser um produto adequado para o veículo do probiótico *Bifidobacterium animalis*.

Referências Bibliográficas

- A.O.A.C. (1995) Association of Official Analytical Chemists. CUNNIFF, P. Official Methods of Analysis of AOAC international. v. 2, Arlington.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2012) Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em 09/05/2012.
- BRASIL. Portaria n.398, de 30 de Abril de 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em 02/07/2012.
- Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A. (ed.) (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. v. 2. London: Williams & Wilkins.
- Krüger, R. et al. (2008) Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. Araraquara: *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 43-53.
- Liu, K. *Soybeans Chemistry, Technology and Utilization*. (1997) 2ª ed. New York: Chapman & Hall.
- Moraes, C.S.; Pastore, G.M.; Sato, H.H.; Park, Y.K. (2009) *Isoflavonas de Soja e Suas Atividades Biológicas*. São Paulo: Livraria Varela,.
- Oliveira, L.B.; Jurkiewicz, C.H. (2009) Influência de inulina e goma acácia na viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado simbiótico. *Brazilian Journal of Food Technology*, 138-144.
- Prebiotics and Probiotics. (2009) UK, Wiley-Blackwell.
- Ribeiro, E.P.; Seravalli, E.A.G. (2007) *Química de alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Blucher.
- SAAD, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: O estado da arte. São Paulo: *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.
- Vieira, T.A.; Ribeiro, E.P. (2011) Desenvolvimento de sobremesa láctea simbiótica. São Caetano do Sul: CEUN/EEM.