



IARA FERREIRA

**CO-CULTIVO DE CULTURAS INICIADORAS
POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS NA ELABORAÇÃO DE
BEBIDA VEGETAL**

**LAVRAS-MG
2021**

IARA FERREIRA

**CO-CULTIVO DE CULTURAS INICIADORAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS NA ELABORAÇÃO DE BEBIDA VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Dr. Dirceu de Sousa Melo
Dr.^a Aline Galvão Tavares Menezes
Dr.^a Cíntia Lacerda Ramos
Coorientadores

**LAVRAS-MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferreira, Iara.

Co-cultivo de culturas iniciadoras potencialmente probióticas
na elaboração de bebida vegetal / Iara Ferreira. - 2021.

83 p. : il.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Dirceu de Sousa Melo, Aline Galvão Tavares
Menezes, Cíntia Lacerda Ramos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Probióticos. 2. Co-cultura. 3. Bebida não láctea. I. Schwan,
Rosane Freitas. II. Melo, Dirceu de Sousa. III. Menezes, Aline
Galvão Tavares. IV. Ramos, Cíntia Lacerda.

IARA FERREIRA

**CO-CULTIVO DE CULTURAS INICIADORAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS NA ELABORAÇÃO DE BEBIDA VEGETAL**

**CO-CULTIVATION OF POTENTIALLY PROBIOTIC INITIATOR CULTURES IN
THE PREPARATION OF VEGETABLE DRINK**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

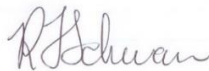
APROVADA em 29 de abril de 2021

Dr.^a Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr Disney Ribeiro Dias UFLA

Dr.^a Cintia Lacerda Ramos UFVJM

Dr.^a Gabriela da Rocha Lemos Mendes UFMG



Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelos dias vividos e pela força diária para enfrentar todos os obstáculos, pelas oportunidades que me foram dadas e por me dar sabedoria e perseverança para superar os empecilhos que surgiam em meu caminho, me guiando na direção certa.

Agradeço aos meus pais, Isabel e José Diocésio e ao meu irmão, Higor por todo apoio, paciência, dedicação e amor, pelos conselhos e incentivos nas horas certas, sem vocês isso não seria possível.

À minha família em geral, que sempre torceu, orou por mim e sempre estiveram presentes em todos os momentos da vida, sendo eles bons ou ruins. Vocês todos são mais que especiais.

Ao meu namorado, Renan que nunca deixou que eu desistisse por mais difícil que fosse e o mais importante, nunca desistiu de mim. A pessoa que sempre acreditou e disse “você é capaz”.

Às minhas amigas Pâmela e Andreísa, que me ajudaram de toda forma possível durante o mestrado, me apoiando e aconselhando sempre que precisava. Duas pessoas incríveis que tive o prazer de conhecer e que se tornaram grandes amigas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao setor de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Ao Hugo, que mesmo distante se disponibilizou para me ajudar, sanando várias dúvidas em relação a metodologias e procedimentos.

À minha orientadora, professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade, ensinamentos e exemplo de competência e profissionalismo a ser seguido.

Ao Dr. Dirceu de Sousa Melo e a Dr^a Aline Galvão Tavares Menezes meus coorientadores, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pela orientação, paciência, amizade e por todos os ensinamentos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, por todo conhecimento transmitido não somente em relação à matéria, mas também em relação a crescimento pessoal.

Aos meus colegas de laboratório por tornarem os dias mais divertidos.

Às amigas da época do colégio, sempre presentes quando precisei de uma palavra de conforto e um ombro amigo.

À todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Produtos lácteos fermentados são a forma mais comum de veiculação de microrganismos probióticos. Entretanto, pessoas com intolerância à lactose, alérgicas às proteínas do leite ou adeptos de dieta vegana evitam a ingestão de tais produtos. Com isso tem-se a necessidade de oferecer a esses consumidores uma alternativa aos produtos lácteos fermentados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a performance de leveduras e bactéria em co cultivo na elaboração de bebida fermentada à base de aveia, sementes de girassol e amêndoa. Foram avaliadas a viabilidade dos microrganismos após armazenamento refrigerado por 28 dias, as performances fermentativas dos microrganismos e o perfil sensorial. Três cepas de leveduras potencialmente probióticas foram utilizadas, sendo elas *Pichia kluyveri* (CCMA 0615), *Pichia guilliermondi* (CCMA 1753) e *Debaryomyces hansenii* (CCMA 1761), juntamente com uma cepa de bactéria ácido láctica, *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA0743), também com características potenciais probióticas. *L. plantarum* foi usado isoladamente e em co-cultura com as leveduras para fermentar os substratos. As células foram inoculadas em uma concentração de 6,0 log UFC/mL para as leveduras e 7,0 log UFC/mL para a bactéria. O pH foi medido nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas de fermentação. Nesses mesmos tempos foram retiradas amostras para enumeração dos microrganismos e análises subsequentes. Ao final da fermentação as bebidas foram mantidas em refrigeração à 4° C e amostras foram retiradas nos dias 7, 14, 21 e 28 dias. Foi feita análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para identificação de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos. Para os voláteis foi realizada Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Análise de antioxidantes foi feita pelos métodos de redução do radical ABTS e complexo fosfomolibdênio. A caracterização sensorial da bebida foi feita pelo método de Flash Profile. Todas as cepas testadas apresentaram viabilidade superior a 6,0 log UFC / mL, conforme recomendado para produtos probióticos alimentares, exceto para a cepa *P. kluyveri*, que apresentou redução na contagem total. Foi observada uma redução no valor do pH, de aproximadamente 7 para, em média, 3,8, que ocorreu devido à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos inoculados. O ácido málico foi todo convertido em ácido láctico por meio da fermentação malolática, sendo este o principal metabólito produzido durante a fermentação. Baixas concentrações de ácido acético e succínico também foram detectadas. O etanol foi detectado em todos os tratamentos com 24 horas de fermentação, no entanto as concentrações foram menores que 5 g/L, valor máximo permitido para uma bebida ser considerada não alcoólica. 113 compostos voláteis foram detectados, incluindo álcoois, aldeídos, alcanos, alquenos, ácidos, éster, éter, cetonas, fenol, amidas e outros. A atividade antioxidante da bebida reduziu após o processo fermentativo. Os microrganismos avaliados no presente estudo se mostraram propícios para fermentação de matrizes não lácteas, que somado as suas características probióticas promissoras, apresentam grande potencial para aplicação na indústria de alimentos. Entre os tratamentos, a combinação de *L. plantarum* + *Debaryomyces hansenii* se mostrou como o tratamento mais promissor para produção de uma bebida fermentada probiótica de origem vegetal.

Palavras-chave: Probióticos. Co-cultura. Bebida não láctea.

ABSTRACT

Fermented dairy products are the most common form of delivery of probiotic microorganisms. However, people with lactose intolerance, allergic to milk proteins or adherents of a vegan diet avoid ingesting such products. Thus, there is a need to offer these consumers an alternative to fermented dairy products. The objective of this work was to evaluate the performance of yeasts and bacteria in co-cultivation in the elaboration of a fermented beverage based on oats, sunflower seeds and almonds. The viability of the microorganisms after refrigerated storage for 28 days, the fermentative performance of the microorganisms and the sensory profile were evaluated. Three potentially probiotic yeast strains were used, being *Pichia kluyveri* (CCMA 0615), *Pichia guilliermondi* (CCMA 1753) and *Debaryomyces hansenii* (CCMA 1761), together with a lactic acid bacteria strain, *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA0743), also with characteristics probiotic potentials. *L. plantarum* was used alone and in co-culture with yeasts to ferment the substrates. Cells were inoculated at a concentration of 6.0 log CFU/mL for yeasts and 7.0 log CFU/mL for bacteria. The pH was measured at 0, 6, 12 and 24 hours of fermentation. At the same time, samples were taken for the enumeration of microorganisms and subsequent analysis. At the end of fermentation, the drinks were kept refrigerated at 4° C and samples were taken on days 7, 14, 21 and 28 days. Analysis was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to identify carbohydrates, alcohols and organic acids. For volatiles, Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry was performed. Antioxidant analysis was performed by ABTS radical reduction and phosphomolybdenum complex methods. The sensory characterization of the drink was carried out using the Flash Profile method. All tested strains showed viability greater than 6.0 log CFU / mL, as recommended for food probiotic products, except for the *P. kluyveri* strain, which showed a reduction in total count. A reduction in the pH value was observed, from approximately 7 to, on average, 3.8, which occurred due to the production of organic acids by the inoculated microorganisms. Malic acid was completely converted into lactic acid through malolactic fermentation, which is the main metabolite produced during fermentation. Low concentrations of acetic and succinic acid were also detected. Ethanol was detected in all treatments with 24 hours of fermentation, however concentrations were lower than 5 g/L, the maximum value allowed for a drink to be considered non-alcoholic. 113 volatile compounds were detected, including alcohols, aldehydes, alkanes, alkenes, acids, ester, ether, ketones, phenol, amides and others. The antioxidant activity of the beverage reduced after the fermentation process. The microorganisms evaluated in this study proved to be suitable for the fermentation of non-dairy matrices, which, added to their promising probiotic characteristics, have great potential for application in the food industry. Among the treatments, the combination of *L. plantarum* + *Debaryomyces hansenii* proved to be the most promising treatment for the production of a probiotic fermented beverage of plant origin.

Keywords: Probiotics. Co-culture. Nondairy beverage.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Probióticos e seus efeitos benéficos	11
2.2 Leveduras como probióticos	15
2.3 Alimentos fermentados	17
2.3.1. Benefícios dos alimentos fermentados	20
2.4 Bebidas fermentadas de origem vegetal	21
2.4.1 Bebidas vegetais a base de cereais.....	23
2.4.2 Nozes como potencial substrato para bebidas vegetais.....	24
2.4.3 Semente de girassol como potencial substrato para bebidas vegetais	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
SEGUNDA PARTE	40
Artigo 1 Microrganismos potencialmente probióticos para produção de bebidas fermentadas não lácteas	40

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A palavra probiótico obteve vários conceitos ao longo dos anos, mas o mais aceito e utilizado é o conceito dado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2002) e Hill *et al.*, (2014) em que os probióticos são definidos como microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Os probióticos podem ser espécies de bactérias ou leveduras, sendo as bactérias ácido lácticas as mais utilizadas no preparo de produtos probióticos (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Os principais grupos de bactérias consideradas como probióticos são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. (DE VRESE, SCHREZENMEIR, 2008; AMER *et al.*, 2017). Poucas leveduras são exploradas em relação ao potencial probiótico, mas também podem ser utilizadas para tal fim, como as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis* (B0399), sendo as únicas espécies de leveduras probióticas disponíveis comercialmente para uso humano (CHEN *et al.*, 2014; CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007).

Existem várias evidências que apoiam potenciais aplicações clínicas dos probióticos na prevenção e tratamento de doenças, conferindo uma série de benefícios a saúde, principalmente, pela manutenção/melhora do perfil da microbiota intestinal, o que contribui para o bem-estar e protege os organismos da invasão de patógenos alimentares. (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Dentre os benefícios dos probióticos já foram demonstrados: alívio de sintomas gastrointestinais (GUYONNET *et al.*, 2009); proteção contra doenças infecciosas (PANIGRAHI *et al.*, 2017); prevenção de doença cardiometabólica (SUN, BUYS, 2016; ZHANG *et al.*, 2015); melhora de características mentais e comportamentais, bem como a promoção de bem-estar (MCKEAN *et al.*, 2017); redução dos níveis de colesterol no sangue (SUDHA *et al.*, 2009); produção ácidos graxos de cadeia curta para reduzir a atividade imune pró-inflamatória (AZAD *et al.*, 2018), otimização da produção de IgA

(YOUSEFI, 2019), produção de peptídeos antimicrobianos (CHEN et al., 2008; WAN et al., 2015), aumento da integridade da camada epitelial intestinal (WAN et al., 2015; YOUSEFI, 2019). Algumas estirpes probióticas também são capazes de atuar como agentes descontaminantes de micotoxinas presentes em alimentos (SHETTY & JESPERSEN, 2006).

Os probióticos podem ser consumidos por meio de alimentos fermentados ou como suplementos dietéticos (VALERO-CASES et al., 2020). A forma mais utilizada para o transporte de microrganismos probióticos são os alimentos lácteos, como por exemplo leites fermentados, iogurtes e queijos. No entanto, pessoas que sofrem de alergia a proteína do leite, intolerantes a lactose ou estritamente vegetarianos/veganos por não consumirem produtos de origem láctea, conseqüentemente tem dificuldades de encontrar produtos probióticos para consumo. Nesse sentido, existe a necessidade de se ofertar a estes consumidores uma alternativa aos produtos lácteos fermentados, buscando explorar matrizes não lácteas que possam servir como transporte para microrganismos probióticos, além de melhorar suas propriedades funcionais e sensoriais (GRANATO et al., 2010; VIJAYA et al., 2015). Dado o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a performance de leveduras e bactéria em co-cultivo na elaboração de bebida fermentada não láctea. Foram avaliadas a viabilidade dos microrganismos após armazenamento refrigerado por 28 dias, as performances fermentativas dos microrganismos e o perfil sensorial.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Probióticos e seus efeitos benéficos

O termo probiótico vem do grego remetendo à ideia de “a favor da vida”, e tem sido empregado de diversas maneiras ao longo dos anos, mas o conceito mais atual e utilizado é o dado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2002) e Hill *et al.*, (2014), em que definem probióticos como microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas.

Os primeiros estudos sobre as propriedades benéficas de alguns microrganismos foram conduzidos pelo cientista russo Ilyich Metchnikoff no início do século XX que

demonstrou os benefícios de alimentos fermentados para o metabolismo humano (METCHNIKOFF, 1907; PENNA et al., 2000). Já foi comprovado que os probióticos exercem efeitos positivos a saúde por meio de vários mecanismos distintos, incluindo: a produção de ácidos graxos de cadeia curta; o aprimoramento da função de barreira do epitélio intestinal; a supressão do crescimento e a ligação de bactérias patogênicas e alterações da atividade imune do hospedeiro (ARAGON et al., 2010; VENTURA et al., 2009). Além disso, os probióticos podem alterar a fermentação colônica e estabilizar a microbiota intestinal simbiótica (SPILLER, 2008), melhorando a interação dinâmica entre a comunidade microbiana residente e o hospedeiro.

Dentre os principais grupos de microrganismos estudados como probióticos, destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. (DE VRESE, SCHREZENMEIR, 2008; AMER et al., 2017). Porém existem preocupações em relação ao uso de espécies de *Escherichia* e *Enterococcus* como probióticos, pelo fato desses gêneros apresentarem espécies patogênicas oportunistas (MARTINS et al., 2009). Ainda menos estudadas, as leveduras também podem ser utilizadas como probióticos, como as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis* (B0399) (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; CHEN et al., 2014; CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007).

Segundo Lee e Salminen, (2009), para que o microrganismo seja classificado como probiótico precisa seguir alguns critérios, sendo eles: 1) ser efetivos e seguros; 2) não patogênicos; 3) resistentes contra a digestão por enzimas pancreáticas ou entéricas, ao ácido gástrico e suco biliar; 4) apresentar capacidade de persistir no trato gastrointestinal (TGI); 5) ser capaz de prevenir a aderência de patógenos à mucosa intestinal e 6) capazes de influenciar a atividade metabólica local. Esses são pré-requisitos empregados pela comunidade científica para a seleção de microrganismos potencialmente probióticos.

Microrganismos probióticos se apresentam como suporte à saúde do hospedeiro. No entanto, este mecanismo de suporte não está bem explicado. Existe na literatura um número muito grande de pesquisas sobre este tema, porém muitos destes estudos tentam explicar apenas como probióticos podem proteger o hospedeiro das desordens intestinais (PLAZA-DIAZ et al., 2014; RINGEL-KULKA et al., 2014; PYNE et al., 2015). Já foi relatado que esses microrganismos com propriedades benéficas reduzem ou eliminam as populações de patógenos através de:

- a) **Produção de substâncias inibitórias:** secreção de ácidos orgânicos (ácido acético e láctico) e redução do pH (OGAWA et al., 2001; FAYOL-MESSAOUDI et al., 2005; FOSCHI et al., 2017), produção de peróxido de hidrogênio (PRIDMORE et al., 2008), biosurfactantes (GUDIÑA et al., 2010; FARIQ; SAEED, 2016; MORAIS et al., 2017) e bacteriocinas (CORR et al., 2007; RIAZI et al., 2009; BAHRI; CHAOUICHE, 2016; BOYANOVA et al., 2017).
- b) **Bloqueio de sítios de adesão:** probióticos e bactérias patogênicas estão em constante competição. Os probióticos inibem a adesão desses patógenos aderindo às superfícies epiteliais do intestino, bloqueando assim os sítios de adesão (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010; NOWAK; MOTYL, 2017). De acordo com Kos et al (2003), a aderência bacteriana envolve vários fatores, sendo que o processo inicial é baseado em interações físico-químicas, que estão relacionadas às cargas elétricas presentes e a hidrofobicidade da parede celular do microrganismo.
- c) **Competição por nutrientes:** probióticos inibem o crescimento de outros patógenos consumindo os nutrientes que eles necessitam (REIFF; KELLY, 2010).
- d) **Estimulo da imunidade:** as cepas probióticas exercem uma ação estimulante no sistema imunológico do hospedeiro, atuando tanto nas células envolvidas na imunidade natural quanto naquelas relacionadas à imunidade específica, além de ativar macrófagos. Embora os mecanismos completos ainda não tenham sido elucidados, sabe-se que apenas microrganismos capazes de sobreviver no trato gastrointestinal podem ativar macrófagos (DONG; ROWLAND; YAQOOB, 2012; MILLER; LEHTORANTA; LEHTINEN, 2019). Além disso, a presença de microrganismos probióticos favorece a produção de anticorpos, especialmente imunoglobulina A secretora (IgA) no lúmen intestinal. A IgA intestinal pode inibir a adesão de bactérias patogênicas à superfície da mucosa promovendo: a aglutinação de bactérias; modificação dos fatores de adesão presentes na superfície das bactérias e interferindo nas interações adesina-receptor (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).
- e) **Neutralização de produtos tóxicos:** a inativação de compostos tóxicos é outro aspecto muito importante da ação probiótica. Acredita-se que os probióticos se acumulam na microbiota intestinal, onde reduzem a absorção de substâncias tóxicas como amônia, aminas e indol, como também reduzem a biotransformação

de sais biliares e ácidos graxos em produtos tóxicos (SOTOUDEGAN et al., 2019).

Existem várias evidências que apoiam potenciais aplicações clínicas dos probióticos na prevenção e tratamento de doenças, podendo fornecer uma série de benefícios para a saúde, principalmente, pela manutenção do bom equilíbrio e composição da microbiota intestinal, ajudando a aumentar a capacidade do organismo para resistir à invasão de agentes patogênicos e manter o bem-estar do hospedeiro (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010), mas para fornecer os efeitos benéficos ao hospedeiro a concentração do microrganismo probiótico deve estar na faixa de $10^6 - 10^9$ UFC/mL ou grama de alimento (VALERO-CASES et al., 2020; GROM et al., 2020; HILL et al., 2014). A legislação brasileira adota concentrações de 10^8 UFC/mL, mas valores abaixo podem ser aceitos desde que comprovada sua eficácia (Brasil, 2002).

Vários estudos relatam que o consumo de probiótico é útil no tratamento de muitos tipos de diarreia, incluindo a diarreia associada a antibióticos; diarreia do viajante e as doenças diarreicas em crianças pequenas causadas por rotavírus. Também está associado ao controle de doenças inflamatórias; doenças intestinais e síndrome do intestino irritável; proteção contra câncer de cólon e bexiga (KATHLEEN, 2010); redução da gravidade da hepatopatia alcoólica experimental (STRAUSS; CALY, 2003); inibição da colonização gástrica com *Helicobacter pylori* que é associado a gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico (CANDUCCI et al., 2000) e redução dos níveis de colesterol no sangue (SUDHA et al., 2009). Pesquisas indicaram que os probióticos produzem ácidos graxos de cadeia curta para reduzir a atividade imune pró-inflamatória (AZAD et al., 2018), otimizar a produção de IgA, modular a produção e secreção homeostática de ácidos biliares, melhorar a produção de peptídeos antimicrobianos para prevenir infecções por vários microrganismos patogênicos e aumentar a integridade da camada epitelial intestinal (WAN et al., 2015; YOUSEFI, 2019). Estudos realizados por Shetty & Jespersen, 2006, mostraram que estirpes probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* GG e LC 705, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. casei* Shirota e *S. cerevisiae*, foram capazes de remover efetivamente aflotoxina B₁ de meios de cultura contaminados, atuando como agentes descontaminantes de micotoxinas. Há ainda evidências de que os probióticos estimulem a resposta imunológica, na modulação de reações alérgicas e na melhoria da saúde urogenital de mulheres (KOPP-HOOLIHAN, 2001; CERBO et al., 2016).

Komatsu et al., (2008) afirmam que as bactérias do gênero *Bifidobacterium* estimulam o sistema imunológico, produzem vitamina B, inibem a multiplicação de patógenos, reduzem a concentração de amônia e de colesterol no sangue e ajudam a restabelecer a microbiota normal após o tratamento com antibióticos. Estudos realizados por Sambrani et al., (2019) mostraram que utilizando sobrenadante obtido de *Saccharomyces cerevisiae* é possível inibir significativamente o crescimento celular e induzir a apoptose em células HT-29, indicando que pode ser efetivo contra o crescimento de células cancerígenas. Os resultados de um estudo realizado por Javmen et al., (2015) indicaram que o β -glucano, derivado de *S. cerevisiae*, induziu a morte celular nas células do hepatoma de camundongo.

Microrganismos probióticos podem induzir efeitos fisiológicos não somente em pacientes doentes, mas como também em uma pessoa considerada saudável. Estudos demonstraram que o consumo de *Lactobacillus paracasei* em adultos saudáveis resultava em modulação da microbiota intestinal, com aumento de espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Roseburia intestinalis* em detrimento da *Escherichia coli* (ZHANG et al., 2013).

2.2 Leveduras como probióticos

A maior parte dos microrganismos usados como probióticos, disponíveis comercialmente, são procariotos de origem humana, contudo, apenas duas leveduras (célula eucariótica) são utilizadas, *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis* (B0399) (CHEN et al., 2014; CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007). *S. boulardii* foi isolada da fruta lichia no ano de 1920, na Indochina. Nesse ano houve uma epidemia de cólera e o microbiologista francês Henri Boulard observou que a população preparava um chá da casca dessa fruta local para suspender os sintomas da diarreia ou pelo menos aliviar, mas na verdade, a eficácia contra a diarreia se devia à presença de uma levedura que recobria a casca da lichia, tal levedura foi isolada, identificada e denominada *Saccharomyces boulardii* (MCFARLAND, 2010).

S. boulardii é termotolerante (cresce bem na temperatura de 37°C), não é patogênica, usada principalmente em casos de diarreias associadas ao uso de antibióticos (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993), mantêm suas propriedades probióticas ainda quando administrada junto com antimicrobianos (ROLFE, 2000).

Cepas de *Saccharomyces* foram observadas em até 96,8% das amostras em estudos recentes de microbiomas intestinais humanos (NASH et al., 2017). A prevalência de cepas de *Saccharomyces* no trato gastrointestinal humano não é surpreendente, já que *S. cerevisiae* e espécies relacionadas foram consumidas propositalmente por humanos por milhares de anos em pães, cerveja e outros alimentos e bebidas fermentadas. No entanto, os efeitos benéficos a saúde de cepas de *S. cerevisiae* foram pouco explorados (FERNANDEZ-PACHECO et al., 2018).

As leveduras chamaram a atenção para a sua possível utilização como probióticos, devido a sua capacidade de sobreviver durante a passagem pelo TGI humano, e também por tolerar exposições em pH baixo e a sais biliares (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). O risco desenvolvimento de resistência a antimicrobianos por bactérias patogênicas, associadas com o tratamento antibiótico também é outro fator que torna a alternativa do uso de leveduras interessante como probióticos. Pois, a resistência antimicrobiana associada à tratamentos com antibiótico tem se tornado um problema de saúde pública mundial (OLIVEIRA; SILVA, 2014). Genes de resistência podem ser transferidos não só entre os membros da microbiota, mas também entre os probióticos e patógenos, genes de resistência a antibióticos já foram relatados em várias cepas de *Lactobacillus*. A transferência de material genético não ocorre entre bactérias e leveduras, tornando leveduras seguras para uso durante o tratamento de pacientes com antibióticos (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Além da levedura *S. boulardii*, outras espécies, incluindo *Debaryomyces hansenii* e *Torulaspora delbrueckii* (PSANI; KOTZEKIDOU, 2006), têm sido encontradas como fortes candidatas no combate e eliminação de bactérias patogênicas, além de sua capacidade de tolerar a passagem através do TGI. No estudo de Kumura et al., (2004) foi avaliado o potencial de leveduras de origem láctea para atuar como probióticos, com *Kluyveromyces lactis* provando ser o mais atraente para novos estudos. Tiago et al. (2009), por outro lado, selecionaram 103 leveduras não *Saccharomyces* usando critérios *in vitro* e *in vivo*, a cepa 898 de *Pichia kluyveri* apareceu como a candidata mais promissora para o uso de probióticos. Silva et al., (2011) estudaram as características tecnológicas das leveduras selvagens dominantes nas salmouras das azeitonas de mesa. Neste estudo os autores observaram que a cepa *Pichia fermentans* possui altas chances de sobreviver ao baixo pH prevalente no estômago humano e, em seguida, aos sais biliares secretados no duodeno. Ainda nesse estudo foi observado um efeito inibitório contra

Staphylococcus aureus e *Salmonella* Enteritidis pela cepa de *Tolrulaspora delbrueckii*. Martins et al., (2007) mostraram que *S. cerevisiae* 905 foi capaz de reduzir a translocação bacteriana de *S. typhimurium* e estimular positivamente o sistema imunológico em camundongos. A cepa *S. boulardii* CNCM I-745 foi estudada para uso como probiótico na medicina humana e é um dos probióticos recomendados para a prevenção e tratamento de diarreia relacionada a antibióticos, incluindo diarreia associada a *Clostridium difficile* (CZERUCKA & RAMPAL, 2019). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram que essa cepa de *Saccharomyces* apresenta um efeito benéfico contra muitos patógenos gastrointestinais, como *Salmonella* entérica var. Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* (cepas enteropatogênicas e enterohemorrágicas), *Vibrio cholerae*, Rotavirus e *Candida albicans* (CZERUCKA & RAMPAL, 2019; SEN & MANSELL, 2020).

Leveduras também têm sido investigadas quanto à sua capacidade para assimilar o colesterol e redução do seu nível, *S. boulardii*, *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliados como potenciais probióticos para assimilar o colesterol ao longo de alguns anos (PSOMAS et al., 2001). Estudos mais recentes selecionaram cepas de *P. fermentans*, *P. kudriavzevii* e *Yarrowia lipolytica* também como potenciais probióticos na redução de colesterol (CHEN et al., 2010b).

2.3 Alimentos fermentados

Estima-se que os alimentos e bebidas fermentados constituam 1/3 da dieta humana e fazem parte da dieta há aproximadamente 10.000 anos (VEIGA et al., 2014; SELHUB, LOGAN & BESTED, 2014; DERRIEN & VAN HYLCKAMA Vlieg, 2015). Esse tipo de alimento tornou-se relevante nos anos 70, quando foram considerados saudáveis e nutritivos (GOLDONI; GOLDONI, 2008). O aumento do consumo de produtos fermentados se deu pela importância dada ao consumidor por alimentos mais saudáveis (RAY; BHUNIA, 2008).

A fermentação natural é a técnica mais antiga para obter produtos com propriedades alimentares melhoradas e maior capacidade de conservação durante a estocagem. Alimentos fermentados são produzidos e consumidos a milhares de anos por civilizações antigas, podendo ser definidos como alimentos ou bebidas que sofrem modificações por meio do desenvolvimento microbiano controlado e conversões

enzimáticas de componentes principais e secundários dos alimentos. Os processos de fermentação de alimentos podem ser categorizados pelos metabólitos primários e microrganismos envolvidos: álcool e dióxido de carbono (levedura), ácido acético (*Acetobacter*), ácido láctico (bactérias lácticas (BAL) pertencentes a gêneros como *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*), ácido propiônico (*Propionibacterium freudenreichii*) e amônia e ácidos graxos (*Bacillus*, bolores). Os alimentos fermentados podem ser de diversas categorias como carnes, peixes, laticínios, hortaliças, cereais, raízes amiláceas, frutas e etc (Tabela 1) (MARCO et al., 2017; GARCIA; RENDUELES; DÍAS, 2019).

Tabela 1- Diferentes alimentos fermentados, substratos utilizados e localidade de consumo no mundo

Categoria	Alimento	Substrato utilizado	País ou Continente
Laticínios	Dadih	Leite de búfala	Indonésia
	Chhu	Leite de vaca / iaque	Índia, Nepal, Butão, China (Tibete)
	Kefir	Leite de cabra, ovelha, vaca	Rússia
Cereais	Ang-kak	Arroz vermelho	China, Taiwan, Filipinas
	Enjera/Injera	Farinha Tef, Trigo	Etiópia
	Kenkey	Milho	Gana
Vegetais	Kimchi	Repolho, cebola verde, pimenta, gengibre	Coréia
	Naw-mai-dong	Brotos de bambu	Tailândia
	Chucrute	Repolho	Europa, EUA, Canadá, Austrália
Leguminosas	Yandou	Soja	China
	Wari	Gramma preta	Índia
	Tempe	Soja	Indonésia
Raiz	Tapai Ubi	Mandioca, ragi	Malásia

	Gari	Mandioca	África Ocidental e Central
	Cingwada	Mandioca	África Oriental e Central
Carne	Chouriço	Carne de porco	Espanha
	Alheira	Carne de porco	Portugal
	Peperoni	Bife de porco	Europa, América Austrália
Peixes / Frutos do mar	Belecan (Blacan)	Camarão	Malásia
	Gulbi	Mariscos	Coréia
	Ika- Shiokara	Lula	Japão

Fonte: Adaptado de TAMANG et al., 2020

Alimentos fermentados são o centro dos consórcios de microrganismos. Estes podem estar presentes tanto como microbiota natural indígena nos substratos, ou como culturas iniciadoras adicionadas (ADESULU-DAHUNSI, DAHUNSI & OLAYANJU, 2020), contendo atividade funcional que muda bioquímica e organolepticamente os substratos em um produto diferente durante a fermentação. Isso fornece um enriquecimento do valor nutricional desses produtos, sabores únicos, texturas e benefícios à saúde para os consumidores (GARCÍA; RENDUELES; DÍAS, 2019; CHILTON; BURTON; REID, 2015; TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016).

Muitos produtos fermentados são submetidos a processos para que os microrganismos viáveis estejam ausentes no momento do consumo, como por exemplo tratamentos térmicos (CHIU et al., 2013), alta pressão (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2009), raio ultravioleta (UV) e radiação ionizante (ZENDEBOODI et al., 2020). Entretanto, há fermentados como kefir, leite fermentado, iogurte, queijos entre outros, que normalmente contêm elevada população de células viáveis que variam entre 10^6 e 10^9 UFC/g ou UFC/mL. Grande parte das células resiste à passagem pelo TGI humano. Compreendendo cada vez mais que determinados alimentos fermentados beneficiam a saúde humana não diretamente atribuída às matérias primas, mas aos resultados de seu processo e ao aporte dos microrganismos, podendo viabilizar atributos adicionais além da nutrição básica (MARCO et al., 2017).

2.3.1 Benefícios dos alimentos fermentados

Alimentos fermentados têm sido relatados como tendo vários benefícios à saúde, como prevenção e gerenciamento de distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, melhora cognitiva, aumento do sistema imunológico, etc. (LOREA BAROJA et al., 2007; AN et al., 2013; IWASA et al., 2013; TAPSELL, 2015; HILIMIRE, DEVYLDER, FORESTELL, 2015; SIVAMARUTHI; KESIKA; CHAIYASUT, 2018a; SIVAMARUTHI; KESIKA; CHAIYASUT, 2018b), reduzindo os níveis de colesterol no sangue, protegendo contra patógenos, reduzindo a incidência de cânceres, osteoporose, diabetes, obesidade, alergias e aterosclerose (FARHAD; KAILASAPATHY & TAMANG, 2010).

Os benefícios para a saúde associados aos alimentos fermentados podem ser atribuídos aos peptídeos bioativos que são sintetizados na degradação microbiana de proteínas pelos microrganismos envolvidos na fermentação (MARÍA HEBERT; SAAVEDRA & FERRANTI, 2010; MARTINEZ-VILLALUENGA, PEÑAS & FRIAS, 2017; WALTHER & SIEBER, 2011). O subgrupo mais notável de peptídeos bioativos são os peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina-1 (ACE), que são formados durante a fermentação do leite à medida que as proteínas do leite são degradadas pelas proteinases na parede celular das bactérias lácticas. Devido aos conhecidos efeitos anti-hipertensivos desses peptídeos, especialmente valil-prolil prolina (VPP) e isoleucil-prolil-prolina (IPP), produtos lácteos fermentados são recomendados como uma estratégia não farmacológica para o controle da hipertensão (BELTRÁN-BARRIENTOS et al., 2016; NEJATI et al., 2013; USINGER, IBSEN & JENSEN, 2009). Exopolissacarídeos, outro composto bioativo, são polímeros naturais de açúcares que são produzidos biologicamente por vários microrganismos durante a fermentação (DEEPAK et al., 2016). Devido aos benefícios potenciais para a saúde das propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, redutoras do colesterol e imunomoduladoras dos exopolissacarídeos, este composto bioativo tornou-se um foco de interesse (NAMPOOTHIRI et al., 2017; PATEL & PRAJAPAT, 2013; WU et al., 2010).

Além dos compostos bioativos, os efeitos benéficos ao ingerir alimentos fermentados também podem ser advindos de microrganismos que contêm atividade funcional, os probióticos, quando cumprem a definição estabelecida pela Organização das

Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (TAMANG et al., 2016; CHILTON; BURTON; REID, 2015; HILL et al., 2014; FAO/WHO, 2002).

Efeitos preventivos da administração de alimentos fermentados, como arroz com bolor vermelho, comum em alimentos asiáticos, foram encontrados em doenças neurodegenerativas como o Parkinson e em disfunções comportamentais (KIM et al., 2016; TSENG; HSU & PAN, 2016). Descobertas ligaram produtos fermentados a influências positivas na microbiota intestinal com impacto de longo prazo na comunicação intestino-cérebro. Além disso, os avanços mais recentes nos estudos da microbiota intestinal têm sido capazes de estabelecer o conceito do eixo intestino-cérebro, mostrando o efeito modulatório da composição da microbiota intestinal no cérebro e no sistema nervoso central em interação. Portanto, pode-se estabelecer um elo entre a dieta alimentar, como um influenciador na composição da microbiota intestinal e conseqüentemente no cérebro e, ainda, na homeostase do organismo (KIM, B. et al., 2016; MAYER, TILLISCH & GUPTA, 2015; CARABOTTI et al., 2015; BIENENSTOCK, KUNZE & FORSYTHE, 2015).

Como demonstrado acima, os alimentos fermentados trazem muitos benefícios a saúde, mas há também algumas desvantagens relacionadas aos fermentados lácteos, como alergia, intolerância à lactose e teor de colesterol, o que abre espaço para o uso de fermentados não lácteos por pessoas que não podem consumir leite e derivados (RANADHEERA et al., 2017).

2.4 Bebidas fermentadas de origem vegetal

Os fermentados não lácteos são produzidos a partir de uma matriz que não contenha leite em sua base, como por exemplo leguminosas, nozes, sementes, cereais e pseudo-cereais (Tabela 2). Assim como na fermentação do leite, esses substratos são fermentados a partir de microrganismos do ambiente (MARSH et al., 2014; MÄKINEN et al. 2016).

Tabela 2- Diferentes matrizes usadas para fabricação de bebidas vegetais ou substitutos do leite

Categoria	Espécies
-----------	----------

Leguminosas	Feijão caupi, feijão mungo, amendoim, feijão de soja
Nozes	Amêndoas, avelã
Sementes	Cânhamo, gergelim, girassol
Plantas oleaginosas de outras famílias	Coco
Cereais	Milho, kamut, painço, aveia, arroz, espelta, trigo
Pseudo-cereais	Amaranto, trigo sarraceno, quinoa

Fonte: Adaptado de SCHOLZ-AHRENS; AHRENS & BARTH, 2020; MENEZES et al., 2018; FREIRE, RAMOS & SCHWAN, 2015, 2017; SANTOS et al., 2014; RAMOS et al., 2010.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) enquadra as bebidas vegetais como produtos proteicos de origem vegetal, segundo a resolução – RDC N° 268, de 22 de setembro de 2005, Produtos Proteicos de Origem Vegetal:

[...] são os alimentos obtidos a partir de partes proteicas de espécies vegetais, podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto. Os produtos devem ser designados de “Proteína” ou “Extrato” ou “Farinha”, conforme o teor proteico mínimo, ou “Glúten”, seguido dos nomes comuns das espécies vegetais de origem. Na designação, podem ser usadas expressões consagradas pelo uso, processo de obtenção, forma de apresentação, finalidade de uso e ou característica específica. Quando adicionados de outros ingredientes, os mesmos devem fazer parte da designação (BRASIL, 2005).

Nos países ocidentais, o “leite vegetal” está bem estabelecido não apenas como bebida, mas também está sendo muito utilizado como ingredientes em várias receitas (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016). A preferência crescente por alternativas ao leite à base de plantas é impulsionada por diferentes fatores e demandas do consumidor: desafios relacionados à saúde, como intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite (VALERO-CASES et al., 2020), questões éticas a respeito do consumo de produtos de origem animal (HUGHES, 1995), questões ambientais (SILVA, SILVA, RIBEIRO, 2020), mudanças no estilo de vida em direção à alimentação vegetariana e vegana, dieta presumivelmente mais saudável (VALERO-CASES et al., 2020) e ao potencial de promoção a saúde desses produtos (PAUCAR-MENACHO et al., 2010). Conseqüentemente, as principais empresas de laticínios estão adicionando produtos alternativos à base de leite vegetal ao seu portfólio.

Muitas bebidas probióticas não lácteas já estão presentes no mercado. O primeiro produto probiótico não lácteo veio da empresa sueca Skane Dairy em 1994 com a marca ProViva (BANSAL et al., 2016). Um produto similar GoodBelly, preparado a partir de farinha de aveia e *Lactobacillus plantarum* 299v foi a primeira bebida probiótica não láctea no mercado dos EUA em 2006 (PANGHAL et al., 2018).

2.4.1 Bebidas vegetais a base de cereais

As bebidas de cereais são produzidas a partir de grãos ou farinha fermentados ou não fermentados, incluindo milho, kamut, milheto, aveia, arroz, espelta e trigo (SCHOLZ-AHRENS; AHRENS & BARTH, 2020). Os cereais são considerados fontes de carboidratos, proteínas, fibras alimentares, minerais e vitaminas, isso explica o porquê de serem consumidos no mundo todo. Portanto, são uma boa opção entre as matérias-primas não lácteas para a produção de bebidas fermentadas (SCHWAN & RAMOS, 2019). Apesar de serem a principal fonte de nutrientes da dieta globalmente, os grãos de cereais carecem de alguns componentes básicos dos alimentos, como aminoácidos (AMADOU, GBADAMOSI & LE, 2011; MARSH et al. 2014). A fermentação pode melhorar o valor nutricional, os atributos sensoriais e as qualidades funcionais dos cereais (AMADOU, GBADAMOSI & LE, 2011; NAVARRETE-BOLAÑOS, 2012).

A aveia tem recebido grande interesse devido à presença de fibras alimentares, fitoquímicos e alto valor nutritivo. Possui inúmeras propriedades funcionais, como por exemplo atividades anticancerígenas e hipocolesterolêmicas. Este cereal é rico em componentes benéficos à saúde, como β -glucano, lipídios dietéticos, proteínas, amido e compostos fenólicos antioxidantes. Além disso, possui efeito prebiótico devido a presença de fibras solúveis como oligossacarídeos e polissacarídeos (RASANE et al., 2015).

Exemplos de bebidas à base de cereais:

- a) Kvass é uma bebida à base de cereais tradicionalmente feita de cevada fermentada e malte de centeio, farinha de centeio e pão de centeio envelhecido, produzida principalmente em países orientais, como Rússia e Polônia, e países bálticos, especialmente Lituânia e Letônia (BASINSKIENE et al., 2016).
- b) Boza é uma bebida de cereal que é obtida da fermentação de grãos inteiros ou farinha de diferentes cereais (geralmente milho, cevada, aveia, milheto, centeio,

- trigo ou arroz), mas o boza da melhor qualidade e sabor é feito de farinha de milho (OSIMANI et al., 2015).
- c) Bors, bebida fermentada à base de farelo de trigo tradicionalmente preparada na Romênia. É utilizada para dar um sabor azedo a sopas tradicionais ou consumida como bebida refrescante. Tem muitos benefícios para a saúde, especialmente devido ao alto conteúdo de vitaminas e minerais (ASHAOLU & REALE, 2020).
 - d) Cauim, bebida fermentada não alcoólica produzida por alguns indígenas brasileiros. Eles usam uma mistura de cereais, como arroz com mandioca, arroz com amendoim ou arroz com caroço de algodão para produzir as bebidas (ALMEIDA et al., 2007; RAMOS et al., 2010).
 - e) Chicha, bebida tradicional fermentada feita principalmente de milho. Essa bebida é muito consumida por grupos indígenas na região da Amazônia e dos Andes (PUERARI et al., 2015).

2.4.2 Nozes como potencial substrato para bebidas vegetais

Nos últimos anos, uma grande variedade de bebidas à base de nozes foi desenvolvida, dentre elas estão bebidas à base de amêndoas e nozes. Vários benefícios à saúde podem ser encontrados nesses produtos, como por exemplo alto teor de fibras dietéticas, fitoquímicos e vitaminas em combinação com teor calórico relativamente baixo (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016; VANGA & RAGHAVAN, 2018; MANOUSI & ZACHARIADIS, 2019).

As amêndoas contribuem com a maior parcela do consumo total de nozes. Várias propriedades farmacológicas, como hipolipemiante, antioxidante, laxante e imunostimulante estão associadas a esta noz (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016). Comparado com outros leites vegetais, o leite de amêndoa é naturalmente uma boa fonte de vitaminas, especialmente a vitamina E (na forma de alfa-tocoferol), que não pode ser sintetizada pelo corpo e precisa ser fornecida por meio de dieta ou suplementos. O alfa-tocoferol é o componente funcionalmente ativo da vitamina E sendo um poderoso antioxidante que ajuda na proteção contra radicais livres. As amêndoas são excelentes fontes de cálcio, magnésio, selênio, potássio, zinco, fósforo e cobre. Além de todos esses benefícios, elas também apresentam propriedades prebióticas por meio da presença da arabinose contida nas pectinas de sua parede celular, podendo ajudar também na redução

dos níveis de colesterol sérico (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016; BURTON & INGOLD, 1989; NIKI et al., 1989).

Leites obtidos de castanha do Brasil (CARDARELLI & OLIVEIRA, 2000; FELBERG et al., 2009), castanha de amêndoa (BERNAT et al., 2014) e babaçu (CARNEIRO et al., 2014) também foram relatados.

2.4.3 Semente de girassol como potencial substrato para bebidas vegetais

Acredita-se que as sementes oleaginosas tenham um alto potencial como fonte alternativa de bebidas não lácteas (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016). Elas acumulam cerca de pelo menos 15% de gordura, mas, ao mesmo tempo, são uma fonte valiosa de proteína (KOTECKA-MAJCHRZAK et al., 2020).

A semente de girassol apresenta em sua composição vitaminas como vitamina A, riboflavina e tiamina. Além de serem fontes de potássio, fósforo e cálcio a semente contém aminoácidos essenciais como valina, isoleucina e leucina. A energia contida na semente é da ordem de 560 calorias e, dos carboidratos totais, 3,8 g/100g são representados pela fibra bruta (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1994). Segundo a Food Standards Agency Institute of Food Research, 2002, sementes de girassol contêm cerca de 20% de proteína, altos níveis de magnésio (390 mg / 100 g) e são especialmente ricas em ácidos graxos poli-insaturados (aproximadamente 31,0%) em comparação com outras sementes oleaginosas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas podem gerar efeitos positivos na saúde e fisiologia do hospedeiro, como controle de doenças inflamatórias, inibição da colonização do TGI por patógenos e redução dos níveis de colesterol no sangue. Estes microrganismos devem ser ingeridos em uma concentração de $10^6 - 10^9$ UFC/mL para exercer seus efeitos benéficos ao hospedeiro. O veículo mais utilizado para entrega de microrganismos probióticos são alimentos de matrizes lácteas, mas indivíduos intolerantes a lactose, alérgicos a proteína do leite e aqueles que possuem dieta estritamente vegana tem dificuldade no acesso a produtos probióticos. Dessa forma, tem-se a necessidade de oferecer a esses

consumidores uma alternativa aos produtos lácteos fermentados, buscando explorar matrizes não lácteas que também possam servir como transporte para microrganismos probióticos. Portanto, faz-se necessário avaliar a performance dos microrganismos durante a fermentação para o desenvolvimento de novos produtos não lácteos, pois a matriz vegetal, bem como a forma que a cultura probiótica será inoculada podem interferir na viabilidade do microrganismo e também nas características do produto final.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. G. et al. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 146–151, 2007.
- AMADOU, I.; GBADAMOSI, O. S.; LE, G. W. Millet-based traditional processed foods and beverages: a review. **Cereal Foods World**, v. 56, p. 1–7, 2011.
- AMER, M. et al. Probiotics and their use in inflammatory bowel disease. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 24, p. 16-23, 2017.
- AN, S.Y. et al. Beneficial effects of fresh and fermented kimchi in prediabetic individuals. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, p. 111–119, 2013.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v.15, p. 399-409, 2005.
- ANGELOV, A.; YANEVA-MARINOVA, T.; GOTCHEVA, V. Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 2351–2360, 2018.
- ARAGON, G. et al. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, p. 39–44, 2010.
- ASHAOLU, T. J.; REALE, A. A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables. **Microorganisms**, v. 8, p. 1176, 2020.
- AZAD, A. K. et al. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- BAHRI, F.; CHAOUICHE, N. K. Partial characterization of bacteriocina-like substance produced by probiotic *Lactobacillus plantarum* F12 isolated from Algerian children faeces. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1798-1805, 2016.
- BANSAL, S. et al. Non-dairy based probiotics: A healthy treat for intestine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 1856–1867, 2016.
- BASINSKIENE, L. et al. Non-Alcoholic beverages from fermented cereals with increased oligosaccharide content. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 36–44, 2016.
- BELTRÁN-BARRIENTOS, L. et al. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4099-4110, 2016.
- BERNAT, N. et al. Development of a nondairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. **Food Science & Technology International**, v. 21, p. 440-453,

2014.

BIENENSTOCK, J.; KUNZE, W.; FORSYTHE, P. Microbiota and the gut-brain axis. **Nutrition Reviews**, v. 73, p. 28–31, 2015.

BOYANOVA, L. et al. Bacteriocin-like inhibitory activities of seven *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* strains against antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* strains. **Letters in applied Microbiology**, v. 65, p. 469-474, 2017.

BRASIL. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N ° 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos emitidos com alegação de propriedades funcionais e de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf/view (Acesso em: 13/02/2021)

BRASIL. Resolução - Rdc nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico Para Produtos Proteicos de Origem Vegetal. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 23 set. 2005. n. 184. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA_173_add_1.htm Acesso em: 07/02/2021

BURTON, G. W.; INGOLD, K. Vitamin E as an in Vitro and in Vivo Antioxidant. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 7-22, 1989.

CARABOTTI, M. et al. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals of Gastroenterology**, v. 28, p. 203–209, 2015.

CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de castanha-do-pará. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 617-622, 2000.

CARNEIRO, B. L. A. et al. Estudo da estabilidade do extrato hidrossolúvel “leite” de babaçu (*Orbygnia speciosa*) pasteurizado e armazenado sob refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 232-236, 2014.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Girassol**: derivados protéicos. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 74).

CANDUCCI, F. C. A. et al. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 14, p. 1625–1629, 2000.

CERBO, A. D. et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, p. 187-203, 2016.

CHEN, P. et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and a -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65–72, 2014

- CHEN, L. S. et al. Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. **Dairy Science & Technology**, v. 90, p. 537–548, 2010b
- CHEN, Y. J. et al. Effects of Probiotics on Feeding Intolerance and Early Growth and Development in Premature Infants. **Journal of Applied Clinical Pediatrics**, v. 14, p. 028, 2008.
- CHEN, C. C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in Pediatrics**, v. 52, p. 77-113, 2005.
- CHIU, Y. H. et al. *Lactobacillus plantarum* MYL26 induces endotoxin tolerance phenotype in Caco-2 cells. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-9, 2013.
- CHILTON, S. N.; BURTON, J. P.; REID, G. Inclusion of fermented foods in food guides around the world. **Nutrients**, v. 7, p. 390–404, 2015.
- CORR, S. C. et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceedings the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 7617-7621, 2007.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 767–778, 2007.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. **World Journal Gastroenterology**, v. 25, p. 2188–2203, 2019.
- DEEPAK, V. et al. In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, p. 163-173, 2016.
- DERRIEN, M.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J.E. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 354–366, 2015.
- DE VRESE, M., SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Food biotechnology**, v. 111, p. 1-66, 2008.
- DIEZ-GUTIÉRREZ, L. et al. Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals Market. **Journal of Function Foods**, v. 64, p. 103669, 2020.
- DONG, H.; ROWLAND. I.; YAQOUB. P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 459-470, 2012.
- FAO/WHO. CODEX. (2002). Standard for Fermented Milks. 243-2003. STAN, C.: p.1-11.

- FARIQ, A.; SAEED, A. Production and biomedical applications of probiotics biosurfactants. **Current Microbiology**, v. 72, p. 489-495, 2016.
- FARHAD, M.; KAILASAPATHY, K.; TAMANG, J. P. Health Aspects of Fermented Foods. In: TAMANG, J. P.; KAILASAPATHY, K. (2010). **Fermented foods and beverages of the world**: CRC press. p. 391-405.
- FAYOL-MESSAOUDI, D. et al., pH, lactic acid, and non-lactic acid dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella* entérica Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6008-6013, 2005.
- FELBERG, I. et al. Soy and brazil nut beverage: processing, composition, sensory and color evaluation. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 609-617, 2009.
- FERNANDEZ-PACHECO, P. et al. Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: properties for application in food industries. **LWT Food Science and Technology**, v. 97, p. 332-340, 2018.
- Food Standards Agency and Institute of Food Research (2002). McCance and Widdowson's. The Composition of Foods. (6th. Summary Edition). Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- FOSCHI, C. et al. Vaginal lactobacilli reduce *Neisseria gonorrhoeae* viability through multiple strategies: na in vitro study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.
- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787-795, 2015.
- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**, v. 100, p. 698-707, 2017.
- GARCÍA, C. RENDUELES, M. DÍAZ, M. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**. v. 119, p. 207-220, 2019.
- GOLDONI, J.S; GOLDONI, C. L. **Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas**, In: Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Editora Blucher, 2008, p. 269-302.
- GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292–302, 2010.

GROM, L. C. et al. Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 165-171, 2020.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* spp. paracasei A20. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p. 419-424, 2010.

GUERRERO, C.; WILSON, L. Capítulo 5—Enzymatic Production of Lactulose. In **Lactose-Derived Prebiotics**; Illanes, A., Conejeros, R., Eds.; Academic Press: London, UK, 2016; p. 191–227.

GUYONNET, D. et al. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and digestive symptoms in women reporting minor digestive symptoms: a randomised, double-blind, parallel, controlled study. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.1654–1662, 2009.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HILIMIRE, M. R.; DEVYLDER, J. E.; FORESTELL, C. A. Fermented foods, neuroticism, and social anxiety: An interaction model. **Psychiatric Research**, v. 228, p. 203–208, 2015.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 41, p. 85–101, 1998.

HUGHES, D. Animal welfare: the consumer and the food industry. **British Food Journal**, v. 97, p. 3–7, 1995.

IWASA, M. et al. Fermented milk improves glucose metabolism in exercise-induced muscle damage in young healthy men. **Nutrition Journal**, v. 12, p. 83-89, 2013.

JAVMEN, A. et al. *S. cerevisiae* β -glucan reduced viability of mouse hepatoma cells in vitro. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 562–566, 2015.

KATHLEEN, J. Probiotics: Preventing antibiotic-associated diarrhea. **Journal for Specialists in Pediatric Nursing**, v. 15, p. 160–162, 2010.

KEDIA, G. et al. In vitro fermentation of oat bran obtained by debranning with a mixed culture of human fecal bacteria. **Current Microbiology**, v. 58, p. 338–342, 2009.

KIM, B. et al. A review of fermented foods with beneficial effects on brain and cognitive function. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 21, p. 297–309, 2016.

KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 329-347, 2008

- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 229-239, 2001.
- KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 981-987, 2003.
- KOTECKA-MAJCHRZAK, K. et al. Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient. **Trends in Food Science & Technology**, v. 106, p. 160-170, 2020.
- KUMURA, H. et al. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **Journal of dairy science**, v. 87, p. 4050–4056, 2004.
- LEE, Y. K., SALMINEN, S. Handbook of probiotics and prebiotics, John Wiley & Sons. 2009.
- LONDONO, D. M. et al. Avenin diversity analysis of the genus *Avena* (oat). Relevance for people with celiac disease. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 170–177, 2013.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1–17, 2001.
- LOREA BAROJA, M. et al. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 149, p. 470–479, 2007.
- MÄKINEN, O. E. et al. Foods for special dietary needs: nondairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 339–349, 2016.
- MANOUSHI, N.; ZACHARIADIS, G. A. Determination of volatile compounds in nut-based milk alternative beverages by HS-SPME prior to GC-MS analysis. **Molecules**, v. 24, p. 3091, 2019.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.
- MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotics action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 204-210, 2006.
- MARÍA HEBERT, E., SAAVEDRA, L., & FERRANTI, P. Bioactive Peptides Derived from Casein and Whey Proteins. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (2010). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. WileyBlackwell. p. 233-249.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E.; FRIAS, J. Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and Evidence for Health Effects. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C & PEÑAS, E. (2017). **Fermented Foods in Health**

and Disease Prevention. Boston: Academic Press, p. 23-47.

MARTINS, F. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56(Pt 3), p. 352–359, 2007.

MARTINS, F. S. et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 623–630, 2009.

MARSH, A. J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 113-124, 2014.

MAYER, E. A.; TILLISCH, K.; GUPTA, A. Gut/brain axis and the microbiota. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 926–938, 2015.

MCKEAN, J. et al. Probiotics and Subclinical Psychological Symptoms in Healthy Participants: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.23, p.249–258, 2017.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 6, p. 157-171, 1993.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, p. 2202-2222, 2010.

MENEZES, A. G. T. et al. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187-197, 2018.

METCHNIKOFF, T. *The Prolongation of Life.* Heineman, London, UK, 1907.

MILLER, L. E.; LEHTORANTA, L.; LEHTINEN, M. J. Short-term probiotic supplementation enhances cellular immune function in healthy elderly: Systematic review and meta-analysis of controlled studies. **Nutrition Research**, v. 64, p. 1-8, 2019.

MORAIS, I. et al. Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P 6A and *Lactobacillus gasseri* P 65. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 155, 2017.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. - Health Benefits of Exopolysaccharides in Fermented Foods. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C & PEÑAS, E. (2017). **Fermented Foods in Health and Disease Prevention.** Boston: Academic Press, p. 49-62.

NAVARRETE-BOLAÑOS, J. L. Improving traditional fermented beverages: how to evolve from spontaneous to directed fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 410–418, 2012.

NASH, A. K. et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort, **Microbiome**, v. 5, p. 153, 2017.

NEJATI, F. et al. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ amino butyric acid (GABA). **LWT-Food Science and Technology**, v. 51, p. 183-189, 2013.

NIKI, E. et al. Inhibition of Oxidation of Biomembranes by Tocopherol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 23-31, 1989.

NOWAK, A.; MOTYL, I. *In vitro* anti-adherence effect of probiotic *Lactobacillus* strains on human enteropathogens. **Biotechnology and Food Science**, v. 81, p. 103-112, 2017.

OGAWA, M. et al. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 by probiotics *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 135-140, 2001.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, p. G807-819, 2010.

OLIVEIRA, A. C. DE; SILVA, R. S. DA. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, p. 189–197, 2014.

OSIMANI, A. et al. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 194, p. 62–70, 2015.

PANGHAL, A. et al. Potential nondairy probiotic products—A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, 2018.

PANIGRAHI, P. et al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. **Nature**, v. 548, p. 407–412, 2017.

PATEL, A., & PRAJAPAT, J. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Advances in Dairy Research**, v. 1, p. 1-7, 2013.

PAUCAR-MENACHO, L. M. et al. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. **Food Research International**, v. 43, p. 1856–1865, 2010.

PENNA, F. J. et al. Up to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. **Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 209-217, 2000.

- PLAZA-DIAZ, J. et al. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 15632-15649, 2014.
- PRIDMORE, R. D. et al. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, p. 210-215, 2008.
- PSOMAS, E. et al. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 125–133, 2001.
- PSANI, M.; KOTZEKIDOU, P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1329–1336, 2006.
- PUERARI, C. et al. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. **Food Microbiology**, v. 46, p. 210–217, 2015.
- PYNE, D. B. et al. Probiotics supplementation for athletes-clinical and physiological effects. **European Journal of Sport Science**, v. 15, p.63-72, 2015.
- RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 225–231, 2010.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1–7, 2010.
- RANADHEERA et al. Probiotic Delivery Through Fermentation: Dairy vs. Nondairy Beverages. **Fermentation**, v. 3, p. 67, 2017.
- RASANE, P. et al. Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 662–675, 2015.
- RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental food microbiology**.4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- REIFF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 25-33, 2010.
- RIAZI, S. et al. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1370-1377, 2009.

- RINGEL-KULKA, T. et al. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression. In patients with functional abdominal pain – a randomised clinical study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 200-207, 2014.
- ROLFE, R. D. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.
- SAMBRANI, R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* inhibits growth and metastasis and stimulates apoptosis in HT-29 colorectal cancer cell line. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, p. 985-995, 2019.
- SANGWAN, S. et al. Nutritional and functional properties of oats: an update. **Journal of Innovative Biology**, v. 1, p. 003, 2014.
- SANTOS, C. C. A. d. A. et al. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 32-41, 2014.
- SCHWAN, R. F.; RAMOS, C. L. Functional Beverages from Cereals. In: GRUMEZESCU, A., HOLBAN, A. M. (2019). **Functional and Medicinal Beverages**. Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p. 351–379.
- SCHOLZ-AHRENS, K. E.; AHRENS, F. & BARTH, C. A. Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. **European Journal of Nutrition**, v. 59, p. 19-34, 2020.
- SELHUB, E.M.; LOGAN, A.C.; BESTED, A.C. Fermented foods, microbiota, and mental health: Ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 33, p. 1-12, 2014.
- SEN, S.; MANSELL, T. J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. **Fungal Genetics and Biology**, v. 137, p. 1-8, 2020.
- SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, p. 3408-3423, 2016.
- SHETTY, P. H; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006.
- SILVA, T. et al. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their 668 potentially probiotic behavior. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, p.1349-1354, 2011.
- SILVA, A. R. A.; SILVA, M. M. N.; RIBEIRO, B. D. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. **Food Research International**, v. 131, p. 108972, 2020.

SIVAMARUTHI, B. S.; KESIKA, P.; CHAIYASUT, C. Impact of fermented foods on human cognitive function—A review of outcome of clinical trials. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, p. 22, 2018a.

SIVAMARUTHI, B. S.; KESIKA, P.; CHAIYASUT, C. A comprehensive review on functional properties of fermented rice bran. **Pharmacognosy Reviews**, v. 12, p. 218–224, 2018b.

SHAH, A. et al. Newly released oat varieties of Himalayan region—techno-functional, rheological, and nutraceutical properties of flour. **LWT-Food Science and Technology**, v. 70, p. 111–118, 2016.

SOTOUDEGAN, F. et al. Reappraisal of probiotics' safety in human. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 22-29, 2019.

SPILLER, R. Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28, p. 385–396, 2008.

STRAUSS, E.; CALY, W. R. Peritonite bacteriana espontânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 711–717, 2003.

SUDHA, M. R. et al. Probiotics as complementary therapy for hypercholesterolemia. **Biology and Medicine**, v. 1, p. 1-13, 2009.

SUN, J.; BUYS, N. J. Glucose- and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **British Journal of Nutrition**, v.115, p.1167–1177, 2016.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 377, 2016.

TAMANG, J. P. et al. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 578, 2016.

TAMANG, J. P. et al. Fermented foods in a global age: East meets West. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 19, p. 184-217, 2020.

TAPSELL, L.C. Fermented dairy food and CVD risk. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 131–135, 2015.

TIAGO, F.C.P. et al. Physiological Characterization of non-Saccharomyces yeasts from agroindustrial and environmental origins with possible probiotic function. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 657-666, 2009.

TOSH, S. M.; CHU, Y. Systematic review of the effect of processing of whole-grain oat cereals on glycaemic response. **The British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1256–1262, 2015.

- TSENG, W. T.; HSU, Y. W.; PAN, T. M. The ameliorative effect of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented rice extracts on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and the rat model of parkinson's disease. **Food and Function**, v. 7, p. 752–762, 2016.
- USINGER, L., IBSEN, H., & JENSEN, L. T. Does fermented milk possess antihypertensive effect in humans? **Journal of Hypertension**, v. 27, p. 1115-1120, 2009.
- VALERO-CASES, E. et al. Nondairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. **Nutrients**, v. 12, p. 1666, 2020.
- VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 10–20, 2018.
- VASUDHA, S.; MISHRA, H. N. Non-dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 7–15, 2013.
- VEIGA, P. et al. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6328, 2014.
- VENTURA, M. et al. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probionomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 61–71, 2009.
- VIJAYA, K. B. et al. Trends in dairy and nondairy probiotic products—A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6112–6124, 2015.
- VILLANO, D. et al. Capítulo 10—Development of Functional Foods. In **Innovation Strategies in the Food Industry**; Galanakis, C.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; p. 191–210.
- WALTHER, B., & SIEBER, R. Bioactive proteins and peptides in foods. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 81, p. 181-192, 2011.
- WAN, L. Y. M. et al. Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 2628-2641, 2015.
- WU, M. H. et al. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 104-110, 2010.
- YOUSEFI, B. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. **Journal off Cellular Physiology**, v. 234, p. 8008–8018, 2019.
- ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103-123, 2020.

ZHANG, H. *et al.* *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 777–782, 2013.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.67, p.571–580, 2015.

SEGUNDA PARTE**Artigo 1 Microrganismos potencialmente probióticos para produção de bebidas fermentadas não lácteas**

Resumo

Matrizes vegetais são uma alternativa aos laticínios fermentados como meio de transporte de microrganismos probióticos, especialmente para indivíduos intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite e adeptos da dieta vegana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de leveduras e bactéria em co-cultivo na produção de bebida fermentada à base de aveia, sementes de girassol e amêndoa. A viabilidade dos microrganismos foi avaliada após armazenamento refrigerado por 28 dias. O desempenho fermentativo dos microrganismos e o perfil sensorial também foram avaliados. Três cepas de leveduras potencialmente probióticas foram utilizadas, sendo elas *Pichia kluyveri* (CCMA 0615), *Pichia guilliermondi* (CCMA 1753) e *Debaryomyces hansenii* (CCMA 1761), juntamente com uma cepa de bactéria de ácido láctico, *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA0743), também com características probióticas potenciais. *L. plantarum* foi utilizado sozinho e em co-cultivo com as leveduras para fermentar os substratos. Todas as cepas testadas apresentaram viabilidade superior a 6,0 log UFC / mL, conforme recomendado para produtos alimentícios probióticos, exceto para a cepa *P. kluyveri*, que apresentou redução na contagem total. Foi observada redução no valor do pH, de aproximadamente 7 para, em média, 3,8, que ocorreu devido à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos inoculados. O ácido málico foi todo convertido em ácido láctico por meio da fermentação malolática, sendo o principal metabólito produzido durante a fermentação. Baixas concentrações de ácido acético e ácido succínico também foram detectadas. O etanol foi detectado em todos os tratamentos com 24 horas de fermentação, porém as concentrações foram menores que 5 g / L, valor máximo permitido para uma bebida ser considerada não alcoólica. 113 compostos voláteis foram detectados, incluindo álcoois, aldeídos, alcanos, alcenos, ácidos, éster, éter, cetonas, fenol, amidas e outros. A atividade antioxidante da bebida foi reduzida após o processo de fermentação. A análise sensorial mostrou que apenas os ensaios contendo *P. kluyveri* e *P. guilliermondi* apresentaram correlação entre eles. Em geral, todas as amostras foram descritas com características muito diferentes umas das outras. Os microrganismos avaliados no presente estudo mostraram-se propícios à fermentação de matrizes não lácteas, as quais, somadas às excelentes características probióticas, apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos. Entre os tratamentos, a combinação de *L. plantarum* + *Debaryomyces hansenii* se mostrou como o tratamento mais promissor para produção de uma bebida fermentada probiótica de origem vegetal. Esta combinação apresentou-se bem adaptada a matriz com alterações significativas sobre compostos químicos de interesse, boa estabilidade durante armazenamento, maior atividade antioxidante e preservação de atributos sensoriais desejáveis.

Palavras-chave: Probióticos. Co-cultura. Bebida não láctea.

1. Introdução

Probióticos, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2002) e Hill et al., (2014), são microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, podendo ser consumidos por meio de alimentos fermentados ou como suplementos dietéticos (VALERO-CASES et al., 2020). A forma mais utilizada para o transporte de microrganismos probióticos são os alimentos lácteos fermentados, como por exemplo leites fermentados, iogurtes e queijos. No entanto, pessoas que apresentam alergia a proteína do leite, indivíduos intolerantes a lactose e os que são estritamente vegetarianos/veganos praticamente não tem acesso a produtos probióticos. Assim, existe grande demanda por parte desses consumidores de uma alternativa a estes produtos, buscando explorar matrizes não lácteas que também possam servir como carreadores para microrganismos probióticos (GRANATO et al., 2010; VIJAYA et al., 2015).

As principais matrizes utilizadas para a elaboração de bebidas vegetais probióticas são o leite de soja, leite de arroz e o leite de coco (RASIKA et al., 2021). O mercado global de produtos alternativos aos fermentados lácteos foi avaliado em US \$ 8,51 bilhões em 2016 e estima-se que aumentará para ~US \$ 24,6 bilhões até 2025 (HAAS et al., 2019). O leite a base de soja é muito consumido, principalmente nos países asiáticos, devido ao seu alto valor nutricional, contendo proteínas de alta qualidade, ácidos graxos essenciais e micronutrientes. Já nos países ocidentais o consumo ainda é baixo, isso porque apresentam indesejáveis sabores de feijão (CAI et al., 2021; DURBAN et al., 2021; ANDRÉS, TENORIO & VILLANUEVA, 2015). Além disso, a soja está entre os 8 alimentos mais comuns no mundo que causam alergias (DURBAN et al., 2021), o que torna uma limitação para o uso desse alimento por pessoas com alergias à esta leguminosa. Nesse sentido, outras matrizes estão sendo exploradas para o desenvolvimento de bebidas não lácteas carreadoras de probióticos, como por exemplo, cereais (aveia, espelta, milho), nozes (amêndoas, castanha do Brasil, castanha de caju, avelãs) e sementes (gergelim, girassol) (GOBII et al., 2019; SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016).

A aveia é um cereal rico em β -glucano, lipídios dietéticos, proteínas, amido, compostos fenólicos antioxidantes e fibras solúveis como oligossacarídeos e polissacarídeos (RASANE et al., 2015; SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016). As

amêndoas são excelentes fontes de cálcio, magnésio, selênio, potássio, zinco, fósforo, cobre, vitamina E, possui propriedades prebióticas (SETHI, TYAGI & ANURAG, 2016; BURTON & INGOLD, 1989; NIKI et al., 1989), são consideradas benéficas para o trânsito intestinal, além de atuarem na prevenção de anemia, câncer e também na proteção contra radicais livres (RONCERO et al., 2016). Já as sementes de girassol são fontes potássio, fósforo, cálcio e contém aminoácidos essenciais como valina, isoleucina e leucina (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1994).

Além da escolha das matrizes e suas características nutricionais, outro fator importante quando se trata de bebidas não lácteas carreadoras de probióticos é a viabilidade dos mesmos nessas matrizes vegetais. Para exercer os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro os probióticos devem ser ingeridos em concentrações adequadas - 10^6 - 10^7 UFC / mL ou g (HILL et al., 2014). Alguns estudos sugerem que a doses devem ser de 10^6 - 10^9 UFC / mL ou g para que os microrganismos cheguem ao intestino em uma concentração suficiente para conferir os efeitos benéficos (GROM et al., 2020). Matrizes não lácteas podem apresentar características que limitam a viabilidade dos probióticos quando comparada às matrizes lácteas. Leites vegetais podem conter fatores antinutricionais, pH desfavorável e menor disponibilidade de nutrientes. Além disso, a maioria dos probióticos são isolados de substratos lácteos, portanto essas cepas podem não encontrar condições favoráveis para crescimento, multiplicação e viabilidade em matrizes vegetais (VALERO-CASES et al., 2020; RASIKA et al., 2021).

Com o intuito de explorar matrizes vegetais para transporte de microrganismos probióticos e selecionar cepas capazes de se adaptar a estas matrizes, o objetivo do trabalho foi avaliar a performance de leveduras e bactéria em co-cultivo na elaboração de bebida fermentada não láctea. Foram avaliadas a viabilidade dos microrganismos após armazenamento refrigerado por 28 dias, as performances fermentativas dos microrganismos e o perfil sensorial.

2. Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos e condições de cultura

As leveduras *Pichia kluyveri* CCMA 0615, *Debaryomyces hansenii* CCMA 1761, *Pichia guilliermondi* CCMA 1753 e a bactéria *Lactiplantibacillus plantarum* (antigo

Lactobacillus plantarum) CCMA 0743, todas fornecidas pela Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (Brasil) foram utilizadas neste trabalho. O *Lactiplantibacillus plantarum* foi isolado do Cauim, bebida indígena fermentada (RAMOS et al., 2011). As leveduras foram isoladas da fermentação natural de cacau (CCMA 0615, MOREIRA et al., 2013) e de azeitonas fermentadas (CCMA 1753 e CCMA 1761, SIMÕES et al., 2021). Os microrganismos foram previamente selecionados com base em características tecnológicas probióticas (FONSECA et al., 2020; MENEZES et al., 2019; SIMÕES et al., 2021). As leveduras e a bactéria láctica (BAL) foram armazenados a -80°C em caldo de extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) a 10 g / L de extrato de levedura (Merck, Darmstadt, Alemanha), 10 g / L de peptona (Himedia, Mumbai, Índia), 20 g / L de glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha) e caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemanha), respectivamente, com 20% (v / v) de glicerol. As cepas de levedura e BAL foram reativadas em ágar YPD e ágar MRS, respectivamente, e incubadas por 24 h a 30°C para levedura e 37°C para BAL.

2.2 Desenvolvimento da bebida vegetal fermentada

O meio para os ensaios de fermentação controlada foi preparado conforme a formulação: para cada 900 mL de água foi utilizado 175g de sementes de girassol, 75g de aveia e 75 g de amêndoas (50% crua e 50% torrada sem sal). Antes do preparo da bebida todos os componentes foram deixados imerso em água filtrada over-night. Todos os substratos foram misturados e batidos no liquidificador até serem completamente triturados (BRUNO et al., 2020). A bebida foi filtrada para retirar a massa triturada e obter somente o “leite” vegetal. A pasteurização foi realizada a 80°C por 40 minutos. Em seguida, as bebidas foram colocadas em gelo para a etapa de choque térmico, onde ficaram até arrefecimento completo. Após esse processo, os microrganismos foram adicionados conforme descrito abaixo. A bebida foi fermentada durante 24 horas a 30°C . Os substratos foram adquiridos no mercado local de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

2.3 Ensaios de fermentação e amostragem

Cinco tratamentos foram realizados com diferentes microrganismos: (1) *L. plantarum* CCMA 0743 + *Pichia kluyveri* CCMA 0615; (2) *L. plantarum* CCMA 0743 + *Pichia guilliermondi* CCMA 1753; (3) *L. plantarum* CCMA 0743 + *Debaryomyces hansenii* CCMA 1761; (4) somente *L. plantarum* CCMA 0743 e (5) controle sem nenhum inóculo. As leveduras e a BAL já crescidos foram centrifugadas e ressuspensas no meio de fermentação com uma população de 6,0 log UFC/mL para as leveduras e 7,0 log UFC/ml para a bactéria. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL da bebida vegetal, a 30 ° C por 24 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas de fermentação para contagem dos microrganismos e avaliação de pH. Ao final da fermentação as bebidas foram mantidas sob refrigeração a 4 ° C por 28 dias. Também foram retiradas amostras com 7, 14, 21 e 28 dias de refrigeração para análises subsequentes.

2.4 Enumeração dos microrganismos

As populações totais de BAL, levedura, Enterobacteriaceae e fungos filamentosos foram determinadas por plaqueamento em ágar MRS (suplementado com 4 mL / L de nistatina), ágar YPD (suplementado com 0,1g / L de cloranfenicol), meio de ágar (Merck) de glicose biliar vermelho violeta (VRBG) e meio ágar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) (Kasvi), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 ° C (BAL e Enterobacteriaceae) e a 30 ° C (levedura e fungos filamentosos) durante 24 h e 7 dias para os fungos filamentosos. Após o período de incubação as unidades formadoras de colônias (UFC) foram enumeradas. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Análises Químicas

2.5.1 Determinação do pH durante a fermentação

O pH das amostras da bebida em fermentação foi medido nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas com o auxílio de um pHmetro (Tecnal, Tec-3MT, São Paulo, Brasil).

2.5.2 Análise de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos

As análises dos metabólitos foram realizadas usando um HPLC (Modelo LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), equipado com um sistema de detecção duplo consistindo de um detector de UV-vis (SPD-10Ai; Shimadzu) e um detector de índice de refração (RID-10Ai; Shimadzu). Uma coluna de exclusão de íons Shimadzu (Shim-pack SCR-101H, 7,9 mm × 30 cm) foi usada para álcoois, determinação de carboidratos (30 ° C) e ácidos orgânicos (50 ° C) (DUARTE et al., 2010). Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção dos padrões e suas concentrações determinadas pelo método de calibração externa. Todas as amostras foram examinadas em duplicata.

2.5.3 Extração de compostos voláteis e análise de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS)

Os compostos voláteis das amostras de bebidas foram extraídos pela técnica de microextração em fase sólida no headspace (SPME-HS), conforme descrito por Menezes et al., 2016 , com pequenas modificações. Dois mL das amostras foram colocados em um frasco de amostra de 15 mL. Uma fibra de 50/30 µm de divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB / CAR / PDMS) fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA, EUA) foi usada para extrair os compostos voláteis. Esta fibra foi balanceada por 15 min a 60 ° C e então exposta às amostras em frascos de 15 mL por 30 min na mesma temperatura. Os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) (Modelo GCMS-QP2010SE; Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma coluna de cera Carbo (30 m × 0,25 mm id × 0,25 µm espessura do filme). A temperatura do forno foi fixada em 40 ° C por 5 min, aumentada até atingir 220 ° C (a uma taxa de 10 ° C / min) e, finalmente, mantida nesta temperatura por 10 min. O gás de arraste foi o hélio de alta pureza, a 0,7 mL / min. Foi usada injeção sem divisão. O detector seletivo de massa foi um quadrupolo, com sistema de ionização por impacto eletrônico a 70 eV e 250 ° C. Os compostos voláteis foram identificados utilizando o software GC / MS Solution ver. 2.6.

2.6 Atividade antioxidante pelos métodos complexo fosfomolibdênio e eliminação do radical ABTS

Os extratos foram obtidos de acordo com o método descrito por De Souza et al., (2012) com pequenas modificações. Resumidamente, 5 mL das amostras da bebida foram adicionadas em tubos de centrífuga e extraídas sequencialmente com 10 mL de metanol 50% (v / v) à 25 ° C por 1 hora. Os tubos foram centrifugados a 7000 rpm em temperatura ambiente por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado. Em seguida, foram adicionados 10 mL de acetona 70% (v / v) ao resíduo à temperatura ambiente. As amostras foram extraídas por 1 hora e centrifugadas, nas mesmas condições de antes. Os extratos de metanol e acetona foram usados para a determinação da atividade antioxidante como segue.

2.6.1 Método complexo fosfomolibdênio (PCM)

A atividade antioxidante foi determinada pelo PCM de acordo com a metodologia modificada descrita por Prieto, Pineda, & Aguilar (1999). Uma alíquota de 100 µl do extrato da amostra foi colocada em tubos e misturada com 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 1,8 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria a 95 ° C por 90 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e a absorbância do complexo de fosfomolibdênio foi medida a 695 nm. Uma mistura contendo metanol 50% e acetona 70% (1: 1) foi utilizada como branco. A quantificação foi baseada em uma curva padrão de ácido ascórbico (1,95 a 500 µg), e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por mL de amostra.

2.6.2 Eliminação do radical ABTS

A atividade de eliminação de radical das amostras da bebida fermentada foi avaliada utilizando o radical 2,20-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) de acordo com Re et al., (1999) com pequenas modificações. Resumidamente 30 µl dos extratos das amostras ou da substancia referência (Trolox) foram adicionados a 3 mL da solução de radical ABTS e deixados reagir no escuro por 6 minutos. A absorbância foi medida a 734 nm. A quantificação foi baseada em uma curva padrão de Trolox, e os resultados são expressos como micromoles de equivalentes de Trolox (TE) por mL da amostra (µmol de TE / mL).

2.7 Análise sensorial

Análise sensorial foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dairou & Sieffermann, (2002). Os avaliadores se reuniram em três sessões. Cinco amostras codificadas (quatro fermentadas e uma não fermentada) foram apresentadas simultaneamente durante a primeira sessão. Os avaliadores precisavam descrever os atributos mais importantes, que deveriam ser suficientemente discriminantes para diferenciar as amostras quanto à aparência, sabor, textura, odor e gosto residual. Na segunda sessão, eles procederam à avaliação para classificar todas as amostras em seus atributos de acordo com as diferenças de intensidade em uma escala ordinal ancorada de "inferior" para "superior" (empates eram permitidos). A terceira sessão foi uma réplica da etapa de avaliação. As bebidas vegetais (40 mL) foram servidas à temperatura de consumo ($4,0 \pm 1,0$ ° C), sendo fornecida água mineral para enxágue da boca entre as amostras. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFLA (CAAE: 48881621.0.0000.5148).

2.8 Análise Estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott com significância no nível de $p < 0,05$. Os dados foram analisados por meio do software SISVAR versão 5.8 (FERREIRA, 2014).

A Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa foi analisada por Análise de Componentes Principais (PCA) usando o software SensoMaker 1.92 (NUNES & PINHEIRO, 2012).

A análise sensorial foi realizada pelo método Flash Profile. Uma configuração de consenso para os dados foi fornecida pela análise Procrustes generalizada (GPA). Apenas atributos citados por pelo menos três provadores (20% do painel) foram usados para visualizar a relação entre atributos e as bebidas. Os dados do perfil All-Flash foram realizados pelo software XLSTAT® 2020.4.1 (Addinsoft™, Paris, França).

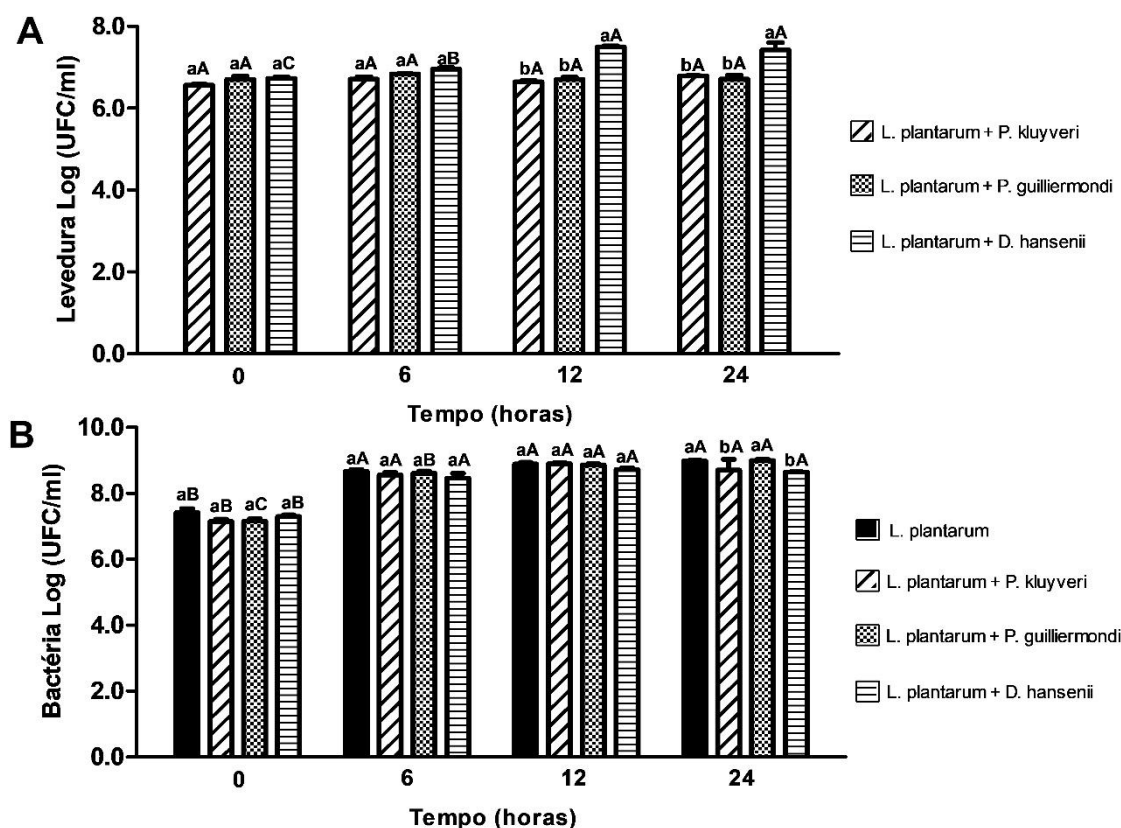
3. Resultados e Discussão

3.1 Processo fermentativo, perfil de crescimento e acidificação da bebida

Neste estudo foi utilizado o processo de co-fermentação envolvendo uma BAL e diferentes leveduras. O uso da combinação de leveduras com bactérias lácticas para a fermentação de bebidas não lácteas é bem estabelecido na literatura (MENEZES et al., 2018; LU et al., 2018; FREIRE, RAMOS & SCHWAN, 2017; FREIRE, RAMOS & SCHWAN, 2015; SANTOS et al., 2014; RAMOS et al., 2010). O uso somente de leveduras poderia acarretar na alta produção de álcool, que é indesejável para uma bebida probiótica (não alcóolica). As concentrações de álcool presentes em bebidas não alcóolicas variam de acordo com a legislação de cada país (IGNAT et al., 2020). A legislação brasileira considera bebidas não alcóolicas aquelas que apresentam no máximo 5 g/L de álcool (BRASIL, 2009). Segundo Freire, Ramos e Schwan (2015), a menor produção de álcool em co-fermentação ocorre devido à competição por nutrientes entre as leveduras e a bactéria, resultando na falta de açúcares fermentáveis para a produção do álcool pelas leveduras. Além disso, a matriz vegetal utilizada teve como base três diferentes componentes (aveia, sementes de girassol e amêndoas). O que possibilita uma maior diversidade de nutrientes para os microrganismos, aprimorando metabolismo e conseqüentemente crescimento (GRANATO et al., 2010; SILVA, SILVA & RIBEIRO, 2020).

A figura 1 mostra o crescimento microbiano durante o processo fermentativo. No início da fermentação não houve diferenças significativas na contagem entre tratamentos, tanto para o tempo 0, quanto após 6 horas. A cepa *Debaryomyces hansenii* expressou o maior ($p < 0,05$) crescimento populacional (11,45%) com 12 horas e se manteve estável até o final da fermentação apresentando valores em torno de 7,5 log UFC/ml. *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondi* apresentaram comportamento semelhante ao longo da fermentação, mantendo a contagem em torno de 6,7 log UFC/ml (Figura 1A). Embora *D. hansenii* tenha conseguido se desenvolver bem, o mesmo não ocorreu para *P. kluyveri* e *P. guilliermondi*. É possível que a presença da bactéria interfira negativamente no crescimento de ambas as leveduras através da produção de metabólitos ou até mesmo pela competição de nutrientes.

Figura 1- Crescimento microbiano durante a fermentação.



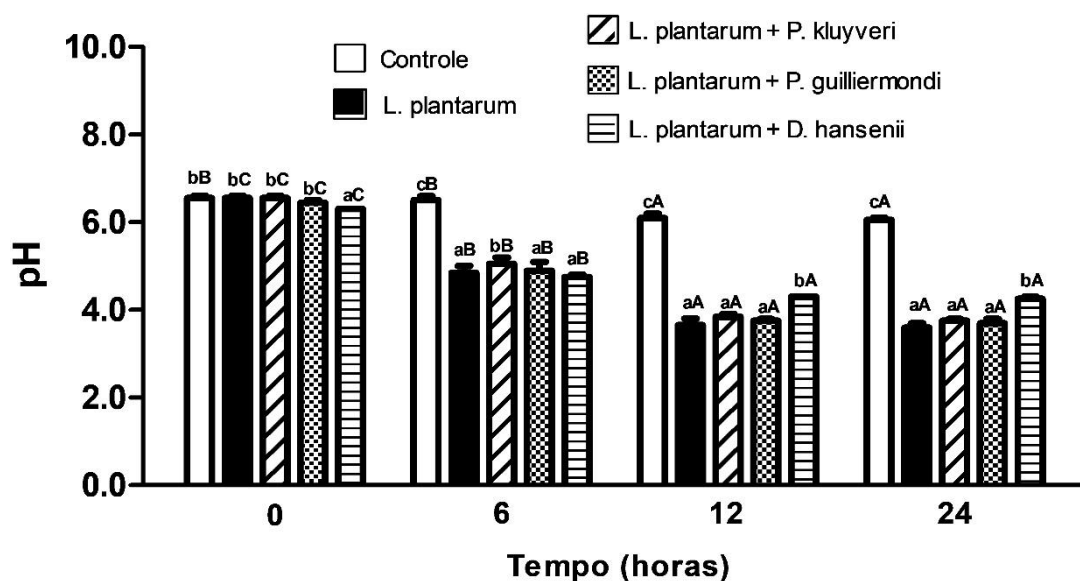
A – contagem das leveduras. B – contagem da bactéria. Diferentes letras minúsculas denotam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos durante o mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) do mesmo tratamento em tempos diferentes de acordo com o teste de Scott Knott

A contagem de *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 também foi monitorada ao longo do processo fermentativo (Figura 1B), com o intuito de verificar se as cepas de leveduras utilizadas teriam efeito, positivo ou negativo, no crescimento da bactéria. Estudos já relataram interações positivas e negativas entre leveduras e bactérias do ácido lático (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008). Após 6 horas de fermentação a contagem da bactéria expressou aumento ($p < 0,05$) de, em média, 18,23% para todos os tratamentos, ficando acima de 8,0 log UFC/ml. Com 12 horas de fermentação a contagem ainda permanecia alta e estável para todos os tratamentos. Ao final do processo fermentativo os ensaios de monocultura e co-cultura contendo *P. guilliermondi* mostraram aumento de 21,05% e 24,33%, respectivamente na contagem atingindo valores próximos de 9,0 log UFC/mL. Para os ensaios contendo *P. kluuyveri* e *D. hansenii*, houve uma pequena redução de 2,14% e 0,92%, respectivamente. Os resultados revelam que a presença das leveduras não interferiu negativamente no crescimento da bactéria.

Enterobactérias e fungos filamentosos não foram detectados em nenhum dos tratamentos (dados não mostrados), nem no início e nem ao final da fermentação. A pasteurização e a diminuição do pH pela atividade da cultura inoculada são fatores que podem contribuir para inibição do crescimento desses microrganismos.

A queda do pH durante o processo fermentativo é demonstrada na figura 2. A acidificação das bebidas foi avaliada nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas. O final da fermentação foi determinado pela estabilização do pH. Observou-se que a partir das 12 horas de fermentação o pH permaneceu estável. O controle se manteve estável durante quase toda fermentação, apresentando pequena alteração ($p < 0,05$) do tempo 6 para 12 horas. No geral, todos os tratamentos apresentaram queda ($p < 0,05$) no pH quando comparados ao controle. Com 6 horas de fermentação os ensaios contendo *P. guilliermondi*, *D. hansenii* e *L. plantarum* em monocultura apresentavam pH abaixo de 5,0. Com 24 horas, os menores valores de pH foram observados para os ensaios contendo *P. kluyveri* (3,75), *P. guilliermondi* (3,70) e *L. plantarum* (3,60). O ensaio com *D. hansenii* foi capaz de reduzir o pH (4,25), porém em menor intensidade que os demais tratamentos. A redução do pH ocorre devido à produção de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo a partir da ação dos microrganismos que foram inoculados (MENEZES et al., 2018). O baixo pH, proporcionado pelos ácidos orgânicos presentes na bebida, influenciam de forma benéfica a atividade probiótica dos microrganismos. A presença desses ácidos reduz o pH intestinal, inibindo o crescimento de patógenos. Além disso, aumentam o peristaltismo, o que faz com que os patógenos sejam removidos de forma indireta ao acelerar o trânsito intestinal (KAILASAPATHY & CHIN, 2000; LARROIA & MARTIN, 1990). A redução do pH da bebida é de grande importância, pois irá influenciar na vida útil e também evitar a contaminação do alimento (ADESULU-DAHUNSI, DAHUNSI & OLAYANJU, 2020; RATHORE et al., 2012).

Figura 2- Redução do pH durante o processo fermentativo.



Diferentes letras minúsculas denotam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos durante o mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) do mesmo tratamento em tempos diferentes de acordo com o teste de Scott Knott.

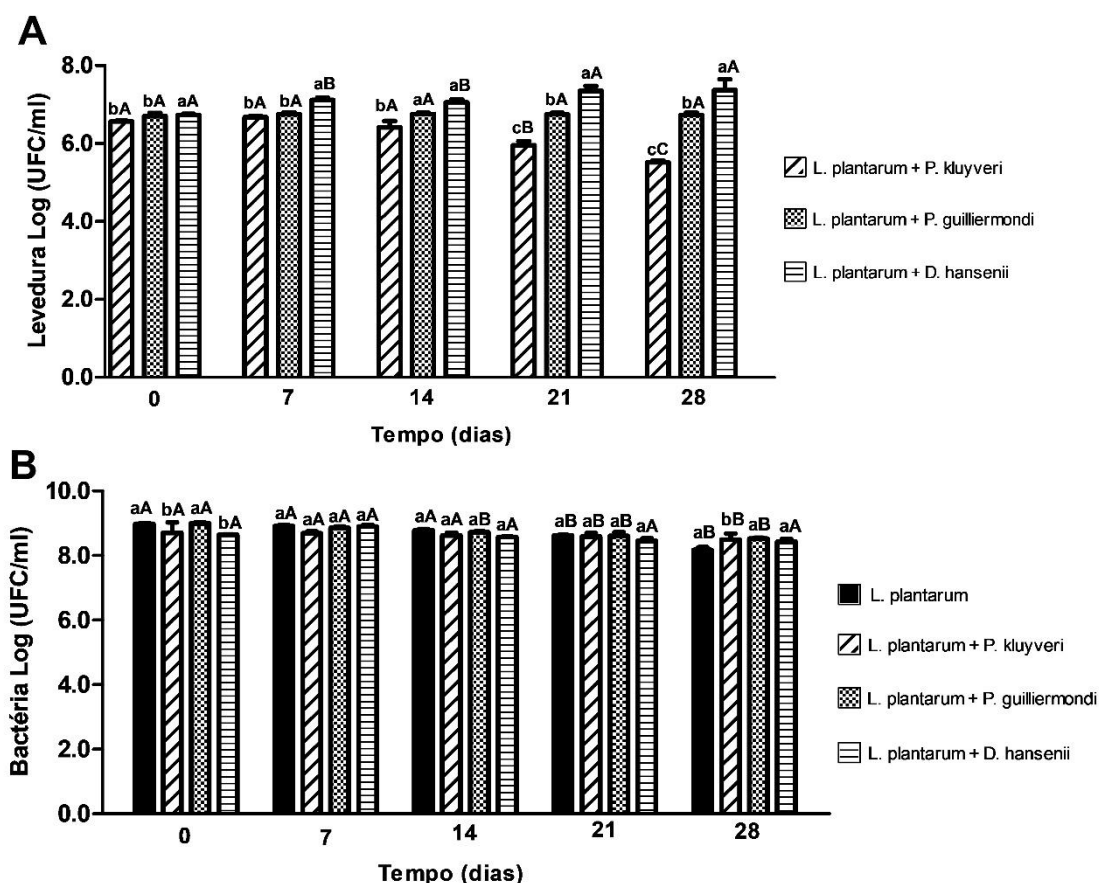
3.2 Viabilidade probiótica durante o período de estocagem

O número adequado de microrganismos probióticos no momento do consumo é um desafio, pois as condições de armazenamento afetam a viabilidade dos organismos probióticos (TRIPATHI & GIRI, 2014).

A viabilidade da bactéria e das leveduras potencialmente probióticas foi analisada após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4° C e os dados são mostrados na figura 3. Os dados obtidos mostram que a levedura *P. guilliermondi* manteve contagem estável ($p < 0,05$) durante todo o período de estocagem apresentando valores em torno de 6,7 log UFC/mL (Figura 3A). Já a *P. kluveri*, manteve sua contagem até 14 dias, mas aos 21 dias de armazenamento apresentou redução de 12,37%. Menezes et al., (2018), trabalhando com milho como substrato para a fermentação e utilizando a mesma cepa CCMA 0615 (*P. kluveri*) também observou queda no número de células viáveis desta levedura durante a estocagem, mostrando sua susceptibilidade em temperaturas mais baixas. A cepa *D. hansenii* apresentou boa estabilidade, chegando a apresentar aumento na contagem a partir do vigésimo primeiro dia ficando acima de 7,0 log UFC/mL até o final do período de refrigeração. *D. hansenii* é capaz de crescer em temperaturas baixas, até mesmo abaixo de 0 °C (BREUER & HARMS, 2006) e também em ambientes ácidos, pH em torno de 3,0 (ADESULU-DAHUNSI, DAHUNSI & OLAYANJU, 2020; NOUT

& SARKAR, 1999). O aumento no número de células apresentado por *D. hansenii* pode estar relacionando a essas duas características, isso fez com que ela sobressaísse em relação as outras leveduras durante o armazenamento.

Figura 3- Viabilidade probiótica no período de armazenamento de 28 dias a 4 °C.



A – contagem das leveduras. B – contagem da bactéria. Diferentes letras minúsculas denotam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos durante o mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas denotam uma diferença ($p < 0,05$) do mesmo tratamento em tempos diferentes de acordo com o teste de Scott Knott.

Em relação a dinâmica do crescimento de *L. plantarum*, a bactéria conseguiu manter ($p < 0,05$) a viabilidade desde o final da fermentação até o ultimo dia de estocagem, quando cultivada juntamente com *D. hansenii* (Figura 3B). Menezes et al., (2018) também verificaram maior viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus paracasei* quando cultivado com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0731 e 0732). *L. plantarum* em cultivo simples apresentou contagem de 8,97 log UFC/mL ao final da fermentação (tempo 0 de estocagem), mas com 21 dias de refrigeração foi observada

redução de 2,05%, expressando contagem de 8,60 log UFC/mL. No ensaio contendo *P. guilliermondi* a bactéria se manteve estável ($p < 0,05$) até o sétimo dia de armazenamento, apresentando uma queda sutil de 2,13% no número de células a partir do décimo quarto dia. Enquanto no ensaio com *P. kluyveri*, apresentou redução de 1,86% na contagem com 21 dias de armazenamento. Mesmo com as reduções na contagem viável das células, todos os ensaios apresentaram valores acima de 8,0 log UFC/mL ao final do armazenamento. Destaque para, o ensaio *L. plantarum* + *D. hansenii* que se mostrou o tratamento com melhor estabilidade/viabilidade durante a estocagem. Coda et al., (2012), utilizaram cepas de *L. plantarum* (6E e M6) para fabricar bebidas vegetais com diversos substratos (arroz, aveia, soja, cevada) e ambas as cepas mostraram alta densidade celular viável (8,0 log UFC/ml) após 30 dias de armazenamento. Mesquita et al., (2020), trabalhando com grão de bico e coco para produção de bebidas, relataram estabilidade probiótica da cepa *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante armazenamento. A presença de compostos, como por exemplo vitaminas e aminoácidos, dióxido de carbono, piruvato, propionato e succinato produzidos pelas leveduras durante a fermentação influenciam no crescimento da bactéria e também na sua resistência ao armazenamento refrigerado, assegurando a viabilidade e, conseqüentemente, aumentando o tempo de prateleira da bebida (ROOSTITA & FLEET, 1996; LEROY & PIDOUX, 1993).

Microrganismos probióticos em matrizes não lácteas são mais propensos a perder sua viabilidade do que em matrizes lácteas (MARSH et al., 2014), e garantir a viabilidade desses microrganismos durante processamento e armazenamento, a fim de manter sua alta concentração ($10^6 - 10^9$ UFC/mL) é essencial para que no momento do consumo o produto possa exercer os efeitos benéficos (BRASIL, 2002; MARSH et al., 2014; VALERO-CASES et al., 2020; GROM et al., 2020). Os dados mostram que duas leveduras (*P. guilliermondi* e *D. hansenii*), juntamente com *L. plantarum*, ficaram dentro das concentrações adequadas ($10^6 - 10^9$ UFC/mL) mesmo após 28 dias em refrigeração.

3.3 Consumo de açúcares e metabólitos produzidos

Os resultados da análise de carboidratos, ácidos orgânicos e álcool avaliados por HPLC são mostrados na Tabela 1. Os compostos foram quantificados no início (0 h) e final da fermentação (24 h). A sacarose foi o principal carboidrato detectado. O mesmo foi observado por Menezes et al., 2018 e Freire, Ramos e Schwan, 2017, trabalhando com

cereais como substrato. Mauro & Garcia, 2019, utilizando coco para produção de bebida não láctea também observaram maiores concentrações de sacarose no início da fermentação. Sacarose, glicose e frutose foram consumidas durante o processo fermentativo, mas concentrações residuais ainda foram observadas às 24 horas. A glicose é o carboidrato mais preferível para todas as leveduras (KIM et al., 2013; HORAK, 2013). Mesmo com outros açúcares presentes durante a fermentação, o maior consumo foi observado para glicose (em média 80,88%) enquanto que o consumo de sacarose foi de 75,30% e de frutose 63,63%. Nenhuma alteração foi detectada no controle para todos os compostos, visto que não houve inoculação com microrganismos.

O ácido málico, presente no início da fermentação, foi convertido em ácido láctico, se tornando o principal metabólito produzido. A conversão dos ácidos ocorreu através da fermentação malolática que é definida como a conversão de ácido L-málico, um ácido dicarboxílico, em ácido L-láctico, um ácido monocarboxílico, com a produção de CO₂. A reação é catalisada por bactérias do ácido láctico, incluindo bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (WIBOWO et al., 1985). Já foi demonstrado que em baixo pH, *Lactobacillus plantarum* CECT 220 é capaz de degradar o ácido málico como forma de proteção (GARCIA, ZUNIGA & KOBAYASHI. 1992). *L. plantarum* quando cultivado juntamente com *P. kluyveri* apresentou a maior concentração de ácido láctico (5,81 g/L), seguido pelo ensaio de cultura simples (5,75 g/L). A presença do ácido acético também foi detectada após 24 horas de fermentação apresentado concentrações com variação de 0,03 g/L e 0,07 g/L entre os tratamentos. *L. plantarum* é heterofermentativo facultativo, podendo ter como produtos, além do ácido láctico, o ácido acético e/ou etanol. O comportamento heterofermentativo é expresso quando em condições de limitação de glicose (KANDLER & WEISS, 1986; CORSETTI & SETTANI, 2007; MAYO et al., 2010). As baixas concentrações de glicose observadas ao final da fermentação explicam o comportamento heterofermentativo do microrganismo. O ácido cítrico foi consumido durante a fermentação, mas não por completo. Concentrações residuais ainda puderam ser observadas. Já o ácido succínico apresentou pequeno aumento nas concentrações com 24 horas de fermentação e se manteve constante para todos os tratamentos expressando valores abaixo de 1,0 g/L. Menores concentrações de ácido succínico também foram observadas por Mauro & Garcia, 2019. A presença dos ácidos orgânicos durante a fermentação é de grande importância, pois são eles que irão

influenciar no sabor do produto final (SALIM-UR-REHMAN, PATERSON, & PIGGOTT, 2006).

Em relação as concentrações de álcool, somente o etanol foi detectado ao final da fermentação. O ensaio contendo *D. hansenii* apresentou a maior concentração (0,42 g/L) desse composto, isso pode estar relacionado ao fato da levedura ter melhor se adaptado a matriz fermentativa. Nos demais ensaios as concentrações foram menores, porém mensuráveis. Todos os ensaios apresentaram valores abaixo de 5 g/L, concentração máxima permitida para uma bebida ser considerada não alcoólica.

Tabela 1 - Concentração de carboidratos, ácidos orgânicos e álcoois em bebida à base de aveia, sementes de girassol e amêndoas fermentada com diferentes inóculos.

		Concentração dos Compostos (g/L)								
Fermentação (horas)	Amostras	Sacarose	Glicose	Frutose	Ácido Cítrico	Ácido Málico	Ácido Succínico	Ácido Lático	Ácido Acético	Etanol
0	Controle	0,79 ± 0,07 ^{aA}	0,68 ± 0,11 ^{aA}	0,33 ± 0,00 ^{aA}	0,30 ± 0,00 ^{aA}	0,12 ± 0,03 ^{aA}	0,01 ± 0,00 ^{bB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
	<i>L. plantarum</i> + CCMA 0615	0,78 ± 0,11 ^{aA}	0,68 ± 0,08 ^{aA}	0,33 ± 0,11 ^{aA}	0,30 ± 0,00 ^{aA}	0,11 ± 0,00 ^{aA}	0,03 ± 0,01 ^{aB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
	<i>L. plantarum</i> + CCMA 1753	0,78 ± 0,15 ^{aA}	0,67 ± 0,11 ^{aA}	0,32 ± 0,04 ^{aA}	0,30 ± 0,00 ^{aA}	0,12 ± 0,00 ^{aA}	0,03 ± 0,00 ^{aB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
	<i>L. plantarum</i> + CCMA 1761	0,79 ± 0,07 ^{aA}	0,67 ± 0,14 ^{aA}	0,32 ± 0,07 ^{aA}	0,30 ± 0,00 ^{aA}	0,12 ± 0,01 ^{aA}	0,01 ± 0,00 ^{bB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
	<i>L. plantarum</i> (CCMA 0743)	0,79 ± 0,09 ^{aA}	0,68 ± 0,16 ^{aA}	0,32 ± 0,10 ^{aA}	0,30 ± 0,00 ^{aA}	0,12 ± 0,00 ^{aA}	0,01 ± 0,00 ^{bB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
24	Controle	0,79 ± 0,15 ^{aA}	0,67 ± 0,47 ^{aA}	0,33 ± 0,02 ^{aA}	0,30 ± 0,01 ^{aA}	0,12 ± 0,01 ^{aA}	0,01 ± 0,00 ^{bB}	ND ^{eB}	ND ^{dB}	ND ^{cB}
	<i>L. plantarum</i> + CCMA 0615	0,19 ± 0,01 ^{bB}	0,13 ± 0,00 ^{bB}	0,12 ± 0,01 ^{bB}	0,15 ± 0,00 ^{dB}	ND ^{bB}	0,07 ± 0,00 ^{aA}	5,81 ± 0,02 ^{aA}	0,03 ± 0,00 ^{cA}	0,07 ± 0,04 ^{bA}
	<i>L. plantarum</i> + CCMA 1753	0,14 ± 0,02 ^{bB}	0,12 ± 0,01 ^{bB}	0,10 ± 0,00 ^{bB}	0,18 ± 0,00 ^{cB}	ND ^{bB}	0,06 ± 0,00 ^{aA}	5,71 ± 0,00 ^{cA}	0,04 ± 0,00 ^{bA}	0,04 ± 0,00 ^{bB}

<i>L. plantarum</i> + CCMA 1761	0,19 ± 0,02 ^{bB}	0,13 ± 0,00 ^{bB}	0,14 ± 0,00 ^{bB}	0,21 ± 0,00 ^{bB}	ND ^{bB}	0,06 ± 0,00 ^{aA}	2,08 ± 0,00 ^{dA}	0,07 ± 0,00 ^{aA}	0,42 ± 0,06 ^{aA}
<i>L. plantarum</i> (CCMA 0743)	0,26 ± 0,00 ^{bB}	0,14 ± 0,00 ^{bB}	0,12 ± 0,01 ^{bB}	0,18 ± 0,00 ^{cB}	ND ^{bB}	0,11 ± 0,00 ^{aA}	5,75 ± 0,01 ^{bA}	0,03 ± 0,00 ^{cA}	0,07 ± 0,00 ^{bA}

ND = não detectado. Média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna denotam diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos em um mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna denotam diferenças ($p < 0,05$) do mesmo tratamento em tempos diferentes de acordo com o teste de Scott Knott.

3.4 Identificação dos compostos voláteis por GC-MS

Os compostos voláteis são considerados muito importantes pelas indústrias de alimentos, pois possuem papel fundamental na determinação dos perfis sensoriais dos produtos alimentares (CAPOZZI et al., 2016).

Um total de 113 compostos foram identificados por GC-MS, considerando todos os ensaios de fermentação. Esses compostos incluem álcoois, aldeídos, alcanos, alquenos, ácidos, ésteres, éteres, cetonas, fenol, amida e outros (Tabela 2). Os principais compostos identificados foram os álcoois, 28 no total. Os álcoois são compostos essenciais de qualquer fermentação microbiana (NISSEN, CASCIANO & GIANOTTI, 2021). Os ensaios contendo *L. plantarum* + *P. guilliermondi* e *L. plantarum* + *Debaryomyces hansenii* apresentaram maior número de compostos alcoólicos do que o ensaio de cultura simples (*L. plantarum*). O mesmo foi observado por Menezes et al., 2018. Alguns álcoois que apresentam aromas desejáveis para a bebida foram detectados ao final da fermentação, sendo eles 1-hexanol (odor frutado e sabor aromático), 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl (coentro, floral, lavanda, limão e rosa), 1-octanol (odor fresco de laranja-rosa, que é bastante doce), 1-nonanol (fresco, laranja, rosa), álcool benzílico (doce, floral), 2,4-decadien-1-ol e trans-2-Decenol (odor frutado), álcool feniletílico (odor de rosas), 1-decanol (odor floral e laranja), mirtenol (fresco e hortelã) entre outros. O álcool feniletílico foi detectado em todos os ensaios. Este composto é proveniente da degradação da fenilalanina pela via de Ehrlich, é um dos álcoois mais abundantes produzidos por leveduras (GRONDIN et al., 2017; WU, XU & CHEN, 2012; ABBAS, 2006). Já o etanol, descrito como tendo odor doce, vinho e álcool, foi identificado somente nos ensaios de co-cultura. Salmerón, Thomas & Pandiella, 2014, sugeriram que ensaios de co-cultura contendo cepas de levedura e lactobacilos têm maior capacidade de produzir etanol do que ensaios contendo somente lactobacilos.

Tabela 2- Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Classe Química	Compostos voláteis	Percepção sensorial	Substrato	Ensaio			
				<i>L. plantarum</i> + <i>Pichia kluyveri</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>Pichia guilliermondii</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>L. plantarum</i>
Álcoois	1-hexanol	Ingrediente aromatizante: odor frutado e sabor aromático ^a	P	P	P	P	P
	1-octen-3-ol	Pepino, terra, gordura, floral, cogumelo ^e	P	P	-	-	-
	1-heptanol	Perfumado, amadeirado, pesado, oleoso, fraco, aromático, odor gorduroso e um sabor picante e picante ^a	P	P	P	P	P
	1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl	Coentro, floral, lavanda, limão, rosa ^e	P	P	P	P	P
	Ciclohexanol, 2,4-dimethyl	-	P	-	-	-	-

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Álcoois	1-octanol	Odor fresco de laranja-rosa, que é bastante doce ^a	P	P	P	P	P
	1-nonanol	Fresco, laranja, rosa ^a	P	P	P	P	P
	Cis-verbenol	-	P	P	P	-	P
	Benzyl alcohol	Doce, floral ^f	P	P	P	P	P
	2,4-decadien-1-ol	Frutado ^e	-	P	P	P	P
	Trans-2-Decenol	Frutado ^e	-	-	-	-	P
	1-hexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)	-	-	-	-	-	P
	3-nonen-1-ol, (Z)	-	-	P	P	P	P
	3-decen-1-ol, (Z)	-	-	-	-	-	P
	Phenylethyl alcohol	Odor de rosa ^{c,d}	P	P	P	P	P
	Ethanol	Álcool, vinho, doce ^j	-	P	P	P	-
	Isoamyl alcohol	Queimado, cacau, floral, malte ^e	P	-	-	P	-
	Amyl alcohol	Balsâmico, fruta, verde, picante ^e	-	P	-	P	-

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Álcoois	3-ethyl-4-nonanol	-	-	-	-	P	-
	1-decanol	Odor floral e laranja ^b	-	-	P	-	-
	1-Butanol, 3-methyl	Óleo combustível, característica de uísque, odor pungente ^a	P	-	-	P	-
	Myrtenol	Menta, fresco ^e	P	-	-	-	-
	(Z)-4-decen-1-ol	-	-	-	P	-	-
	3-methyl-hepta-1,6-dien-3-ol	-	-	-	P	-	-
	2,4-undecadien-1-ol	-	-	P	-	-	-
	(S)-(-)-(4-isopropenyl-1-cyclohexenyl)methanol	-	-	-	-	P	-
	Tricyclo[4.4.0.0(2,8)]decan-9-ol	-	-	-	-	P	-
	3-tetradecyn-1-ol	-	-	P	-	-	-

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Ésteres	Acetic acid, 1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester	-	P	P	P	-	P
	Acetic acid, [4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyclohex-1-enyl]methyl ester	-	-	P	P	-	P
	Ethyl octanoate	Damasco, gordura, floral, abacaxi ^e	-	-	-	P	-
	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)-	-	-	-	-	P	-
	Ethyl decanoate	Conhaque, uva, pêra ^e	-	-	-	P	-
	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, acetate	-	-	-	P	P	-
	Dl-Alanine ethyl ester	-	-	P	-	-	-
	Isoamyl acetate	Maçã, banana, pêra ^e	-	P	-	-	-
	Hexyl ester	Maçã, banana, grama, erva, pêra ^e	-	P	-	-	-
	Octyl acetato	-	-	P	-	-	-
Nonyl acetato	Frutado ^e	-	P	-	-	-	
Linalyl anthranilate	Floral ^e	-	P	-	-	-	

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Alcanos	Tetradecane	-	P	P	P	P	P
	Dodecane, 2,6,11-trimethyl	-	-	P	-	-	-
	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]	-	-	P	-	-	-
	Undecane, 3,5-dimethyl	-	-	-	-	-	P
	Decane, 5,6-dipropyl	-	-	-	-	-	P
	Tetradecane, 5-methyl	-	-	-	-	-	P
	Nonane, 5-methyl-5-propyl	-	-	-	-	-	P
	Hexadecane	-	P	P	P	-	P
	3-Acetoxy-pentadecane	-	-	-	-	-	P
	Nonane, 5-butyl	-	-	-	-	P	-
	Cyclopropane, butyl	-	-	P	-	-	-
Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)	-	-	P	-	-	-	

	Heptadecane, 8-methyl	-	-	P	-	-	-
Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).							
Aldeídos	2-heptenal, (Z)	Leitoso, verde, gorduroso e oleoso ^h	P	P	P	P	P
	Nonanal	Forte, parecido com sabão, metálico ^a	P	-	-	-	-
	2-octenal, (E)	-	P	P	P	-	P
	Benzaldehyde	Pungente ⁱ	P	P	P	P	P
	2-nonenal, (E)	-	P	-	P	P	P
	2-decenal, (Z)	-	-	-	-	-	P
	2,4-decadienal, (E,E)	-	P	P	P	P	P
	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)	-	P	P	P	P	P
	Acetaldehyde, (3,3-dimethylcyclohexylidene)-, (E)	-	-	-	P	-	P
	2-undecenal	-	P	-	-	-	P
Ácidos	Hexanoic acid	Odor rançoso-gorduroso ^a	-	P	P	P	P
	Octanoic acid	-	-	P	P	P	P
	n-Hexadecanoic acid	Sabor praticamente inodoro e suave ^a	P	P	-	P	P

	Acetic acid	Pungente, ácido, queijo, vinagre ^g	-	P	P	P	P	
Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).								
Ácidos	Heptanoic acid		-	-	P	P	-	P
	n-Decanoic acid		-	-	-	P	P	P
	Pentadecanoic acid		-	-	-	-	-	P
	Tetradecanoic acid	Muito fraco, ceroso-oleoso; quase inodoro ^a		P	-	-	P	P
	Dodecanoic acid	Odor gorduroso, desagradável e rançoso ^a		-	P	-	P	-
	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)		-	P	-	-	P	-
	Nonanoic acid	Gorduroso ^f		-	-	P	P	-
Alcenos	Alpha-pinene	Madeira de cedro, pinho ^e		P	P	P	P	-
	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.,7b.alpha.)]		-	P	P	P	P	P
	3-Nonen-5-yne, 4-ethyl-		-	-	-	-	-	P
	1-Undecene, 8-methyl		-	P	-	P	P	P

	Kaur-16-ene	-	P	P	P	P	P
--	-------------	---	---	---	---	---	---

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Alcenos	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	-	-	P	P	-	P
	1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimethyl-	-	-	-	-	-	P
	1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	-	-	-	-	-	P
	5-Tetradecen-3-yne, (E)-	-	-	-	-	P	-
Cetonas	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)	-	P	-	-	-	P
	Acetoin	Manteiga, cremosa, pimenta verde ^e	-	-	P	-	P
	2-Undecanone	Fresco, verde, laranja, rosa ^e	-	P	-	-	P
	2-Heptanone, 1-ethoxy-	-	-	-	-	-	P
	2-Tridecanone	Salgado ^e	-	-	-	-	P
	2-nonanone	Perfumado, fruta, verde, leite quente ^e	-	P	-	-	-
	4-nonanone	-	-	P	-	-	-
	2-Hexanone, 3-methyl-4-methylene	-	-	P	-	-	-

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (continua).

Éter	Dimethyl ether	-	-	-	-	-	P
	9-decen-1-ol, methyl ether	-	-	P	-	-	P
	Estragole	Alçaçuz ^e	P	P	P	P	P
Amida	l-Alanine ethylamide, (S)	-	-	P	P	P	P
	Propanamide, N-methyl-2-amino		-	-	-	P	-
Fenol	P-ethylphenol	Couro, fenol, especiarias ^e	-	P	P	P	P
Outros	Benzene, 1-ethyl-3-methyl	-	P	-	-	-	P
	Benzene, 1-ethyl-2-methyl	-	P	-	P	-	P
	alfa-Copaene	-	P	P	P	P	P
	beta-Bisabolene	Floral ^e	P	-	P	P	P
	Carvone	Manjeriço, amargo, cominho, erva- doce, hortelã ^{e, f}	P	P	P	P	P

alpha-Muurolene	-	-	P	-	-	-
-----------------	---	---	---	---	---	---

Tabela 2. Compostos voláteis identificados por análise de GC-MS no início (substrato) e final da fermentação (conclusão).

Outros	Pinocarvone	-	P	-	P	P	P
	2-pentylfuran	Manteiga, floral, fruta, feijão verde ^e	P	-	P	P	P
	Benzene, 1,2,3-trimethyl	-	P	-	P	-	P
	Benzene, 1,2,4-trimethyl	-	-	-	-	P	-
	D-Limonene	Cítrico, Menta ^e	P	-	-	P	-
	2,5-dimethylpyrazine	Cacau, rosbife, noz assada ^e	-	-	P	P	-
	Benzene, 1-ethyl-4-methyl	-	-	-	-	P	-
	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl	Frutado ^e	-	P	-	-	-
	(E)-.beta.-Famesene	-	-	P	-	-	-

P: composto detectado; -: percepção sensorial não encontrada / composto não detectado. As percepções sensoriais foram citadas em: a – Menezes et al., 2018; b - Ogunremi, Agrawal, Sanni, 2020; c - Cordente et al., 2019; d - Di Cagno et al., 2020; e - <https://www.femaflavor.org/>; f - www.flavornet.org; g - Liszkowska & Berlowska, 2021; h- Johnson, Heymann & Ebeler, 2015; i - Petel, Prost & Onno, 2017; j - Salmerón, Thomas & Pandiella, 2014.

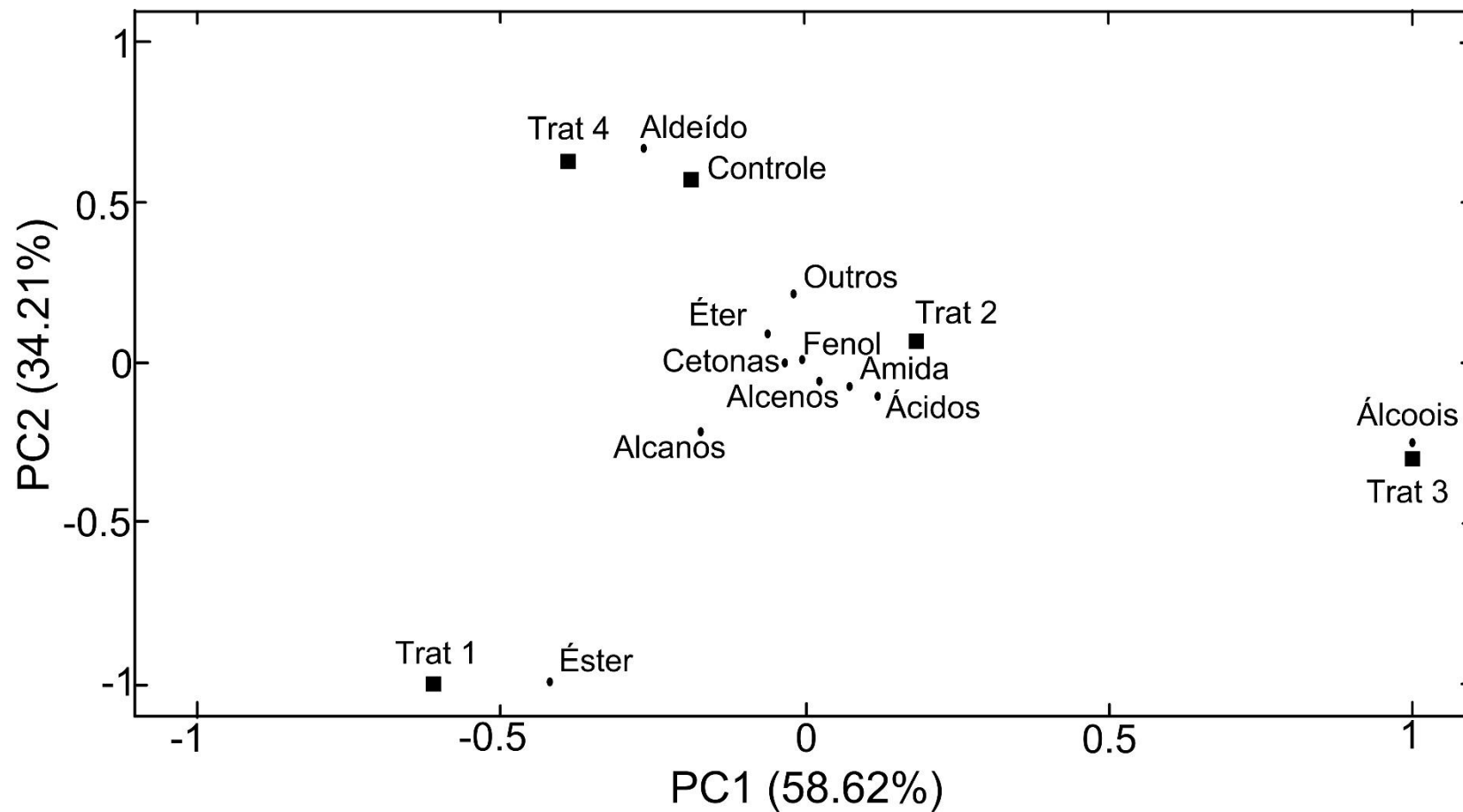
Em relação aos ésteres, a maior quantidade de compostos foi detectada no ensaio *L. plantarum* + *P. kluyveri*. A presença dos ésteres é importante nas bebidas por apresentarem odores frutados que conferem traços sensoriais característicos (SUOMALAINEN, 1971). Ésteres com odores de uva, pêra, abacaxi, maçã e banana foram identificados ao final da fermentação. Atributos como “odor frutado” e “sabor frutado” foram mencionados na sensorial, porém sua utilização não foi possível por não apresentarem pelo menos 20% de menção pelo painel de provadores.

Os ácidos orgânicos possuem propriedades conservantes e além de serem produzidos pela atividade microbiana podem ser encontrados naturalmente em produtos alimentícios (MEI, MA & XIE, 2019). Os ácidos hexanóico, octanóico, n-hexadecanóico, acético, heptanóico, n-decanóico, pentadecanóico, tetradecanóico, dodecanóico, 9,12-octadecadienóico e nonanóico foram identificados após 24 horas de fermentação. Ogunremi, Agrawal & Sanni (2020), trabalhando com leveduras isoladas de alimentos fermentados a base de cereal, detectaram produções significativas do ácido n-hexadecanóico pelos microrganismos testados. É muito comum a produção deste composto pelas leveduras (TEHLIVETS, SCHEURINGER & KOHLWEIN, 2007). No presente estudo somente o ensaio contendo *P. guilliermondi* não apresentou este composto. O ácido acético foi o único ácido graxo de cadeia curta (AGCC) identificado. Os ácidos graxos de cadeia curta são produzidos por microrganismos como produtos finais da fermentação (RICHARDS et al., 2016). Eles podem ser benéficos para alguns distúrbios, como diarreia, inflamação intestinal crônica, doenças cardíacas e diabetes tipo 2. Além disso, também podem desempenhar papel importante na redução do risco de certos tipos de câncer, especialmente câncer de cólon (BISHEHSARI et al., 2018). Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) identificados foram 9,12-octadecadienóico e tetradecanóico, também conhecidos como linoleico e mirístico. Os ácidos graxos de cadeia longa, afetam os fatores envolvidos no metabolismo do colesterol e estão associados ao aumento das células adiposas, triglicerídeos e resistência à insulina (MA et al., 2015). Os demais ácidos graxos são de cadeia média (AGCM). Assim como os ácidos graxos de cadeia curta, os AGCM também apresentam importantes benefícios à saúde. Sua ingestão tem efeito contra a obesidade e distúrbios metabólicos (NAGAO & YANAGITA, 2010). Estudos mostraram que os AGCM aumentam a saciedade e também a capacidade do corpo de queimar gordura, ajudando assim, na perda de peso (RIAL et al., 2016).

A produção de cetonas e aldeídos é resultado da fermentação microbiana e da oxidação lipídica (CHATTERJEE et al., 2018; PETEL, PROST & ONNO, 2017). Entre as cetonas identificadas a acetoina, 2-undecanona, 2-tridecanona e 2-nonanona são conhecidas por apresentarem percepções sensoriais como manteiga, cremoso, pimenta verde, fresco, laranja, rosa, frutas e saboroso. Em relação aos aldeídos, alguns contribuem para o odor e o sabor com fragrâncias frutadas, florais e frescas, enquanto outros são desfavoráveis, expressando um aroma pungente (PETEL, PROST & ONNO, 2017). O volátil benzaldeído, caracterizado por um problema olfativo típico descrito como pungente, foi detectado em todos os ensaios (PETEL, PROST & ONNO, 2017). Outro composto presente em todos os ensaios foi o 2-heptenal (Z). A presença deste composto não surpreende, pois comum em bebidas fermentadas à base de plantas. Seu odor é descrito como leitoso, verde, gorduroso e oleoso (JOHNSON, HEYMANN & EBELER, 2015). Este composto também é reconhecido por apresentar atividade anti-inflamatória e antioxidante (COSTA, SILVA & TORRES, 2019; KARABAGIAS et al., 2020).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para correlacionar os grupos funcionais com os diferentes ensaios no final da fermentação (Figura 4). A pca explicou 92,83% da variabilidade total em duas dimensões (58,62% para a primeira dimensão e 34,21 para a segunda dimensão). O ensaio contendo BAL + *P. guilliermondii* apresentou correlação com a maioria das classes químicas, sendo elas ácidos, amidas, alquenos, cetonas, fenóis, éter e outros. O controle e o ensaio de cultura simples demonstraram maior correlação com os aldeídos. Enquanto os ensaios contendo BAL + *P. kluyveri* e BAL + *D. hansenii* foram correlacionados com ésteres e álcoois, respectivamente.

Figura 4 - Gráfico de carregamento de análise de componentes principais dos grupos funcionais obtidos durante a fermentação.



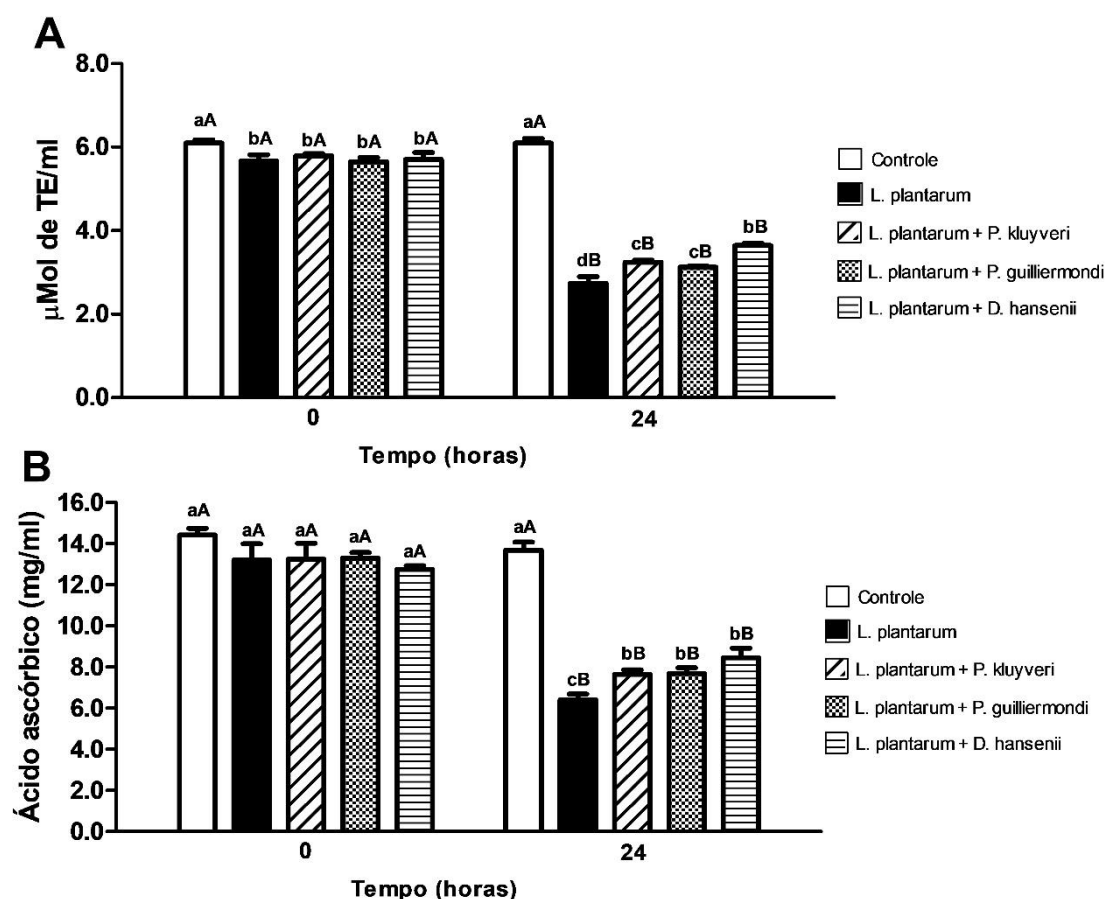
3.5 Atividade antioxidante pelo método complexo fosfomolibdênio (CPM) e eliminação do radical ABTS

De acordo com Halliwell & Gutteridge, (1995), os antioxidantes são definidos como “qualquer substância que, quando presente em concentrações relativamente mais baixas, em comparação com as do substrato oxidável, consegue retardar ou até mesmo inibir significativamente a oxidação desse substrato”. Freire, Ramos e Schwan, 2017, recomendam utilizar dois ou mais métodos combinados para se obter informações mais amplas sobre a capacidade antioxidante total de um produto, uma vez que não foi estabelecido um método padronizado. O resultado da atividade antioxidante pelos métodos CPM e ABTS é mostrado na figura 5.

Conforme observado, a atividade antioxidante reduziu ($p < 0,05$) após o processo fermentativo. Esta redução pode ser devido as reações de oxidação que ocorrem durante a fermentação. Os compostos presentes nos substratos podem reagir entre si e oxidar, diminuindo assim, a atividade antioxidante (RIOS-CORRIPIO & GUERRERO-BELTRÁN, 2019). O processo fermentativo levou de maneira geral a redução da atividade antioxidante da bebida. No entanto, na presença das leveduras esta redução foi atenuada. O ensaio contendo *D. hansenii* no método ABTS (Figura 5A), ao final da fermentação, expressou maior atividade (3,64 μMol de TE/mL) entre os tratamentos inoculados. Já para o método CPM (Figura 5B), os ensaios que apresentaram maior atividade foram os que continham leveduras como inóculo, expressando valores de 7,64 mg/mL a 8,44 mg/mL de ácido ascórbico. A maior redução (cerca de 51%) foi para o ensaio de cultura simples (*L. plantarum*) tanto para ABTS quanto para CPM. Bactérias lácticas são capazes de inibir a atividade de certos compostos fenólicos, modificando ou degradando essas moléculas, além disso, também são capazes de dissociar o complexo polifenol-substrato (PIEKARSKA-RADZIK & KLEWICK, 2021), o que pode explicar uma menor atividade antioxidante no ensaio contendo somente *L. plantarum*. Não foi observado alterações para o controle. A maior atividade nos ensaios em co-cultura pode ser devido a atividade antioxidante dos próprios microrganismos presentes na bebida, e não somente dos substratos utilizados. A utilização de co-cultura pode acarretar em um efeito sinérgico. Há relatos de que leveduras exercem maior atividade antioxidante quando comparadas com bactérias lácticas (GIL-RODRÍGUEZ et al., 2015). A atividade

antioxidante de leveduras está relacionada aos polissacarídeos da parede celular e também às enzimas e peptídeos intracelulares (GOSTIMSKAYA & GRANT, 2016; LIU et al., 2018; MICHIELS et al., 1994; TANG et al., 2017). A parede celular de leveduras é composta por β -glucano (29% - 64%), manana (31%), proteína (13%), lipídio (9%) e quitina (1-2%) (BACON et al., 1969; FLEET & MANNERS, 1979). Sabe-se que o β -glucano pode apresentar muitas atividades biológicas benéficas e uma delas é a atividade antioxidante (TANG et al., 2017). β -Glucano e manana são capazes de melhorar a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, além de apresentarem efeitos de eliminação nos radicais hidroxila e ânions superóxidos (TANG et al., 2017; LIU et al., 2021).

Figura 5- Atividade antioxidante por redução do radical ABTS e método do complexo de fosfomolibdênio.



A - atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS. B - atividade antioxidante pelo método do complexo de fosfomolibdênio. Diferentes letras minúsculas denotam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos durante o mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) do mesmo tratamento em tempos diferentes de acordo com o teste de Scott Knott.

3.6 Análise sensorial

O perfil sensorial dos alimentos e bebidas fermentados é uma característica complexa, combinando sabor, aroma, aparência e textura. Juntos, esses componentes criam as características únicas de um determinado produto e determinam sua qualidade.

A análise sensorial foi realizada para amostras fermentadas e não fermentadas, e os resultados são apresentados na Tabela 3. Os 16 avaliadores, 13 mulheres e 3 homens, com idades entre 24 e 53 anos, foram recrutados entre técnicos e alunos de pós-graduação da Universidade Federal de Lavras. Todos tinham ampla experiência em avaliação sensorial e haviam participado de estudos anteriores de diferentes matrizes alimentares. No total, 13 atributos sensoriais únicos foram gerados pelos avaliadores ao descreverem as bebidas. Dos 13 atributos, apenas 7 foram mencionados por pelo menos 20% do painel de degustação. Atributos mencionados menos que 3 vezes não foram utilizados. Os atributos mais citados foram “sabor ácido” (11) e “coloração acinzentada” (8), mencionados por pelo menos 50% dos avaliadores, seguido pelo atributo “odor amendoado” (6), citado por 37% dos provadores.

Tabela 3- Atributos usados pelos avaliadores em abordagens de Perfil Flash.

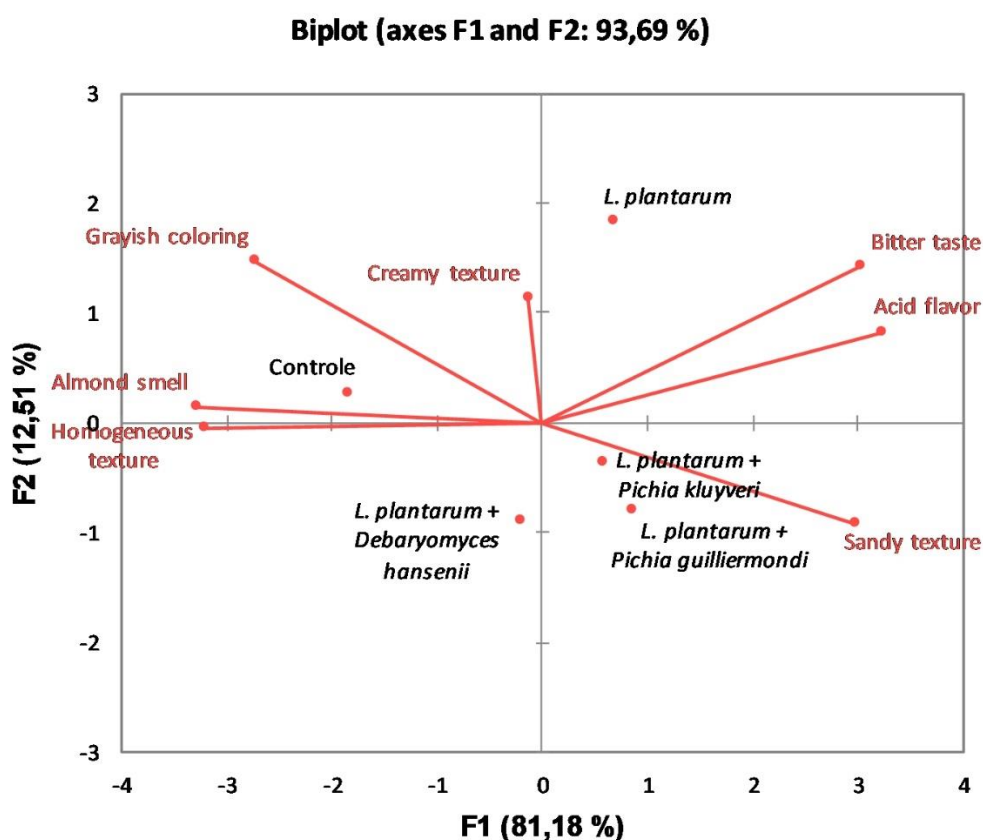
	Atributo	Frequência de menção
Aparência	Coloração acinzentada	8
	Homogêneo	3
Aroma	Amêndoas	6
	Frutado	2
	Adocicado	1
	Cítrico	1
Sabor	Ácido	11
	Amargo	3

	Cítrico	1
	Frutado	1
Textura	Cremoso	7
	Arenoso	3
Gosto Residual	Fermentado	1

O GPA resultante da configuração consensual das amostras das bebidas e os atributos explicaram 93,69% da variabilidade total em duas dimensões (81,18% para a primeira dimensão e 12,51% para a segunda dimensão). De acordo com os dados (Figura 6), somente os tratamentos BAL + *P. kluyveri* e BAL + *P. guilliermondi* apresentaram correlação entre si. Os demais tratamentos mostraram-se mais discrepantes e significativamente diferentes, pois estão localizados em quadrantes diferentes. O controle, projetado à esquerda no quadrante superior, foi descrito principalmente com os termos “textura cremosa”, “coloração acinzentada”, “textura homogênea” e “cheiro de amêndoas”. O termo “coloração acinzentada” pode estar relacionado aos tons mais escuros presentes nas sementes de girassol, uma vez que foi o substrato adicionado em maior quantidade (50%) em relação aos outros. Somente o controle foi descrito como tendo “textura cremosa”, mostrando que os demais tratamentos apresentavam textura mais líquida, mas isso não seria um obstáculo para a indústria alimentícia, a adição de um espessante poderia resolver o problema. Kizzie-Hayford et al., 2016, trabalhando com leite fermentado de noz de tigre também tiveram suas bebidas descritas como “cremoso”, “amêndoas”, “nozes” e “homogêneo”. O ensaio contendo BAL + *D. hansenii* apresentou correlação somente com o atributo “textura homogênea”. Já os ensaios contendo BAL + *P. kluyveri* e BAL + *P. guilliermondi* foram descritos com o termo “textura arenosa”. É possível que esses microrganismos tenham modificado a textura da bebida. O tratamento de cultura única (*L. plantarum*), localizado no quadrante superior à direita, apresentou maior correlação com os atributos “gosto amargo” e “sabor ácido”. Essa caracterização pode estar relacionada com a produção dos ácidos orgânicos durante a fermentação, visto que neste tratamento houve produção de ácido succínico, acético e lático, sendo esse último em concentrações de 5,75 g/L. Segundo Lesschaeve & Noble, 2005, para algumas

peças o amargor pode ser considerado um atributo negativo e bebidas amargas não são bem aceitas pelos consumidores. A adição de aditivos como adoçantes ou ingredientes que mascaram o sabor amargo são algumas possíveis soluções para aumentar a aceitabilidade dessas bebidas (FRANCISCO & RESURRECCION, 2012).

Figura 6- Biplot das cinco bebidas e os termos utilizados para descrever as amostras nas duas primeiras dimensões da análise geral Procrustes (GPA) de dados de perfil flash.



4. Conclusão

A bebida proposta a base de semente de girassol, aveia e amêndoa demonstrou ser uma matriz não láctea interessante para a fermentação por co-cultura de organismos probióticos. Os microrganismos se adaptaram bem a matriz, apresentando estabilidade e crescimento populacional durante a fermentação, redução expressiva do pH e mantiveram viáveis acima de 10^6 log UFC / mL durante o armazenamento refrigerado por 28 dias à 4

°C. A fermentação com co-cultura apresentou melhores resultados de atividade antioxidante e análise sensorial quando comparada ao cultivo simples, mostrando influência positiva no perfil funcional e sensorial da bebida. A alteração do microrganismo proporcionou produtos diferentes, com características diferentes, mesmo usando o mesmo substrato. Levando em consideração todos os resultados obtidos os microrganismos avaliados no presente estudo mostraram-se propícios para fermentação de matrizes não lácteas, que somado as suas características probióticas, apresentam grande potencial para aplicação na indústria de alimentos. Entre os tratamentos, a combinação de *L. plantarum* + *Debaryomyces hansenii* se mostrou como o tratamento mais promissor para produção de uma bebida fermentada probiótica de origem vegetal. Esta combinação apresentou-se bem adaptada a matriz com alterações significativas sobre compostos químicos de interesse, boa estabilidade durante armazenamento, maior atividade antioxidante e preservação de atributos sensoriais desejáveis.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (2006). **The yeast handbook: yeasts in food and beverages**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 285–334.
- ADESULU-DAHUNSI, A. T; DAHUNSI, S. O.; OLAYANJU, A. Synergistic microbial interactions between lactic acid bacteria and yeasts during production of Nigerian indigenous fermented foods and beverages. **Food Control**, v. 110, p. 106963, 2020.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, v. 19, p. 62-70, 2008.
- ANDRÉS, V.; TENORIO, M. D.; VILLANUEVA, M. J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1100-1106, 2015.
- BACON, J. S et al. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. **The Biochemical Journal**, v. 114, p. 557-567, 1969.
- BISHEHSARI, F. et al. Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota, promotes SCFA production, and suppresses colon carcinogenesis, **Genes**, v. 9, p. 102, 2018.
- BRASIL. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N ° 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos emitidos com alegação de propriedades funcionais e de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf/view (Acesso em: 13/02/2021).
- BRASIL, 2009. DECRETO N ° 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, uma classificação, o registro, a fiscalização, a produção e a fiscalização de bebidas. Legislação Bebidas. Presidência da República http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm (2009) (Acessado em 22/02/2021).
- BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, v. 23, p. 415-437, 2006.
- BRUNO, L. M. et al. Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 604-607, 2020.
- BURTON, G. W.; INGOLD, K. Vitamin E as an in Vitro and in Vivo Antioxidant. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 7-22, 1989.

- CAI, J. S. et al. An update on the nutritional, functional, sensory characteristics of soy products, and applications of new processing strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 676-689, 2021.
- CAPOZZI, V. et al. PTR-MS characterization of VOCs associated with commercial aromatic bakery yeasts of wine and beer origin. **Molecules**, v. 21, p. 483, 2016.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Girassol**: derivados protéicos. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 74).
- CHATTERJEE, S. et al. Antibacterial Activity of Long-Chain Primary Alcohols from *Solenia amplexicaulis* Leaves, **Proceedings of the Zoological Society**, v. 71, p. 313–319, 2018.
- CODA, R. et al. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 120-127, 2012.
- CORDENTE, A. G. et al. Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 4325–4336, 2019.
- CORSETTI, A.; SETTANI, L. *Lactobacilli* in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, p. 539-558, 2007.
- COSTA, A. M. M.; SILVA, L. O.; TORRES, A. G. Chemical composition of commercial cold-pressed pomegranate (*Punica granatum*) seed oil from Turkey and Israel, and the use of bioactive compounds for samples' origin preliminary discrimination, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 75, p. 8–16, 2019.
- DAIROU, V., & SIEFFERMANN, J. M. A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 826–834, 2002.
- DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381-386, 2012.
- DI CAGNO, R. et al. Design of potential probiotic yeast starters tailored for making a cornelian cherry (*Cornus mas* L.) functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 323, p. 108591, 2020.
- DUARTE, W. F et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p. 1564-1572, 2010.
- DURBAN, R. et al. Dietary Management of Food Allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 41, p. 233-270, 2021.

FAO/WHO. CODEX. (2002). Standard for Fermented Milks. 243-2003. STAN, C.: p.1-11.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, p. 109-112, 2014.

FLEET, G. H.; MANNERS, D. J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 94, p. 180-192, 1976.

FONSECA, H. C. et al. Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2020.

FRANCISCO, M. L. dL.; RESURRECCION, A. V. A. Antioxidant capacity and sensory profiles of peanut skin infusions. **LWT- Food Science and Technology**, v. 47, p. 189-198, 2012.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787-795, 2015.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**, v. 100, p. 698-707, 2017.

GARCIA, M. J.; ZUNIGA, M.; KOBAYASHI, H. Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2519–2524, 1992.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M. et al. Yeasts in foods and beverages: in vitro characterisation of probiotic traits. **LWT- Food Science and Technology**, v.64, p. 1156-1162, 2015.

GOSTIMSKAYA, I.; GRANT, C. M. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 94, p. 55-65, 2016.

GOBBI, L. et al. Biogenic amines determination in “plant milks”. **Beverages**, v. 5, p. 40, 2019.

GRANATO, D et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010.

GROM, L. C. et al. Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 165-171, 2020.

GRONDIN, E. et al. Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives. **Food Chemistry**, v. 237, p. 677–684, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 125–126, 1995.

HAAS, R. et al. Cow milk versus plant-based milk substitutes: A comparison of product image and motivational structure of consumption. **Sustainability**, v. 11, p. 5046, 2019.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HORAK, J. Regulation of sugar transporters: insight from yeast. **Current Genetics**, v. 59, p. 1-31, 2013.

IGNAT, M. V. et al. Current Functionality and Potential Improvements of Non-Alcoholic Fermented Cereal Beverages. **Foods**, v. 9, p. 1031, 2020.

JOHNSON, A. J.; HEYMANN, H.; EBELER, S. E. Volatile and sensory profiling of cocktail bitters, **Food Chemistry**, v. 179, p. 343–354, 2015.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology & Cell Biology**, V. 78, p. 80–88, 2000.

KANDLER, O.; WEISS, N. *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (1986). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1209-1234.

KARABAGIAS, V. K. et al. Prickly pear seed oil by shelf-grown cactus fruits: Waste or Maste?, **Processes**, v. 8, p. 132, 2020.

KIM, J. et al. The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, p. 5204-5210, 2013.

KIZZIE-HAYFORD, N. et al. Effects of protein enrichment on the microbiological, physicochemical and sensory properties of fermented tiger nut milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 319-324, 2016.

LAROIA, S.; MARTIN, J. H. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: A review. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, p. 18– 22, 1990.

LEROY, F.; PIDOUX, M. Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 48-53, 1993.

LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 330S-335S, 2005.

LISZKOWSKA, W.; BERLOWSKA, J. Yeast Fermentation at Low Temperatures: Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. **Molecules**, v. 26, p. 1035, 2021.

LIU, Y. et al. Extraction, characterization and antioxidant activities of mannan from yeast cell wall. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 952-956, 2018.

LU, Y. et al. A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 265, p. 1-8, 2018.

LIU, Y. et al. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 173, p. 445-456, 2021.

MA, W. et al. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: The Cardiovascular Health Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, p. 153-163, 2015.

MARSH, A. J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 113-124, 2014.

MAURO, C. S. I.; GARCIA, S. Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 854-864, 2019.

MAYO, B. et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (2010). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Wiley-Blackwell, p. 3-33.

MEI, J.; MA, X.; XIE, J. Review on natural preservatives for extending fish shelf life. **Foods**, v. 8, p. 490, 2019.

MENEZES, A. G. T. et al. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 81, p. 83-90, 2016.

MENEZES, A. G. T. et al. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187-197, 2018.

MENEZES, A. G. T. et al. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 280-288, 2019.

MESQUITA, M. C. et al. Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and coconut (*Coccus nucifera* L.) beverages by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **LWT**, v. 132, p. 109834, 2020.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, p. 235-248, 1994.

MOREIRA, I. M. D. V. et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9–17, 2013.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 208-212, 2010.

NIKI, E. et al. Inhibition of Oxidation of Biomembranes by Tocopherol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 23-31, 1989.

NISSEN, L.; CASCIANO, F.; GIANOTTI, A. Volatilome changes during probiotic fermentation of combined plant-based drinks. **Food & Function**, 2021.

NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Lactic acid food fermentation in tropical climates. In: KONINGS, W. N.; KUIPERS, O. P.; VELD, J. H. J. H. (1999). **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. Springer, Dordrecht.

NUNES, C. A.; PINHEIRO, A.C.M. Sensomarker free user-friendly interface for sensory analysis. Disponível em: www.ufla.br/sensomaker. Acesso em: 18/03/21, 2012.

OGUNREMI, O. R.; AGRAWAL, R.; SANANI, A. Production and characterization of volatile compounds and phytase from potentially probiotic yeasts isolated from traditional fermented cereal foods in Nigeria. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, p. 1-8, 2020.

PETEL, C.; PROST, C.; ONNO, B. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review, **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 105–123, 2017.

PIEKARSKA-RADZIK, L.; KLEWICK, E. Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 9-24, 2021.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

RAMOS, C. L. et al. International journal of food microbiology determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 225-231, 2010.

RAMOS, C. L. et al. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1380–1386, 2011.

RASANE, P. et al. Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 662–675, 2015.

RASIKA, D. M. D. et al. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 8-20, 2021.

RATHORE, S. et al. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiology**, v. 30, p. 239-244, 2012.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIAL, S. A. et al. Gut microbiota and metabolic health: The potential beneficial effects of a medium chain triglyceride diet in obese individuals. **Nutrients**, v. 8, p. 281, 2016.

RICHARDS, L. B. et al. The Effects of Short-Chain Fatty Acids on the Cardiovascular System. **PharmaNutrition**, v. 4, p. 68–111, 2016.

RIOS-CORRIPIO, G.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á. Antioxidant and physicochemical characteristics of unfermented and fermented pomegranate (*Punica granatum* L.) beverages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 132-139, 2019.

ROOSTITA, R.; FLEET, G. H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and blue-veined cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 293-404, 1996.

RONCERO, J. M. et al. Virgin almond oil: Extraction methods and composition. **Grasas y aceites**, v. 67, p. 143, 2016.

SALIM-UR-REHMAN.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R. Flavour in sourdough breads: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 557-566, 2006.

SALMERÓN, I.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S. S. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound

- profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 240-247, 2014.
- SANTOS, C. C. A. d. A. et al. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 32-41, 2014.
- SCHINK, B.; ZEIKUS, J. G. Microbial methanol formation: a major end product of pectin metabolism. **Current Microbiology**, v. 4, p. 387–389, 1980.
- SETHI, S; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 3408–3423, 2016.
- SIEIRO, C.; GARCIA-FRAGNA, B.; LOPEZ-SEIJAS, J. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: Valdez B (ed) (2012). **Food industrial processes- methods and equipment**. Intech, p 201–218.
- SILVA, A. R. A.; SILVA, M. M. N.; RIBEIRO, B. D. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. **Food Research International**, v. 131, p. 108972, 2020.
- SIMÕES, L. A. et al. Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.
- SUOMALAINEN, H. Yeast and Its Effect on the Flavour of Alcoholic Beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 77, p. 164–177, 1971.
- TANG, Q. et al. The antioxidant activities of six (1→3)-β-d-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 216-221, 2017.
- TEHLIVETS, O.; SCHEURINGER, K.; KOHLWEIN, S. D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 255–270, 2007.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- VALERO-CASES, E. et al. Non-Dairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. **Nutrients**, v. 12, p. 1666, 2020.
- VIJAYA, K. B. et al. Trends in dairy and non-dairy probiotic products—A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6112–6124, 2015.
- WIBOWO, D. et al. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 302-313, 1985.

WU, Q.; XU, Y.; CHEN, L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 301-307, 2012.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.