



**MARIÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**ESTUDOS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE  
FERMENTADO SIMBIÓTICO DE SOJA**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**MARÍÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**ESTUDOS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE FERMENTADO  
SIMBIÓTICO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientadora

Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal

**LAVRAS – MG**

**2017**

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

Teixeira, Mariá Andrade.

Estudos cinéticos da produção de fermentado simbiótico de  
soja / Mariá Andrade Teixeira. - 2017.

120 p. : il.

Orientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Coorientador(a): Olga Lucía Mondragón Bernal.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Bactérias lácticas. 2. Bifidobactéria. 3. Probióticos. I. Alves,  
José Guilherme Lembi Ferreira. II. Bernal, Olga Lucía Mondragón.  
III. Título.

**MARÍÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**ESTUDOS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE FERMENTADO  
SIMBIÓTICO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de março de 2017.

Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior      UFSJ

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli              UFLA

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
Orientador

Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2017**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente na minha vida, guiando meus passos e permitindo mais essa conquista.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa, à CAPES e ao CNPq.

Ao professor Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves e à professora Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal, pela orientação.

Ao Laboratório de Refrigeração de Alimentos, em especial à Amanda. Ao Laboratório de Química, Bioquímica e Análise de Alimentos, em especial à Tina. Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos. O auxílio de todos foi indispensável para a realização do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, em especial à Lorrany, pela ajuda durante todo o projeto e, principalmente, pela amizade construída.

Às amigas que foram feitas ao longo do mestrado, em especial à Maria Clara, Ana Paula, Isadora, Lorena e Sérgio.

Aos meus pais, Jairo e Salete, pelo apoio e amor incondicional, e à minha irmã, Patrícia, pelo incentivo.

Ao meu namorado, Caio, pela paciência e por sempre estar ao meu lado.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Os hábitos alimentares mais saudáveis estão em contínuo crescimento. Dentro dessa tendência, existem os alimentos funcionais, como por exemplo, os produtos contendo microrganismos probióticos e/ou fibras prebióticas. Além disso, há uma procura maior por alimentos de fonte vegetal e a soja se destaca como uma alternativa, pois é fonte de proteínas e possui princípios bioativos. O objetivo desse trabalho foi analisar a cinética de fermentação do extrato de soja por bactérias probióticas, adicionado do prebiótico frutooligossacarídeo (FOS), através da modificação das variáveis de processo: concentração de extrato de soja, concentração de FOS, proporção de *Lactobacillus* e agitação. Para isso foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as variáveis respostas foram fator de crescimento total e de bifidobactéria, consumo de açúcares redutores (AR) e totais (AT), produção de exopolissacarídeos (EPS) e sinérese. O tratamento referente ao ponto central com concentração de soja de 10g/100mL, FOS de 2 g/100mL, proporção de *Lactobacillus* de 30% e agitação de 50 rpm, apresentou os maiores fatores de crescimento total (145,86%) e de bifidobactéria (140,88%). Já o tratamento 8, com níveis próximos ao ponto central, apresentou a maior concentração inicial de AR (20,12 g/L) e AT (53,33 g/L), e por isso, obteve a maior concentração de ácido láctico (9,98%). Para a produção de EPS, o tratamento 11, também com níveis que não se distanciam do ponto central, apresentou o melhor resultado (4,08 g/L). Com relação à sinérese, os tratamentos 2, 3, 20, 21 e 23 não sofreram sinérese (0%), enquanto que o tratamento 6 teve a maior taxa de sinérese (44,63%). Os tratamentos diferiram entre si no comportamento reológico pelos modelos Lei de Newton, Lei da Potência e Herschel-Bulkley. O DCCR foi eficaz para analisar as melhores condições de fermentação, para a produção de um simbiótico a base de soja.

Palavras-chave: Bactérias lácticas. Bifidobactéria. Probióticos. Prebiótico. Extrato de soja. DCCR.

## GENERAL ABSTRACT

Healthier eating habits are in evidence. Within this trend there are functional foods, such as products containing probiotic microorganisms and/or prebiotic fibers, for example. In addition, there is a greater demand for food from vegetable sources and soy stands out as an alternative because it is a source of proteins and has bioactive principles. The objective of this work was to analyze the kinetics of soybean extract fermentation by probiotic bacteria, added by the prebiotic fructooligosaccharide (FOS), through the modification of the process variables: soybean extract concentration, FOS concentration, *Lactobacillus* ratio and agitation. For this purpose, the Central Composite Rotational Design (CCRD) was used and the responses were total growth factor and bifidobacteria growth factor, consumption of reducing sugar (RS) and total sugar (TS), exopolysaccharide (EPS) production and syneresis. The treatment of the center point with soybean concentration of 10g/100mL, FOS of 2g/100mL, proportion of *Lactobacillus* of 30% and agitation of 50 rpm showed the highest total growth factors (145.86%) and bifidobacteria growth factor (140.88%). On the other hand, treatment 8, with levels close to the central point, presented the highest initial concentration of RS (20.12 g/L) and TS (53.33 g/L), and therefore obtained the highest concentration of lactic acid (9.98%). For EPS, treatment 11, also with levels that are not distant from the central point, presented the best result (4.08 g/L). Regarding syneresis treatments 2, 3, 20, 21 and 23 did not suffer from syneresis (0%), while treatment 6 had the highest syneresis rate (44.63%). The treatments differed in the rheological behavior of the models Newton's Law, Law of the Power and Herschel-Bulkley. CCRD was effective in analyzing the best fermentation conditions for the production of a soy based symbiotic.

Keywords: Acid lactic bacterias. Bifidobacteria. Probiotics. Prebiotic. Soybean extract. Central composite rotational designs.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Via metabólica da fermentação por bifidobactérias. ....25
- Figura 2 Modelo esquemático estrutura de frutooligossacarídeo. ....28
- Figura 3 Principais vias metabólicas das bactérias do ácido lático. ....35
- Figura 4 Comportamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos. ....38

### SEGUNDA PARTE

- Figura 5 Curvas de contorno para o fator de crescimento total em relação às variáveis (a) %ES e %FOS; (b) %ES e proporção de lactobacilos; (c) %ES e agitação; (d) %FOS e proporção de lactobacilos; (e) %FOS e agitação e (f) proporção de lactobacilos e agitação. .... 71
- Figura 6 Curvas de contorno para o consumo de açúcares redutores em relação às variáveis (a) %ES e %FOS; (b) %ES e proporção de lactobacilos; (c) %ES e agitação; (d) %FOS e proporção de lactobacilos; (e) %FOS e agitação e (f) proporção de lactobacilos e agitação. ....85
- Figura 7 Efeito da taxa de deformação sobre a tensão de cisalhamento à temperatura de 25°C dos diferentes tratamentos, descrito pelo modelo: (a) Lei de Newton; (b) Lei da Potência; e (c) Herschel-Bulkley..... 101
- Figura 8 Efeito da taxa de deformação sobre a viscosidade aparente à temperatura de 25°C dos diferentes tratamentos. .... 103
- Figura 9 Curva de crescimento (a) *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e (b) *Lactobacillus rhamnosus* LR-32. .... 113
- Figura 10 Correlação entre absorbância e viabilidade celular de (a) *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e (b) *Lactobacillus rhamnosus* LR-32. .... 114
- Figura 11 Curva padrão de glicose para determinação de AR..... 118

Figura 12	Curva padrão de glicose para determinação de AT.....	119
Figura 13	Curva padrão de dextrana 9300Da para determinação de EPS. ....	120

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1	Níveis das variáveis para o planejamento DCCR. ....	57
Tabela 2	Modelo reológicos ajustados a cada amostra estudada. ....	62
Tabela 3	Cinética de crescimento da contagem total de bactérias para cada tratamento. ....	64
Tabela 4	Matriz DCCR com valores codificados e reais (entre parêntesis) e variáveis respostas fator de crescimento total e fator de crescimento de bifidobactéria. ....	67
Tabela 5	Coefficientes de regressão e p- valor associados para fator de crescimento total e bifidobactéria. ....	69
Tabela 6	Análise de variância para fatores de crescimento. ....	70
Tabela 7	Matriz DCCR com valores codificados e reais e acidez titulável em ácido láctico do produto final da fermentação. ....	75
Tabela 8	Cinética de consumo de açúcares redutores (AR). ....	79
Tabela 9	Cinética de consumo de açúcares totais (AT). ....	81
Tabela 10	Coefficientes de regressão e p-valor associados para consumo de açúcares redutores e totais. ....	83
Tabela 11	Análise de variância para consumo de açúcares redutores e totais ... .....	84
Tabela 12	Matriz DCCR com variáveis codificadas e reais e variáveis respostas concentrações iniciais e finais, produção de exopolissacarídeos e a sinérese para cada tratamento. ....	90
Tabela 13	Coefficientes de regressão e p-valor associados para produção de exopolissacarídeos (EPS). ....	93

Tabela 14	Análise de variância para produção de exopolissacarídeos (EPS). .....	94
Tabela 15	Coefficientes de regressão e p-valor associados para porcentagem de sinérese.....	95
Tabela 16	Análise de variância para porcentagem de sinérese. .....	95
Tabela 17	Variáveis codificadas e reais (entre parêntesis) para validação do modelo, valores experimentais e preditos e erro relativo. ....	97
Tabela 18	Parâmetro reológico obtido para os diferentes tratamentos por meio da Lei de Newton.....	99
Tabela 19	Parâmetros reológicos obtidos para os diferentes tratamentos por meio da Lei da Potência.....	99
Tabela 20	Parâmetros reológicos obtidos para os diferentes tratamentos por meio do modelo Herschel-Bulkley. ....	100
Tabela 21	Valores médios de pH durante os 25 tratamentos.....	115

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias do Ácido Lático
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EC	Enzyme Commission
EPS	Exopolissacarídeos
ES	Extrato de Soja
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FOS	Frutooligossacarídeo
GRAS	Generally Recognized as Safe
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
RPM	Rotações por Minuto
TGI	Trato Gastrointestinal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL..... 14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO..... 18</b>
<b>2.1</b>	<b>Alimentos funcionais..... 18</b>
<b>2.2</b>	<b>Probióticos ..... 18</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Bactérias do ácido láctico ..... 21</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Exopolissacarídeos ..... 22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Bifidobactérias ..... 24</b>
<b>2.3</b>	<b>Prebióticos e fatores bifidogênicos ..... 26</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Frutooligossacarídeos ..... 27</b>
<b>2.4</b>	<b>Soja..... 29</b>
<b>2.5</b>	<b>Produtos simbióticos..... 31</b>
<b>2.6</b>	<b>Fermentação ..... 33</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Fermentação láctica ..... 34</b>
<b>2.7</b>	<b>Propriedades reológicas dos alimentos ..... 36</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Fluidos Newtonianos ..... 38</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Fluidos não-Newtonianos ..... 39</b>
<b>2.8</b>	<b>Planejamento experimental..... 40</b>
<b>2.8.1</b>	<b>Delineamento Composto Central Rotacional ..... 41</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 42</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO ..... 49</b>
	<b>ARTIGO 1 - Estudos cinéticos da produção de fermentado de soja com agentes probióticos ..... 50</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisa realizada pela *DuPont Nutrition and Health*, em 2012, mostrava que os produtos que promoviam a saúde digestiva eram o maior mercado de alimentos funcionais na Europa, América do Sul e Japão (*FOOD PROCESSING*, 2012). Esse mercado chamado de ‘nutrição positiva’ é formado por produtos e alimentos que proporcionam e/ou mantêm a saúde, como por exemplo, probióticos, prebióticos, derivados de soja e fibras dietéticas. Em 2014, segundo a *Food Processing*, apesar da regulamentação continuar lenta, o mercado de probióticos em alimentos e bebidas continuava mostrando crescimento.

No Brasil, esse mercado de alimentos funcionais conta com produtos como o Yakult, produzido e comercializado desde 1930, e o iogurte Activia, produzido pela Danone há mais de 30 anos, mas que despontou no país somente em 2004. Em 2000, ocorreu o primeiro registro oficial de um alimento funcional na ANVISA, com a margarina Becel Pro.Active. No mercado nacional de iogurtes e/ou leites fermentados, 20% se referem a iogurtes funcionais. Essa abertura incentiva investimentos e lançamento de novos produtos, como ocorreu com o Batavo Bio Fibras e o Nestlé Nesvita.

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001). Para a legislação brasileira (ANVISA, 2008) a dose diária mínima de probióticos no produto deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC), no geral, deve haver entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC por grama de produto para que sejam obtidos os efeitos benéficos à saúde.

Os microrganismos probióticos mais conhecidos e mais amplamente utilizados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses microrganismos agem benéficamente, principalmente pela modificação da

microbiota intestinal, porém, para serem eficientes, as cepas devem se apresentar resistentes às condições físico-químicas adversas do sistema digestório humano. Além disso, as cepas probióticas, devem, principalmente, ser consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para consumo humano, não ser patogênicas e não apresentar genes de resistência a antibióticos.

As bactérias probióticas são fastidiosas exigindo vários nutrientes e fatores para o seu crescimento. Esses fatores de crescimento podem ser as fibras prebióticas ou prebióticos.

Os prebióticos são substâncias não digeríveis pelos seres humanos que proporcionam efeito fisiológico benéfico sobre o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento favorável ou a atividade de um número limitado de bactérias naturais (FAO/WHO, 2001). Esses polímeros ou oligossacarídeos têm atividade prebiótica se permitem o aumento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., quando fermentados no *cólon* humano, causando mudanças específicas na composição da microbiota intestinal.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose ligados a moléculas de glicose, e são os prebióticos mais conhecidos e empregados como ingrediente para alimentos funcionais, pois apresentam características tecnológicas e propriedades nutricionais interessantes, como alta solubilidade em água, fermentação completa no intestino humano, baixo teor calórico e sabor doce.

O desenvolvimento de um produto que combina um ou mais microrganismos probióticos e um prebiótico gera produtos chamados simbióticos. Essa associação positiva aumenta a contagem de probióticos e reduz os microrganismos patogênicos no intestino, e a incorporação de prebióticos causa efeitos positivos no processo fermentativo, melhora o perfil sensorial e as características físico-químicas e reológicas dos produtos fermentados. A melhora da qualidade sensorial e aceitação desses produtos estão relacionadas à

melhoria das características reológicas, como textura, firmeza e viscosidade do produto final, que é conseguida pela síntese de exopolissacarídeos (EPS) através das bactérias do ácido láctico (BAL), as quais utilizam os prebióticos (FOS, por exemplo) como energia adicional para a síntese desses compostos.

A *Food Processing* (2016) realiza pesquisas de mercado para alimentos e bebidas, e mostrou algumas tendências em formulações e produtos para 2017. Algumas dessas principais tendências são o desenvolvimento de alimentos e bebidas que refletem os hábitos alimentares mais saudáveis dos consumidores, como a procura por alimentos funcionais, produtos com redução de açúcar e de origem vegetal.

A soja é um vegetal que fornece proteínas de alta qualidade e aminoácidos essenciais. Essa leguminosa é rica em ácidos graxos insaturados e isoflavona. Apesar das qualidades nutricionais, o consumo de produtos alimentícios a base de soja é limitado, devido ao sabor desagradável e a presença de oligossacarídeos não digeríveis que causam desconforto abdominal. A fermentação é uma alternativa para melhorar as propriedades sensoriais e diminuir o sabor desagradável e tornar esses produtos um alimento funcional. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, o que permite o extrato de soja ser excelente substrato para a produção desses alimentos funcionais, devido ao baixo custo e grande valor nutricional.

A maioria dos alimentos funcionais existentes são produtos lácteos, ou seja, são de origem animal, e possui como probiótico apenas um microrganismo e não são adicionados de fibras prebióticas, que podem ser utilizadas como ingrediente substituto e reduzir a concentração de açúcar nas formulações em que são utilizadas, devido ao seu sabor doce.

Em 2004, foram desenvolvidos fermentados de soja contendo bactérias lácticas, bifidobactérias e prebióticos em simbiose por meio da fermentação em

frascos de pequeno volume e sem agitação. Estes resultados geraram o privilégio de inovação n.PI0404152-6 (MAUGERI et al., 2006). Porém, os autores ressaltam a importância de novos estudos cinéticos pela ampliação de escala e incluindo parâmetros de processo, como a agitação.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos parâmetros concentração de extrato de soja e de frutooligossacarídeos, proporção de *Lactobacillus* e agitação, na produção de uma bebida fermentada à base de soja. Tem-se como objetivos específicos a caracterização microbiológica, através da determinação do fator de crescimento total das bactérias probióticas, caracterização físico-química pela medição do pH e acidez titulável, consumo de açúcares (reduzidos e totais), produção de exopolissacarídeos, sinérese e caracterização reológica. Tudo isso visando obter um produto simbiótico que atenda às legislações vigentes e que apresente características sensoriais que atendam a demanda do mercado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais possuem propriedades que estão relacionadas ao papel metabólico ou fisiológico de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo humano, desde que seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e saudável (ANVISA, 2008).

Ingredientes que têm sua comprovação de propriedade funcional e têm permissão da ANVISA para utilização são ácidos graxos (ômega 3), carotenoides (licopeno, luteína e zeaxantina), fibras alimentares (beta glucana, dextrina, frutooligossacarídeo – FOS, goma guar, inulina, entre outras), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol e sorbitol), probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis*, dentre outros), e proteína de soja (ANVISA, 2008).

### 2.2 Probióticos

Probióticos são reconhecidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (MARTINEZ et al., 2015; FAO/WHO, 2001). Em geral, os produtos que contêm microrganismos probióticos devem conter um número mínimo de células viáveis entre  $10^6$  e  $10^8$  unidades formadoras de colônia por grama de produto final (UFC/g). A legislação brasileira recomenda uma dose mínima de probióticos entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/porção diária do produto, para obter os efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2008).

Os microrganismos probióticos mais conhecidos pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. As cepas mais eficientes devem ser robustas o suficiente para sobreviverem às severas condições físico-químicas do intestino, que incluem os ácidos gástricos, secreção da bile e competição com bactérias residentes da microbiota do intestino. Além disso, como requerimento de segurança, as cepas devem ser não patogênicas e apresentar ausência de transferência de genes de resistência antibiótica (PRESTI et al., 2015).

Além da dose diária, outros fatores também envolvem a eficácia dos efeitos esperados dos probióticos, incluindo a frequência de administração diária, o período de administração (antes, durante ou depois das refeições), a duração da administração, o veículo usado para carrear o probiótico (alimento fermentado, bebida, cápsula etc.) e a viabilidade da cepa probiótica (MARTINEZ et al., 2015).

Para que um microrganismo seja considerado cultura probiótica, deve satisfazer alguns critérios que são:

- a) A cepa probiótica deve ser de origem humana e isolada do seu trato gastrointestinal, para que seja segura ao consumo humano;
- b) As culturas probióticas devem ser reconhecidas como seguras (GRAS – *generally recognised as safe*) para o consumo humano;
- c) A produção em larga escala dos probióticos deve ser possível e os microrganismos devem estar viáveis e ativos nos veículos (alimentos) em que são incorporados;
- d) Os probióticos devem ser resistentes ao suco gástrico e intestinal e pH baixo do organismo do hospedeiro;
- e) Probióticos devem aderir às células intestinais e mucosa intestinal humana, permitindo sua manutenção e crescimento no intestino, favorecendo a exclusão competitiva de potenciais patógenos da mucosa do intestino;

- f) Os microrganismos probióticos devem produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos intestinais;
- g) Probióticos devem ser seguros quando ingeridos através do consumo de alimentos e durante uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos;
- h) Os probióticos devem ter sua segurança e eficácia estabelecida através de ensaios clínicos controlados por placebo;
- i) Esses microrganismos probióticos devem ser capazes de produzir substâncias tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos, diacetil ou peróxido de hidrogênio com atividade antagônica contra potenciais patógenos (PRESTI et al., 2015).

A maioria dos mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos dos probióticos envolve a modificação da microbiota do intestino, através da aderência competitiva à mucosa contra patógenos, o fortalecimento da barreira epitelial do trato gastrointestinal (TGI) e a regulação do sistema imunológico (PRESTI et al., 2015).

Além de uma fonte de carbono, bactérias probióticas podem ser particularmente exigentes em aminoácidos, vitaminas, minerais e outros fatores de estímulo ao crescimento. Esses fatores de crescimento podem ser carboidratos não digeríveis, conhecidos como prebióticos (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014).

Diversos aspectos tecnológicos no desenvolvimento de um produto alimentício contendo probiótico devem ser levados em consideração para a seleção da cepa probiótica a ser utilizada. Dentre eles, sua viabilidade durante o processamento e sua estabilidade durante toda a estocagem e vida de prateleira, contendo o número de células viáveis suficientes para conferir benefícios à saúde, e deve ser compatível com a forma do produto para manter as

propriedades sensoriais desejáveis (MATIAS et al., 2014; PANDEY, MISHRA, 2014).

### 2.2.1 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico, além de produzir compostos de interesse para a indústria de alimentos (ácido láctico, por exemplo), também são utilizadas como probióticos. Sua ocorrência em alimentos, em conjunto com o histórico de uso, contribuem para a sua aceitação como GRAS para o consumo humano (LI et al., 2014).

As bactérias do ácido láctico constituem um grupo de bactérias gram-positivas com inúmeras características morfológicas, metabólicas e fisiológicas. Em geral, as bactérias incluídas nesse grupo são descritas como gram-positivas e não esporuladas. As BAL estão relacionadas aos processos fermentativos de alimentos e também estão normalmente associadas com a mucosa superficial do trato gastrointestinal de humanos e animais. Elas também podem ser divididas de acordo com a sua morfologia, em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocus (todos os outros gêneros) (AXELSSON, 2004).

Taxonomicamente, em sua ampla definição fisiológica, o grupo das bactérias do ácido láctico incluem aproximadamente 20 gêneros, sendo considerados principalmente *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (AXELSSON, 2004).

Dentre os gêneros de *Lactobacillus*, as espécies autorizadas pela ANVISA para sua utilização como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

O gênero *Bifidobacterium*, é frequentemente considerado no mesmo contexto como bactéria do ácido láctico, e compartilha algumas características típicas do grupo, é filogeneticamente relacionado, mas tem um único modo de fermentação de açúcares (AXELSSON, 2004).

A classificação do grupo das bactérias do ácido láctico em diferentes gêneros é baseada na morfologia, modo de fermentação de glicose, temperatura de crescimento, configuração do ácido láctico produzido, habilidade de crescimento em altas concentrações de sal e tolerância ácida, e sobrevivem em pH 5,0 ou menos. A temperatura ótima de crescimento varia de acordo com o gênero e está na faixa entre 20 e 45°C. (AXELSSON, 2004; HOFVENDAHL, HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A definição geral descreve típica bactéria do ácido láctico e indica características tais como, gram-positiva, não formadora de esporo, catalase-negativa, desprovida de citocromos, anaeróbia aerotolerante, fastidiosa, ácido-tolerante e estritamente fermentativa, com o ácido láctico como o principal produto final da fermentação. As bactérias do ácido láctico geralmente estão associadas com ambientes ricos em nutrientes, tais como alimentos (leite, carne e vegetais), e também como parte natural da biota da boca e intestino de mamíferos (AXELSSON, 2004).

### **2.2.1.1 Exopolissacarídeos**

Os exopolissacarídeos (EPS) são biomoléculas produzidas por bactérias do ácido láctico de grande interesse para indústrias de alimentos, farmacêutica e médica. Os EPS são substâncias poliméricas de alto peso molecular, que apresentam composição e estrutura heterogênea e, por isso, possuem diversas características físico-químicas (SHENG et al., 2010; HAMET et al., 2015).

Os EPS são, então, produtos microbianos localizados do lado externo da superfície celular e são formados por uma mistura complexa de proteínas, carboidratos, lipídeos, DNA e substâncias ácidos húmicos (LIANG et al., 2010). As interações complexas entre as células e os EPS formam uma estrutura tipo rede, preenchida de água que protege as células contra a desidratação e substâncias tóxicas (SHENG et al., 2010).

Existem duas formas de EPS, os EPS ligados (polímeros capsulados, géis condensados etc) e os EPS solúveis (macromoléculas solúveis, colóides etc). Os EPS ligados estão intimamente ligados às células, enquanto que os EPS solúveis estão fracamente ligados às células ou dissolvidos na solução (SHENG et al., 2010).

Os exopolissacarídeos são os principais componentes dos biofilmes, que possuem propriedades importantes, como a alteração da densidade. Os EPS também influenciam a atividade microbiana, e a composição e quantidade destes é resultado de fatores ambientais e condições operacionais (LIANG et al., 2010).

Na indústria de alimentos o uso dos exopolissacarídeos contribui para a reologia, sensação na boca e textura de produtos fermentados. Além disso, os EPS tem função de promotores da saúde. Alguns desses efeitos benéficos são a capacidade de diminuição do colesterol, habilidade de imunomodulação, proteção do epitélio intestinal e capacidade de modulação da microbiota intestinal (HAMET et al., 2015).

Produtos fermentados com culturas produtoras de EPS são capazes de melhorar as propriedades de textura, contribuindo com a consistência e reologia desses produtos. Os EPS podem modificar as características de escoamento do fluido, estabilizar suspensões, flocular partículas, encapsular materiais, produzir emulsões e aumentar a viscosidade, tornando os iogurtes mais cremosos, por exemplo (HAMET et al., 2015; LI et al., 2014).

### 2.2.2 Bifidobactérias

O gênero *Bifidobacterium*, historicamente, é considerado como pertencente ao grupo das bactérias do ácido láctico. Embora espécies de *Bifidobacterium* apresentem características comuns às bactérias do ácido láctico, elas estão filogeneticamente mais relacionadas ao grupo *Actinomycetaceae* de bactérias gram-positivas. Além disso, as bifidobactérias tem uma via especial para a fermentação de açúcar, única para o gênero, que as separam claramente do grupo das bactérias do ácido láctico (AXELSSON, 2004).

As bifidobactérias foram isoladas e descritas por Tissier, em 1899-1900. O autor as descreveu como bastonetes, não produtoras de gás, microrganismos anaeróbios e com morfologia bífida, presentes nas fezes de crianças amamentadas, as quais foram chamadas de *Bacillus bifidus*. Hoje se sabe que são microrganismos que estão distribuídos no complexo ecossistema do trato gastrointestinal de humanos, principalmente no de recém-nascidos, nos quais são predominantes. Com o aumento da idade do indivíduo o número de bifidobactérias diminui, somente *B. longum* permanece ao longo da vida, isso pode ser influenciado pela dieta e a ingestão de fatores bifidogênicos e pela fisiologia do hospedeiro (GOMES; MALCATA, 1999).

De acordo com a Resolução nº18 da ANVISA, as espécies de bifidobactérias que podem ser utilizadas como probióticos são apenas *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*) e *Bifidobacterium longum* (ANVISA, 2008).

As bifidobactérias são agrupadas filogeneticamente aos actinomicetos gram-positivos, caracterizam-se por não ser formadoras de esporo, não móveis e ser anaeróbias catalase-negativas. Elas possuem diferentes morfologias, tais como bastonetes curtos, curvados e bastonetes bifurcados em forma de Y. As

bifidobactérias são microrganismos sacarolíticos que produzem ácido acético e ácido láctico, sem a produção de  $\text{CO}_2$  (GOMES; MALCATA, 1999).

Nesse gênero, a heterofermentação ocorre concomitante, e a fermentação de uma hexose resulta na formação tanto de lactato como de acetato (FIGURA 1). A enzima chave dessa fermentação, frutose-6-fosfato fosfoquetolase, pode ser usada para a caracterização e identificação do gênero. Em algumas condições, *Bifidobacterium* também são capazes de fermentar carboidratos complexos. Cepas de *Bifidobacterium longum* fermentam, por exemplo, arabinogalactanos e arabinose (GOMES; MALCATA, 1999).

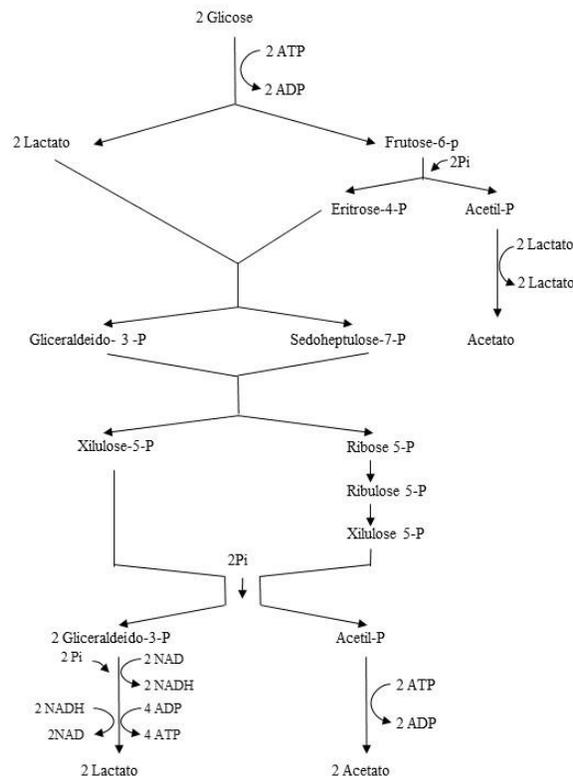


Figura 1 Via metabólica da fermentação por bifidobactérias.

Fonte: Gomes e Malcata (1999).

O gênero *Bifidobacterium* tem pH ótimo de crescimento entre 6,0 e 7,0, com praticamente nenhum crescimento em pH de 4,5 a 5,0. A temperatura ótima de crescimento é entre 37 e 41°C (GOMES; MALCATA, 1999).

### 2.3 Prebióticos e fatores bifidogênicos

Fatores bifidogênicos, segundo Gomes e Malcata (1999), são definidos como compostos, geralmente carboidratos, que sobrevivem ao metabolismo do hospedeiro e alcançam o intestino grosso, onde são preferencialmente metabolizados por bifidobactérias, como fonte de energia. Além disso, têm um efeito protetor e melhoram a sobrevivência e a atividade dessas bactérias no trato gastrointestinal humano. Essa definição pode ser incluída na definição atual de prebióticos (BEDANI et al., 2013; GOMES; MALCATA, 1999).

Os prebióticos são substâncias não digeríveis que proporcionam efeito fisiológico benéfico sobre o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento favorável ou a atividade de um número limitado de bactérias naturais (FAO/WHO, 2001). Os prebióticos são descritos também como polímeros ou oligossacarídeos que são fermentados seletivamente no *cólon* humano, que permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal, que conferem benefícios sobre o bem-estar e a saúde ao hospedeiro (MOON et al., 2015; MORRIS; MORRIS, 2012).

Atualmente, o critério aceito como atividade prebiótica é o aumento das populações de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., com diminuição de grupos de bactérias não desejáveis, tais como espécies de *Clostridium* e *Bacteroides* (MOON et al., 2015).

Os prebióticos devem obedecer a alguns critérios (GIBSON, 2004):

- a) Resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção gastrointestinal;

- b) Ser fermentada pela microbiota intestinal;
- c) Estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais associadas com a saúde e o bem-estar.

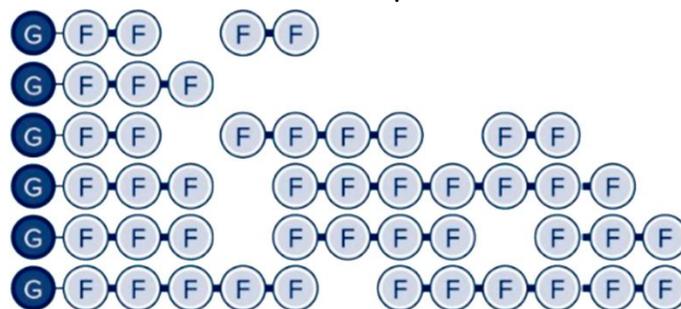
Os efeitos benéficos à saúde humana, associados à ingestão de prebióticos incluem a melhora da resistência gastrointestinal à infecções e câncer de *cólon*, o aumento da absorção óssea de cálcio e minerais, e a melhora da resposta imune (SALINAS; PUPPO, 2014; MORRIS; MORRIS, 2012).

Além dos efeitos diretos (efeitos benéficos à saúde) dos prebióticos na alimentação e os efeitos indiretos (substituição de açúcares e gorduras), a incorporação de prebióticos em alimentos fermentados melhora as propriedades sensoriais e as características físico-químicas e reológicas do produto (MORRIS; MORRIS, 2012; MISHRA, MISHRA, 2012).

As fontes de energia utilizadas para o crescimento microbiano das bifidobactérias são fornecidas através da dieta alimentar do hospedeiro ou por meios endógenos. Sabendo disso, oligossacarídeos não digeríveis, como inulina e frutooligossacarídeos (FOS), são usados como prebióticos em dietas, especificamente, para aumentar o número relativo de bifidobactérias no trato digestório humano (GOMES; MALCATA, 1999).

### **2.3.1 Frutooligossacarídeos**

O frutooligossacarídeo (FOS) é um oligômero de frutose ligado a moléculas de glicose e/ou frutose, que contém até dez porções de açúcar (FIGURA 2). Com propriedades prebióticas, o FOS é altamente solúvel em água e possui carboidratos de baixo teor calórico (MISHRA; MISHRA, 2012).



GP = 2 - 10

G: glicose; F: frutose; GP: grau de polimerização.

Figura 2 Modelo esquemático estrutura de frutooligossacarídeo.

Fonte: Disponível em: <[www.inspiredbyinulin.com](http://www.inspiredbyinulin.com)> Acesso em: 10 jan. 2017.

Os FOS são definidos como frutanos não digeríveis, esses oligossacarídeos ocorrem na natureza e são principalmente de origem vegetal. Industrialmente, são obtidos a partir de xaropes de sacarose por um processo enzimático, desempenhado pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). Esses frutanos são ligados por ligações  $\beta(1-2)$  (PANDEY; MISHRA, 2014; GOMES. MALCATA, 1999).

O frutooligossacarídeo é considerado um prebiótico modelo. O FOS é completamente fermentado no intestino grosso, é altamente solúvel e tem sabor doce (aproximadamente 30% de doçura do açúcar de mesa) e, por isso, é empregado como substituto do açúcar, fornecendo um valor reduzido de calorias (MORRIS; MORRIS, 2012).

A fermentação do FOS pelos microrganismos naturais da microbiota intestinal gera produtos tais como ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), que ajudam a promover a saúde humana (MASSOT-CLADERA et al., 2015; BERGER et al., 2014; MORRIS, MORRIS, 2012).

Entre os prebióticos conhecidos, o FOS é frequentemente utilizado como ingrediente de alimentos funcionais, pois apresenta propriedades fisiológicas interessantes e importantes benefícios tecnológicos. Os níveis de dosagem de

FOS variam nas diversas formulações de alimentos. Segundo a regulamentação da ANVISA, se o alimento for sólido, a porção do produto pronto para consumo deve fornecer no mínimo 3 g de FOS e, se o alimento for líquido, essa quantidade deve ser de 1,5 g. E ainda segundo a Resolução nº18, o uso do ingrediente não deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. (PANDEY; MISHRA, 2014; ANVISA, 2008).

## 2.4 Soja

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, sendo que na safra 2014/2015, a produção foi de aproximadamente 96 milhões de toneladas, dos quais o consumo interno do grão é de aproximadamente 39 milhões de toneladas (CONAB, 2015; EMBRAPA, 2015).

A soja é uma importante leguminosa que fornece proteínas de alta qualidade e aminoácidos essenciais, principalmente lisina. Essa leguminosa é rica em ácidos graxos insaturados e isoflavona. Apesar dessas características positivas, o consumo de produtos alimentícios a base de soja é limitado, devido ao sabor desagradável e a presença de oligossacarídeos não digeríveis, tais como rafinose e estaquiose, que causam desconforto abdominal. A lipoxigenase é a responsável pelo sabor desagradável da soja e pela degradação de sua cor. A fermentação é uma alternativa para melhorar as propriedades sensoriais e diminuir o sabor desagradável, e tornar esses produtos um alimento funcional, com características benéficas à saúde através dos processos metabólicos dos microrganismos probióticos (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014; LI et al., 2014; MATIAS et al., 2014).

O consumo de soja está associado à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, doenças cardiovasculares e gastrointestinais, câncer, diabetes e obesidade. Esses benefícios à saúde são atribuídos à presença de diversos componentes bioativos que podem ser divididos em componentes proteicos e não proteicos, como as isoflavonas (OLMOS et al., 2014).

A hidrólise das proteínas da soja aumenta sua solubilidade assim como a absorção intestinal, essas proteínas hidrolisadas mostram-se mais eficientes que proteínas intactas. Uma das formas de produzir proteínas hidrolisadas é o uso de bactérias do ácido lático (BAL), tradicionalmente usadas na fermentação de uma gama de materiais de origem animal e vegetal (OLMOS et al., 2014).

Na soja, a maior parte das isoflavonas presentes estão na forma de glicosil. Os microrganismos probióticos, incluindo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, possuem  $\beta$ -glicosidades endógenas, as quais podem desempenhar um papel importante na bioconversão de glicosil-isoflavonas durante a fermentação, tornando-se biologicamente ativas na forma aglicona (OLMOS et al., 2014).

A isoflavona é um fitoestrogênio, um composto semelhante ao hormônio feminino e, por isso, seu consumo por parte de crianças e homens esteve em discussão, porém, estudos mostram que a quantidade ingerida não traz perigos à saúde desses indivíduos. Além disso, após a fermentação, a isoflavona muda sua forma (anglicona) e, portanto, não apresenta as mesmas funções de fitoestrogênio (CHAVARRO et al., 2008).

A fermentação do extrato de soja (ES) melhora os aspectos funcionais da soja pela geração de peptídeos anti-hipertensivos, promoção da normobiose do trato intestinal e redução dos oligossacarídeos não digeríveis (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014).

O extrato de soja é um excelente substrato para a produção desses alimentos funcionais, devido ao baixo custo e valor nutricional (proteínas de

qualidade) (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014; OLMOS et al., 2014; PANDEY; MISHRA, 2014). Além disso, a soja se torna uma alternativa a alimentos de origem animal (PANDEY; MISHRA, 2014).

Apesar das características positivas como uma opção à produção de alimentos probióticos, o meio de soja usado como substrato na fermentação para essas formulações apresenta uma baixa taxa de acidificação e um lento crescimento das bactérias probióticas. Esse fato gera um longo tempo de fermentação, proporcionando mudanças indesejáveis as quais não são aceitáveis para os consumidores, por exemplo, sendo interessante a implementação de meios à base de soja com prebióticos, como o frutooligossacarídeo (FOS) (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014; PANDEY; MISHRA, 2014).

O extrato de soja, quando utilizado em baixas concentrações, perde a sua capacidade tamponante e há uma alta redução de pH. Estudos mostram que concentrações de aproximadamente 10 a 13% de soja no meio fermentativo tem efeito positivo no processo (PANDEY; MISHRA, 2014; EVANGELISTA et al., 2012).

## **2.5 Produtos simbióticos**

Um produto simbiótico é definido como a combinação de um ou mais microrganismo probiótico com uma fibra prebiótica. Esses dois ingredientes juntos, em um produto alimentício, promovem uma adaptação prévia, que resulta de uma interação positiva entre o probiótico e o prebiótico *in vivo*. Além disso, essa associação resulta em um aumento na contagem de probióticos e redução de microrganismos patógenos no intestino, e a incorporação de prebióticos também melhora o perfil sensorial e as características físico-químicas e reológicas dos produtos probióticos fermentados (MARTINEZ et al., 2015; PANDEY; MISHRA, 2014).

Processos otimizados para produção de iogurte simbiótico à base de soja mostram que o meio suplementado com 2% (m/v) de frutooligossacarídeo (FOS) aumenta a atividade e o crescimento de *Lactobacillus* spp., e maiores concentrações de FOS resultam em um tempo de fermentação menor, assim como também aumentam a viabilidade das culturas probióticas. Além dos efeitos positivos no processo fermentativo pela adição de FOS, o aumento da concentração do prebiótico também melhora a textura do produto final. Isso pode ser explicado considerando que o FOS fornece energia adicional para a síntese de exopolissacarídeos (EPS), pelas bactérias do ácido lático (BAL), e então melhora a firmeza e viscosidade do iogurte (PANDEY; MISHRA, 2014).

Quando utilizado mais de um microrganismo probiótico, estudos realizados por Pandey e Mishra (2014), mostram que a concentração do inóculo tem efeito negativo no tempo de fermentação, pois afeta a acidificação do processo, e não possui efeito significativo na textura do produto, com isso, afirmam que a concentração do inóculo da combinação de culturas, na razão de 1:1, pode ser de aproximadamente 3% (v/v) (PANDEY; MISHRA, 2014).

Estudos utilizando extrato de soja e culturas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* mostram a relação de simbiose entre os gêneros, onde as bifidobactérias, pela sua ação  $\alpha$ -galactosidase, hidrolisam a rafinose e a estaquiase, disponibilizando-os para o crescimento dos lactobacilos. A proporção de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. na razão de 40:60 apresenta bons resultados para a produção de bebida simbiótica à base de soja, pois atinge uma contagem total de culturas probióticas alta e um tempo de fermentação de aproximadamente 12 horas (MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2012).

A atividade  $\alpha$ -galactosidase de bifidobactéria também foi reportada por Farnworth et al. (2007), o qual mostrou que essa característica permite que bactérias do gênero *Bifidobacterium* ssp. utilizem açúcares tais como rafinose e

estaquiose e tenham atividade proteolítica suficiente para suportar o crescimento em meio de soja, mesmo que em taxas menores do que em caldo MRS ou leite reconstituído.

O efeito simbiótico pode também ser direcionado para diferentes regiões alvo do intestino humano. A escolha adequada do probiótico e prebiótico a ser combinado pode aumentar o efeito benéfico de ambos, sinergicamente, já que a fibra prebiótica serve como substrato para o metabolismo da cultura probiótica, produzindo um produto alimentício funcional de qualidade, apresentando as concentrações adequadas de probióticos e prebióticos (MARTINEZ et al., 2015).

## **2.6 Fermentação**

A fermentação é um processo utilizado pelo homem desde o período Neolítico (aproximadamente 10.000 anos a.C.) para a preservação de alimentos de matérias-primas perecíveis. Sob o ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo do metabolismo microbiano para obtenção de energia a partir de um composto orgânico, sem a presença de um agente oxidante externo (BOURDICHON et al., 2011).

A fermentação do ponto de vista biotecnológico desempenha algumas funções no processamento de alimentos, as principais a serem consideradas são:

- a) Preservação do alimento através da formação de metabólitos inibitórios, tais como ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico), etanol, bacteriocinas etc., muitas vezes em conjunto com a diminuição da atividade de água;
- b) Melhoria da segurança alimentar através da inibição de patógenos ou remoção de compostos tóxicos;
- c) Melhoria do valor nutricional;
- d) Qualidade sensorial do alimento (BOURDICHON et al., 2011).

Durante o processo de fermentação, o metabolismo do microrganismo produz e libera diversas substâncias ativas úteis e de sabor agradável, as quais ainda promovem benefícios adicionais à saúde (LI et al., 2014).

Nos processos fermentativos das indústrias de alimentos, as bactérias do ácido láctico (BAL) exercem papel importante por produzirem alguns ácidos orgânicos, incluindo ácido láctico e ácido acético, que atuam como conservantes naturais, acidulantes e também como intensificadores de sabor (LI et al., 2014).

O ácido láctico, ou lactato, é o principal produto da fermentação láctica realizadas pelas bactérias do ácido láctico durante o metabolismo de oxidação dos carboidratos para obtenção de energia (LIU, 2002).

### **2.6.1 Fermentação láctica**

No metabolismo das bactérias do ácido láctico para produção de lactato na via fermentativa, diversos substratos podem ser utilizados, tais como carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos (LIU, 2002).

As bactérias do ácido láctico possuem dois modos de fermentação sob as condições de concentração não limitante de glicose e de fatores de crescimento (aminoácidos, vitaminas e precursores de ácidos nucleicos) e disponibilidade limitada de oxigênio. Sob essas condições, as bactérias do ácido láctico podem ser divididas em homofermentativas, que convertem a glicose quase quantitativamente em ácido láctico, e em heterofermentativas, que convertem a glicose em ácido láctico, etanol/ácido acético e CO<sub>2</sub>. O que diferencia as bactérias em cada subgrupo é a presença ou ausência de enzimas chaves do metabolismo de açúcar homo ou heterofermentativo, a frutose-1,6-bifosfato aldolase e a fosfoquetolase, respectivamente (AXELSSON, 2004).

Os açúcares (hexoses e pentoses) são os substratos mais comumente utilizados para a formação de ácido láctico pelas bactérias do ácido láctico.

Porém, algumas BAL usam outras vias metabólicas que permitem a produção de lactato a partir de outros substratos, como polióis, ácidos orgânicos e aminoácidos (LIU, 2002).

Na transformação de hexoses a lactato, os açúcares são oxidados pela via glicolítica ou via de *Embden Meyerhof-Parnas* (EMP), na qual esses são fosforilados e transformados em piruvato (ácido pirúvico). O piruvato é então reduzido à lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH). A Figura 3 representa as principais vias metabólicas da fermentação de açúcares nas bactérias do ácido láctico (AXELSSON, 2004; LIU, 2002).

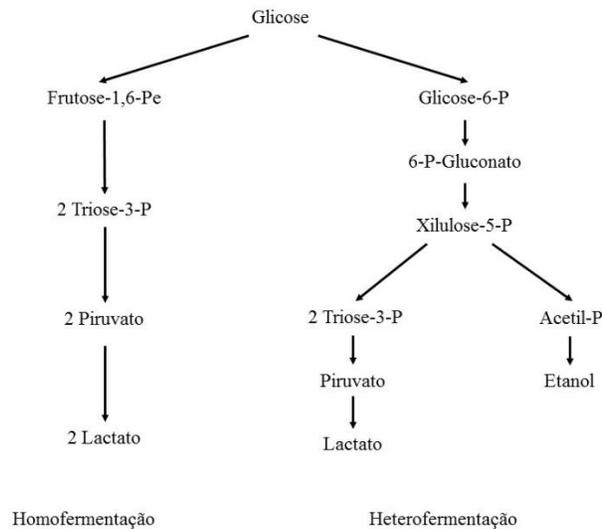


Figura 3 Principais vias metabólicas das bactérias do ácido láctico.  
Fonte: Axelson (2004).

Piruvato é reduzido, principalmente, a lactato, pela ação catalítica da LDH. Entretanto, algumas bactérias do ácido láctico podem catabolizar o piruvato a outros compostos, tais como acetato (ácido acético), etanol, acetaldeído, diacetil, acetoína e 2,3-butanediol. Alguns desses compostos muitas vezes são indesejáveis no alimento fermentado, pois conferem propriedades sensoriais desagradáveis (LIU, 2002).

Existem diversas formas de condução de um processo fermentativo que irá depender das características próprias do microrganismo, meio de cultivo e dos objetivos específicos do processo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

O processo descontínuo, também chamado de processo em batelada, é o método mais tradicional de fermentação, e consiste basicamente na adição do meio de cultura (substrato) e do microrganismo responsável pelo processo bioquímico (inóculo), onde, após decorrido o tempo de fermentação, esses são retirados e o produto recuperado, para dar início a uma nova batelada (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

O modo de operação em batelada pode ser descrito então, como no instante inicial, a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microrganismos e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob ótimas condições. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, uma das características desse processo é que o volume no decorrer da fermentação permanece constante (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

## **2.7 Propriedades reológicas dos alimentos**

O estudo da reologia é importante no desenvolvimento de um alimento, pois influencia na sua aceitabilidade, processamento e manuseio (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004). A aceitabilidade do produto é influenciada pela sua reologia, a qual tem implicação direta ou indireta em aspectos sensoriais, como aparência, flavor e textura (BOURNE, 2002).

A reologia é o estudo da deformação e escoamento da matéria, e para alimentos, é definida como o estudo da deformação e escoamento da matéria-prima, dos produtos intermediários e dos produtos finais (BOURNE, 2002).

A reologia, então, se refere ao comportamento transiente de substâncias, além de definir a relação entre a atuação de uma força em um dado material e a

deformação e/ou escoamento resultante em função do tempo (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004).

Algumas teorias e conceitos da reologia não se aplicam aos alimentos, já que esses muitas vezes possuem, simultaneamente, propriedades de sólidos e líquidos e, com isso, mensurar e especificar algumas dessas propriedades torna-se difícil (BOURNE, 2002).

A definição clássica da reologia divide em duas partes (BOURNE, 2002):

- a) Deformação: aplica-se a materiais que são predominantemente sólidos;
- b) Escoamento: aplica-se a materiais que são predominantemente fluidos.

A deformação pode ser medida e definida por unidades de força e tensão. A força (F), dada em Newton (N), é determinada através da massa x comprimento x tempo<sup>-2</sup>. A tensão de cisalhamento ( $\sigma$ ) é a força por unidade de área, expressa em Pascal (Pa) (BOURNE, 2002).

O escoamento de um fluido está relacionado à sua viscosidade ( $\mu$ ), definida como sendo a tendência de um fluido escoar com facilidade ou dificuldade. Também chamada de viscosidade dinâmica ou viscosidade absoluta, é o atrito interno de um líquido ou a tendência de resistir ao escoamento. E é definida pela Equação 1 (BOURNE, 2002)

$$\mu = \sigma / \dot{\gamma} \quad (1)$$

Onde,  $\mu$  é a viscosidade,  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento e  $\dot{\gamma}$  é a taxa de deformação. E a unidade de medida para a viscosidade, no Sistema Internacional, é pascal por segundo (Pa.s) (BOURNE, 2002).

Viscosidade relativa ou viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) é definida como a viscosidade de um fluido não-Newtoniano (BOURNE, 2002).

Um fluido, que tem seu perfil de escoamento independente do tempo, pode ser classificado de acordo com o seu tipo de escoamento, como fluidos Newtonianos e fluidos não-Newtonianos. A maioria dos alimentos fluidos ou semifluidos está dentro das diversas classes dos fluidos não-Newtonianos (BOURNE, 2002).

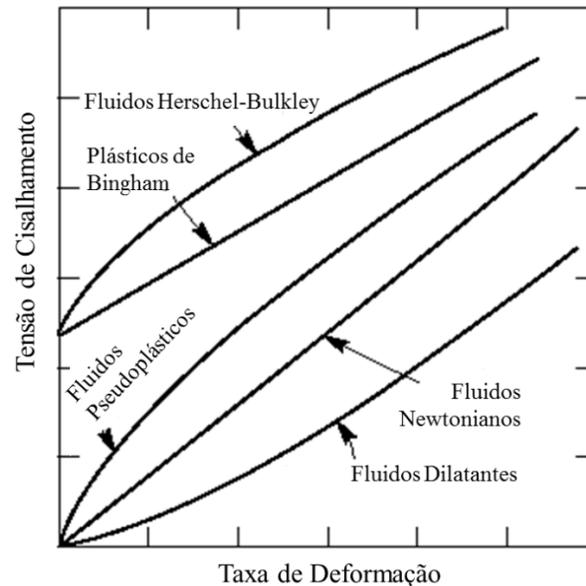


Figura 4 Comportamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.  
Fonte: Adaptado de Bourne (2002).

### 2.7.1 Fluidos Newtonianos

Nos fluidos Newtonianos, a taxa de cisalhamento é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento, e a viscosidade é independente da taxa de deformação, dentro da faixa de escoamento laminar. A viscosidade apresenta um único valor e é dada pela inclinação da curva da tensão de cisalhamento por taxa de deformação. As características desse tipo de escoamento são descritas pela Equação 2 (BOURNE, 2002).

$$\mu = \sigma/\gamma \quad (2)$$

### 2.7.2 Fluidos não-Newtonianos

No geral, nos fluidos não-Newtonianos, a tensão de cisalhamento não é proporcional à taxa de deformação. Os fluidos não-Newtonianos são classificados de acordo com suas propriedades físicas (BOURNE, 2002).

a) Plástico (ou Bingham)

Nos fluidos plásticos uma tensão de cisalhamento mínima, conhecida como tensão de escoamento, deve ser excedida para que o fluido comece a escoar. Esse tipo de escoamento é frequentemente encontrado em alimentos. A taxa de escoamento é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento depois que a tensão de escoamento tenha sido excedida. Em um fluido plástico a viscosidade aparente muda dependendo da taxa de deformação (BOURNE, 2002).

b) Pseudoplástico

No escoamento dos fluidos pseudoplásticos um aumento da tensão de cisalhamento, aumenta de forma não proporcional à taxa de deformação. Esse tipo de fluido não necessita de tensão de cisalhamento inicial para escoar ( $\sigma_0 = 0$ ) e a viscosidade aparente decresce com a taxa de deformação (BOURNE, 2002).

c) Fluido Dilatante

No escoamento de fluidos dilatantes não é necessária uma tensão de cisalhamento inicial ( $\sigma_0 = 0$ ) e a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de deformação. Esse tipo de fluido é chamado de dilatante porque há um aumento de volume do fluido quando o escoamento ocorre (BOURNE, 2002).

d) Herschel-Bulkley

Os fluidos Herschel-Bulkley apresentam o comportamento que obedecem a lei da potência e necessitam de tensão de cisalhamento inicial. A Equação 3 descreve esse comportamento é

$$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \gamma^n \quad (3)$$

Onde,  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento,  $\sigma_0$  é a tensão de cisalhamento inicial,  $K$  é o índice de consistência,  $\gamma$  é a taxa de deformação e  $n$  é o índice de comportamento do fluido ou de escoamento (BOURNE, 2002).

## 2.8 Planejamento experimental

O desenvolvimento de um produto ou processo envolve inúmeras variáveis, tornando-se um trabalho complexo, tendo como objetivo a minimização de custos e tempo, maximização de rendimento, produtividade e qualidade desses produtos. Por isso, o planejamento experimental apresenta grande importância (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O planejamento ou delineamento experimental permite determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, fornecendo informações sobre a robustez ou não das respostas desejadas, e também permite a otimização do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Além da otimização do processo, a utilização do planejamento experimental reduz o número de experiências ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. Analisa os fatores simultaneamente e permite verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse, possibilita otimizar mais de uma

resposta ao mesmo tempo, e permite calcular e avaliar o erro experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

### **2.8.1 Delineamento Composto Central Rotacional**

Para uma investigação inicial dos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas, no caso em que se tem 4 variáveis independentes ou fatores, recomenda-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A metodologia de análise de superfície de resposta é também uma técnica estatística aplicada para a modelagem e a análise de vários processos em que a resposta de interesse é influenciada por diversos fatores, sendo a mesma otimizada (JABEEN et al., 2015). O DCCR utilizado juntamente com a metodologia de análise de superfície de resposta é mais vantajoso se comparado com o DCCR clássico, pois, se obtém uma boa precisão do experimento realizado (AHMADI et al., 2006). O modelo de regressão obtido proporciona a análise para o efeito de cada fator individual e para todas as possíveis relações que existem entre as variáveis dependentes e independentes (PRIYADHARSHINI; BAKTHAVATSALAM, 2016).

## REFERÊNCIAS

AHMADI, M. et al. Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1148-1154, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “**Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde**” Resolução nº18. Brasil, 2008.

AXELSSON, L. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Third Edition, 2004.

BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-443, 2013.

BERGER, K.; FLACK, P.; LINNINGE, C.; NILSSON, U. AXLING, U.; GREY, C.; STALBRAND, H.; KARLSSON, E. N.; NYMAN, M.; HOLM, C.; ADLERCREUTZ, P. Cereal Byproducts Have Prebiotic Potential in Mice Fed a High-Fat Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8169-8178, 2014.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 87-97, 2011.

BOURNE, M. **Food Texture and Viscosity**. 2 ed. Massachusetts: Academic Press, 2002.

CHAVARRO, J. E.; TOTH, T. L.; SADIO, S. M.; HAUSER, R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. **Human Reproduction**. v. 23, p. 2584-2590, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamentos de Safras. Brasil, 2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em 20 jan. 2017.

DOLEYRES, Y.; PAQUIN, C.; LEROY, M.; LACROIX, C. Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 168-173, 2002.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Dados Econômicos. Brasil, 2015**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> .>. Acesso em 20 jan.2017.

ESPÍRITO-SANTO, A. P.; MOUQUET-RIVIER, C.; HUMBLLOT, C.; CAZEVIEILLE, C.; ICARD-VERNIÈRE, C.; SOCCOL, C. R.; GUYOT, J. P. Influence of cofermentation by amylolytic Lactobacillus strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. **Food Research International**, v. 57, p. 104-113, 2014.

EVANGELISTA, S. R.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Development of a soy-based synbiotic beverage. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1128-1135, 2012.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. 2001.

FOOD PROCESSING. **Formulation Trends for 2017**. Estados Unidos, 2016. Disponível em: < <http://www.foodprocessing.com/articles/2017/formulation-trends/?start=0>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

FOOD PROCESSING. **Probiotics Showing Growth in the Food and Beverage Market**. Estados Unidos, 2014. Disponível em: <<http://www.foodprocessing.com/articles/2014/probiotics-showing-growth/>> . Acesso em: 10 dez. 2016.

FOOD PROCESSING. **Probiotic Market Propagates**. Estados Unidos, 2012. Disponível em: < <http://www.foodprocessing.com/articles/2012/probiotic-market-propagates/> >. Acesso em: 20 dez. 2016.

GOH K. T., HAISMAN D. R., ARCHER R. H., SINGH H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research Internacional**, v.38, p. 605–613, 2005.

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

GRATTEPANCHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 2, p. 123-132, 2007.

HAMET, M. F.; PIERMARIA, J. A.; ABRAHAM, A. G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 129-135, 2015.

HERNALSTEENS, S. **Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por via enzimática**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp, Campinas, SP, 2002.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

HOU, J. W.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research International**, v. 33, p. 393-397, 2000.

JABEEN, H. et al. Optimization of profenofos degradation by a novel bacterial consortium PBAC using response surface methodology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 100, p. 89-97, 2015.

LI, C.; LI, W.; CHEN, X.; FENG, M.; RUI, X.; JIANG, M.; DONG, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 477-485, 2014.

LIANG, Z.; LI, W.; YANG, S.; DU, P. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. **Chemosphere**, v. 81, p. 626-632, 2010.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 115-131, 2002.

MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1993-2015, 2015.

MASSOT-CLADERA, M.; COSTABILE, A.; CHILDS, C. E.; YAQOOB, P.; FRANCH, A.; CASTELL, M.; PÉREZ-CANO, F. J. Prebiotic effects of cocoa fibre on rats. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 341-352, 2015.

MATIAS, N. S.; BEDANI, R.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. A probiotic soy-based innovative product as an alternative to petit-suisse cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 411-417, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, S.; MISHRA, H. N. Effect of Synbiotic Interaction of Fructooligosaccharide and Probiotics on the Acidification Profile, Textural and Rheological Characteristics of Fermented Soy Milk. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 3166-3176, 2012.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; MAUGERI, F. F.; ALVES, J. G. L. F.; RODRIGUES, M. I. Synbiotic Soy Beverages: Principles and Sensory Attributes. In: HUI, Y. H.; EVRANUZ, E. Ö. (Org.) **Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2012. p. 103-130.

MOON, J. S.; SHIN, S. Y.; CHOI, H. S.; JOO, W.; CHO, S. K.; LI, L.; KANG, J. H.; KIM, T. J.; HAN, N. S. In vitro digestion and fermentation properties of linear sugar-beetarabinan and its oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 50-56, 2015.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, p. 237-248, 2012.

OLMOS, A. R.; BRU, E.; GARRO, M. S. Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p.16-23, 2014.

PANDEY, S. M.; MISHRA, H. N. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 458-467, 2014.

PRESTI, I.; D'ORAZIO, G.; LABRA, M.; LA FERLA, B.; MEZZASALMA, V.; BIZZARO, G.; GIARDINA, S.; MICHELOTTI, A.; TURSI, F.; VASSALO, M.; DI GENARO, P. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 5613-5626, 2015.

PRIYADHARSHINI, S. D.; BAKTHAVATSALAM, A. K. Optimization of phenol degradation by microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett- Burman design and response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 150-156, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3. ed. São Paulo: Cárita, 2014.

RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILA, N. C. G.; SALMINEN, S. Short Communication: effect of exopolysaccharide isolated from "Viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2355-2358, 2006.

SALINAS, M. V.; PUPPO, M. C. Optimization of the formulation of nutritional breads based on calcium carbonate and inulin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 95-101, 2014.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; SAVADOGO, P. W.; BARRO, N.; OUATTARA, A. S.; TRAERÉ, A. S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n.3, p. 189-194, 2004.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v.2.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882-894, 2010.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. 3, 2003.

STATISTICA, 2008. **Data Analysis Software System**. Disponível em: <[www.stasolft.com](http://www.stasolft.com)>. Acesso em: 10 fev. 2017.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 - Estudos cinéticos da produção de fermentado de soja com agentes probióticos**

Mariá Andrade Teixeira, Lorrany Ramos do Carmo, Amanda Maria Teixeira Lago, Olga Lucía Mondragón-Bernal, José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Food Technology and Biotechnology*.

## INTRODUÇÃO

Pesquisa realizada pela *DuPont Nutrition and Health*, em 2012, mostrava que produtos que promoviam a saúde digestiva era o maior mercado de alimentos funcionais na Europa, América do Sul e Japão (1). Esse mercado é formado por produtos e alimentos que auxiliam na saúde, por exemplo, probióticos, prebióticos, derivados de soja e fibras dietéticas. Em 2014, segundo a *Food Processing* (2) o mercado de probióticos em alimentos e bebidas continuava mostrando crescimento.

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (3). Para a legislação brasileira, a dose diária mínima de probióticos no produto deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC), por grama de produto (4).

Os microrganismos probióticos mais conhecidos e mais amplamente utilizados pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses microrganismos agem benéficamente, principalmente pela modificação da microbiota intestinal, porém, para serem eficientes, as cepas devem apresentar-se resistentes às condições físico-químicas adversas do sistema digestório humano, e devem, principalmente, ser consideradas GRAS para consumo humano (5).

As bactérias probióticas são fastidiosas exigindo vários nutrientes e fatores para o seu crescimento, esses fatores de crescimento podem ser os prebióticos.

Os prebióticos são substâncias não digeríveis pelos seres humanos que proporcionam efeito fisiológico benéfico sobre o hospedeiro, ao estimular seletivamente o crescimento favorável ou a atividade de número limitado de bactérias naturais (3). Esses oligossacarídeos têm atividade prebiótica se permitirem o aumento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. quando

fermentados no *cólon* humano, causando mudanças na microbiota intestinal (6,7).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose ligados a moléculas de glicose, e são os prebióticos mais conhecidos e empregados como ingrediente para alimentos funcionais, pois apresentam características tecnológicas e propriedades nutricionais interessantes, como alta solubilidade em água, fermentação completa no intestino humano, baixo teor calórico e sabor doce (7,8).

O desenvolvimento de um produto que combina mais de um microrganismo probiótico e prebiótico gera produtos chamados de simbióticos. Essa associação positiva aumenta a contagem de probióticos, e a incorporação de prebióticos causa efeitos positivos no processo fermentativo, melhora o perfil sensorial e as características físico-químicas e reológicas dos produtos fermentados (4,9). A melhora da qualidade sensorial e aceitação desses produtos estão relacionadas à melhoria da textura, firmeza e viscosidade do produto final, que é conseguida pela síntese de exopolissacarídeos (EPS) através das bactérias do ácido láctico, as quais utilizam os prebióticos como energia adicional para a síntese desses compostos (9).

A *Food Processing* (2016) (10) realiza pesquisas de mercado para alimentos e bebidas, e mostrou algumas tendências para 2017. Algumas dessas principais tendências são o desenvolvimento de produtos que refletem os hábitos alimentares mais saudáveis dos consumidores, como a procura por alimentos funcionais, produtos com redução de açúcar e de origem vegetal.

A soja é um vegetal que fornece proteínas de alta qualidade e aminoácidos essenciais, é rica em ácidos graxos insaturados e isoflavona. Apesar das qualidades nutricionais, o consumo de produtos alimentícios a base de soja é limitado, devido ao sabor desagradável e a presença de oligossacarídeos não digeríveis que causam desconforto abdominal. Segundo a Companhia Nacional

de Abastecimento (11), o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, o que permite o extrato de soja ser excelente substrato para a produção desses alimentos funcionais, devido ao seu baixo custo e grande valor nutricional (9,12,13).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos parâmetros: concentração de extrato de soja e de frutooligossacarídeos, proporção de *Lactobacillus* e agitação na produção de uma bebida fermentada à base de soja, caracterizando-a físico-química e reologicamente, visando obter um produto simbiótico que atenda as legislações vigentes.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

Para formulação do meio fermentativo foi utilizado extrato de soja Provesol SM-N fornecido pela empresa Olvebra Industrial S/A (Rio Grande do Sul, Brasil). Os microrganismos probióticos que realizaram a fermentação foram *Lactobacillus paracasei* (LBC-81), *Lactobacillus rhamnosus* (LR-32) fornecidos pela empresa Danisco Dupont® (São Paulo, Brasil) e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12) fornecido pela empresa Chr. Hansen S/A (Horsholm, Dinamarca). O agente prebiótico que foi adicionado ao meio foi o frutooligossacarídeo (FOS) (Sensus, Roosendaal, Holanda).

### **Determinação/contagem de células dos microrganismos liofilizados**

Foi feita a verificação da concentração de células dos microrganismos liofilizados de acordo com a metodologia proposta por Vinderola & Reinheimer (2000) e modificada por Mondragón-Bernal et al. (2012) (14). Estes foram

incubados a 37°C durante 30 minutos para ativação dos microrganismos. Após a incubação, foi realizado plaqueamento em profundidade em meio agar MRS, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, em anaerobiose e, posteriormente, foi realizada a contagem diferenciada através da morfologia das colônias.

### **Ativação dos microrganismos liofilizados**

Os microrganismos liofilizados passaram pela etapa de ativação. A ativação das culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* foi feita em caldo MRS, previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min. Em seguida, foram mantidos em estufa B.O.D a 37°C por 48 h. O mesmo procedimento foi seguido para a cultura de *Bifidobacterium lactis*, porém, esta foi mantida em anaerobiose através de geradores de anaerobiose (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

### **Padronização das culturas**

Para a realização das curvas de crescimento, as culturas foram ativadas como proposto anteriormente. Após 48 h de ativação deu início à curva de crescimento por 24 h, em triplicata. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (FEMTO 700S Soft., São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm. Caldo MRS estéril foi utilizado como branco na análise.

A determinação da viabilidade celular foi realizada por plaqueamento em profundidade (*pour plate*) e incubadas a 37°C por 72 h. A cultura de *Bifidobacterium lactis*, assim como as amostras plaqueadas foram mantidas em anaerobiose utilizando geradores de anaerobiose (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

A partir dos dados obtidos pelas curvas de crescimento, foram construídos gráficos entre absorbância e a contagem de colônias viáveis.

### **Propagação das culturas liofilizadas**

Após a ativação, foi feita a propagação das bactérias. Feita a verificação da turbidez, com base na correlação absorbância e número de células viáveis previamente estabelecida por meio das curvas de crescimento, foi possível determinar o valor de absorbância correspondente a uma contagem entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL. Para a propagação as culturas foram ativadas como a metodologia proposta e o meio de ativação foi transferido para caldo MRS estéril e mantido em estufa B.O.D a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 14 a 24h.

Em seguida, uma alíquota do novo inóculo foi transferida para eppendorfs, previamente esterilizados ( $121\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min) e centrifugados (Spinlab modelo SL-5AM, São Paulo, Brasil) a  $7126g$  por 5 minutos, a fim de separar o microrganismo do caldo MRS. O sobrenadante foi descartado e o microrganismo centrifugado mantido no eppendorf. Posteriormente, meio congelante estéril foi acrescido ao microrganismo e armazenado em condições de congelamento para uso futuro como cultura estoque (15).

### **Preparo do inóculo**

O pré-inóculo de fermentação foi feito a partir da cultura estoque. Em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS estéril foi adicionado 1 mL da cultura estoque e mantido em estufa B.O.D a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Posteriormente, em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo MRS estéril foi adicionado 10% (v/v) do inóculo anterior (10 mL) e mantido a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Após 12 h, 10% (v/v) do inóculo (30 mL) foi transferido para erlenmeyer contendo 300 mL de meio de

fermentação, com base na correlação entre absorvância e o número de células viáveis através das curvas de crescimento, correspondente a uma contagem de  $10^6$  UFC/mL.

### **Fermentação**

As fermentações foram realizadas em sistema de batelada em erlenmeyers com um volume de meio a ser fermentado de 300 mL, adaptando as metodologias de Doyleres et al. (2002) (16). O meio a ser fermentado era composto por extrato de soja (8-12 g/100mL) e FOS (0-4 g/L). As fermentações foram conduzidas por até 10 horas, até atingir pH próximo a 4,5, a 37°C, com velocidade de agitação mecânica de 0 a 100 rpm em incubadora orbital. Amostras em triplicata foram retiradas para realização das seguintes análises: contagem total e diferenciada (log UFC/mL), pH e acidez titulável (%), açúcares redutores e totais (g/L) e exopolissacarídeos (g/L). As propriedades reológicas (viscosidade aparente, tensão de cisalhamento, índice de consistência, índice de escoamento) e sinérese foram analisadas na amostra do final da fermentação.

### **Delineamento experimental**

Foi realizado um delineamento experimental DCCR de 4 variáveis, 8 pontos axiais e 3 pontos centrais (17) para um total de 27 ensaios, sendo as 4 variáveis independentes: teor de extrato de soja (ES:8-12 g/100mL), teor de FOS (0-4g/100mL), proporção de *Lactobacillus* (10-50) e agitação (0-100 rpm), segundo a Tabela 1.

Tabela 1. Níveis das variáveis para o planejamento DCCR.

Nível	-2	-1	0	+1	+2
X1: ES (%)	8	9	10	11	12
X2: FOS (%)	0	1	2	3	4
X3: Proporção de <i>Lactobacillus</i>	10	20	30	40	50
X4: Agitação	0	25	50	75	100

ES: extrato de soja, FOS: frutooligossacarídeos.

O meio com ES foi inoculado com um valor fixo de bifidobactérias (10% v/v) e a proporção de lactobacilos definida pelo delineamento, com contagem total inicial de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, e foi fermentado em erlenmeyers a 37°C. Amostras foram coletadas em triplicata periodicamente para análise. As variáveis dependentes ou respostas foram: fator de crescimento total (%FCtot) e fator de crescimento de bifidobactérias (%FCbifid), consumo de açúcares redutores (%ConsAR) e consumo de açúcares totais (%ConsAT), produção de EPS e sinérese (%). O tratamento dos resultados foi realizado usando-se as técnicas de planejamento experimental através do software Statistica 7.0.

### Metodologia analítica

#### Contagem de bactérias probióticas totais

Para a contagem total de probióticos presentes na bebida fermentada, foram retiradas a cada 4 horas amostras de 1,0 mL e transferidas para tubos contendo 9,0 mL de água peptonada (0,01%), a partir dessa diluição foram feitas diluições subsequentes. Com as diluições adequadas foi realizado o plaqueamento em profundidade em meio agar MRS com 0,3% de azul de anilina, incubadas em B.O.D. por 72 horas a 37°C em anaerobiose, por meio de geradores de anaerobiose (14). Com base na contagem diferenciada de colônias

o fator de crescimento total (%FCtot) e o fator de crescimento de bifidobactérias (%FCbifid) foi determinado através da Eq. 3.

$$\%FC_{tot} \text{ ou } \%FC_{bifid}(\log UFC/mL) = \left( \frac{\text{contagem final}}{\text{contagem inicial}} \right) \times 100$$

/3/

### Medição do pH e acidez titulável

A determinação das mudanças de pH no meio de fermentação foi feita através de medições com intervalo de tempo de 2 horas, das amostras retiradas em potenciômetro MS Tecnoyon Instrumentação (São Paulo, Brasil).

Para a determinação da acidez titulável foi diluído 5,0 mL da amostra em água destilada e titulado com solução de NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína 1% como indicador. A acidez titulável em ácido láctico foi determinada pela Eq. 4 (*Metodologia adaptada 18*).

$$\% AT \text{ em ácido láctico} = \frac{V \times f \times 90 \times M}{A}$$

/4/

Onde,

AT: acidez titulável;

V: volume da solução NaOH gasto na titulação (mL);

A: volume da amostra (mL);

f: fator de correção da solução de NaOH;

90: fator de conversão do ácido láctico;

M: molaridade da solução de NaOH.

### Determinação de açúcares redutores (AR) e totais (AT)

Para a determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT), primeiramente, foi feita a remoção de células e proteínas adicionando-se 0,10 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra que foram centrifugadas a 3000 g durante 30 min. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído em água destilada e foi feita a determinação de AR e AT pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (19). A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Femto 700S a 540 nm. A taxa de consumo de açúcares redutores (%ConsAR) e consumo de açúcares totais (%ConsAT) foi medida segundo a Eq. 5.

$$\%ConsAR \text{ ou } \%ConsAT = \left( \frac{(conc. \text{ inicial} - conc. \text{ final})}{concentração \text{ inicial}} \right) \times 100$$

/5/

### Determinação de exopolissacarídeos (EPS)

Para a determinação de exopolissacarídeos (EPS) foi feita a remoção de células e proteínas adicionando-se 0,10 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra, que foram centrifugadas a 3000 g durante 30 minutos.

#### Extração do EPS Bruto

O sobrenadante obtido foi aquecido a 100°C por 10 min para inativação das enzimas presentes e centrifugado a 2500 g por 20 min. Os EPSs foram precipitados do sobrenadante adicionando-se 2 volumes de etanol 95% resfriado, e mantidos *overnight* (12 horas) a 4°C. Posteriormente, foram centrifugados

novamente a 2500 g durante 20 minutos e o precipitado foi re-dissolvido em água destilada e adicionado de 2 volumes de etanol 95% resfriado. Em seguida, centrifugou-se novamente a 2500 g por 20 min e o *pellet* ressuspensionado em água destilada (1,0 mL) (*Metodologia adaptada 20-22*).

#### Quantificação de EPS pelo método de Antrona

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 2,0 mL do reativo de Antrona (0,2 g/100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 1,0 mL da amostra extraída previamente diluída (0,01-0,1 g/L). Os tubos foram incubados em banho-maria, em ebulição durante 10 minutos, e resfriados em banho de gelo. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Femto 700S a 620nm. A curva padrão foi elaborada utilizando-se dextrana (Spectrum Chemical, Nova Jérsei, EUA) de massa molecular 9300 Da (0,005-0,04 g/L) (*Metodologia adaptada 20-22*).

Realizada a quantificação da concentração de exopolissacarídeos no início e no final da fermentação, foi então calculada a produção de EPS pela Eq. 6.

$$\text{Produção de EPS (g/L)} = \text{concentração final} - \text{concentração inicial} \quad /6/$$

#### Sinérese

Foi medido o volume de soro separado do produto final da fermentação, calculando-se a porcentagem correspondente ao volume total de amostra em tubos cônicos (tubos Falcon) com escala em mL, como mostra a Eq. 7 (14).

$$\%Sinérese = \left( \frac{\text{volume de soro}}{\text{volume total}} \right) \times 100$$

/7/

### **Determinação das propriedades reológicas**

O estudo do comportamento reológico das amostras retiradas ao final da fermentação dos diferentes tratamentos foi realizado na temperatura de 25°C (ambiente), utilizando o reômetro HAAKE ReoStress 6000 (Thermo Scientific, Karlsruhe, Alemanha), equipado com um banho termostático HAAKE A10 (Thermo Scientific) e um sistema de controle de temperatura universal HAAKE UTM Controller (Thermo Scientific, Karlsruhe, Alemanha), acoplado a um conjunto de sensor de geometria de cilíndricos concêntricos com GAP de 5,3 mm, para todas as amostras. As amostras foram analisadas em 3 repetições e utilizou-se um volume de  $V = 16,1$  mL para cada repetição.

Para quebrar a tixotropia, eliminando a influência do tempo no comportamento do escoamento dos produtos, cada amostra foi submetida a uma rampa contínua de taxa de deformação na faixa de 0 a  $300 \text{ s}^{-1}$ , durante 2 minutos para a curva ascendente e 2 minutos para a curva descendente. Após este procedimento, gerou-se a curva de fluxo, para a caracterização reológica de cada amostra, através da aplicação de uma curva de escoamento variando-se a taxa de deformação de 0 a  $300 \text{ s}^{-1}$ , durante um período de 2 minutos para a temperatura ambiente.

Os dados experimentais das curvas de fluxo foram ajustados aos modelos Lei de Newton, Lei da Potência e *Herschell-Buckley* por meio do pacote estatístico *Statistical Analysis System 9.1.2* (SAS Institute Inc., Cary, U.S.A., 2008). Os parâmetros foram avaliados através da análise de variância

(ANOVA) e teste de médias (Tukey  $p \leq 0,05$ ). Os modelos utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Modelo reológicos ajustados a cada amostra estudada.

<u>Tipo de fluido</u>	<u>Ajuste do modelo</u>	<u>Viscosidade</u>
Newtoniano	$\sigma = K \cdot \gamma, \sigma_0 = 0$	$\mu = \sigma / \gamma = K$
Plástico (ou Bingham)	$\sigma = K \cdot \gamma + \sigma_0, \sigma_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\sigma_0 / \gamma) + K$
Pseudoplástico	$\sigma = K \cdot \gamma^n, n < 1$	$\mu_{ap} = K \cdot \gamma^{(n-1)}$
Herschel-Bulkley	$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \gamma^n$ $n < 1 \text{ e } \sigma_0 > 0$	$\mu_{ap} = (\sigma_0 / \gamma) + K \cdot \gamma^{(n-1)}$

$\sigma$ : tensão de cisalhamento,  $\sigma_0$ : tensão de cisalhamento inicial,  $\mu$ : viscosidade,  $\mu_{ap}$ : viscosidade aparente,  $\gamma$ : taxa de deformação,  $K$ : índice de consistência,  $n$ : índice de comportamento do fluido.

Fonte: Bourne (2002) (23).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR

#### Estudo cinético do crescimento total de probióticos

Em todos os tratamentos foi observado que as bactérias lácticas e a bifidobactéria cresceram aproximadamente, 2 ciclos logarítmicos, conforme Tabela 3. Em todos os tratamentos (T1 a T25) obteve-se uma contagem total final de  $10^8$  UFC/mL, obedecendo o mínimo estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA). Os tratamentos 5, 6, 7, 12, 13, 14 e os pontos centrais (25, 26 e 27) apresentaram os melhores resultados com contagem total acima de  $10^9$  UFC/mL.

A legislação brasileira recomenda que deve haver entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC por grama de produto para que sejam obtidos os efeitos benéficos à saúde, com uma dose mínima de probióticos entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/porção diária do produto (4).

Matias et al. (2014) (24) em um estudo sobre a viabilidade de probióticos, utilizando uma formulação de 3,1% de soja e tempo de fermentação até atingir pH 4,45, também alcançou uma contagem para *B. animalis* BB-12 de  $1,51 \times 10^8$  UFC/mL.

No geral, contagem de bactérias probióticas variam entre  $10^8$ - $10^9$  UFC/g, com um tempo de fermentação de 15 a 19 horas até o pH desejado, quando utilizadas somente uma cultura (12). Espírito-Santo et al. (2015) (12) utilizando um meio de 10% de soja liofilizada em água e co-culturas de *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis* subsp. *lactis*, reduziram o tempo de fermentação para entre 5 e 9 horas, até atingir pH de aproximadamente 4,5, enquanto que quando utilizada apenas uma cultura esses tempos variaram de 11 a 24 horas.

Tabela 3. Cinética de crescimento da contagem total de bactérias para cada tratamento.

Tratamentos	Contagem (UFC/mL)				
	Tempo (h)				
	0	4	6	8	10
<b>1</b>	$(1,89 \pm 0,57) \times 10^7$	$(1,52 \pm 0,19) \times 10^8$	$(7,35 \pm 0,15) \times 10^8$	-	-
<b>2</b>	$(1,87 \pm 0,14) \times 10^7$	$(2,03 \pm 0,87) \times 10^8$	-	$(9,28 \pm 0,44) \times 10^8$	-
<b>3</b>	$(4,25 \pm 0,18) \times 10^7$	$(2,93 \pm 0,10) \times 10^8$	-	$(2,43 \pm 0,66) \times 10^8$	-
<b>4</b>	$(3,81 \pm 0,49) \times 10^7$	$(6,15 \pm 0,10) \times 10^8$	-	$(7,52 \pm 0,21) \times 10^8$	-
<b>5</b>	$(2,67 \pm 0,13) \times 10^7$	$(4,86 \pm 0,26) \times 10^8$	-	$(1,76 \pm 0,39) \times 10^9$	-
<b>6</b>	$(3,26 \pm 0,46) \times 10^7$	$(8,96 \pm 0,25) \times 10^8$	-	$(1,41 \pm 0,83) \times 10^9$	-
<b>7</b>	$(3,58 \pm 0,53) \times 10^7$	$(1,38 \pm 0,00) \times 10^9$	-	$(2,03 \pm 0,58) \times 10^9$	-
<b>8</b>	$(1,62 \pm 0,01) \times 10^7$	$(2,40 \pm 0,85) \times 10^8$	$(7,26 \pm 0,10) \times 10^8$	-	-
<b>9</b>	$(5,70 \pm 0,14) \times 10^6$	$(2,81 \pm 0,46) \times 10^7$	-	$(4,31 \pm 0,14) \times 10^8$	-
<b>10</b>	$(5,24 \pm 0,12) \times 10^6$	$(3,58 \pm 0,68) \times 10^7$	-	$(4,28 \pm 0,64) \times 10^8$	-
<b>11</b>	$(4,22 \pm 0,00) \times 10^6$	$(4,80 \pm 0,12) \times 10^7$	-	$(5,15 \pm 0,92) \times 10^8$	-
<b>12</b>	$(3,98 \pm 0,97) \times 10^7$	$(4,05 \pm 0,70) \times 10^8$	-	$(1,66 \pm 0,16) \times 10^9$	-
<b>13</b>	$(3,95 \pm 0,27) \times 10^7$	$(6,71 \pm 0,62) \times 10^8$	-	$(1,61 \pm 0,80) \times 10^9$	-
<b>14</b>	$(3,22 \pm 0,39) \times 10^7$	$(5,58 \pm 0,63) \times 10^8$	-	$(2,93 \pm 0,66) \times 10^9$	-
<b>15</b>	$(8,93 \pm 0,84) \times 10^6$	$(1,01 \pm 0,50) \times 10^8$	-	$(6,41 \pm 0,62) \times 10^8$	-

<b>16</b>	$(4,73 \pm 0,21) \times 10^6$	$(8,32 \pm 0,75) \times 10^7$	-	$(5,52 \pm 0,16) \times 10^8$	-
<b>17</b>	$(2,37 \pm 0,11) \times 10^6$	$(3,79 \pm 0,10) \times 10^7$	-	-	$(5,12 \pm 0,96) \times 10^8$
<b>18</b>	$(3,57 \pm 0,12) \times 10^6$	$(4,69 \pm 0,30) \times 10^7$	-	-	$(5,67 \pm 0,56) \times 10^8$
<b>19</b>	$(3,15 \pm 0,10) \times 10^6$	$(3,67 \pm 0,56) \times 10^7$	-	-	$(4,12 \pm 0,83) \times 10^8$
<b>20</b>	$(5,17 \pm 0,76) \times 10^6$	$(5,90 \pm 0,85) \times 10^7$	-	-	$(8,74 \pm 0,91) \times 10^8$
<b>21</b>	$(3,27 \pm 0,20) \times 10^6$	$(3,83 \pm 0,55) \times 10^7$	-	-	$(5,98 \pm 0,11) \times 10^8$
<b>22</b>	$(9,16 \pm 0,49) \times 10^6$	$(1,47 \pm 0,46) \times 10^8$	-	$(6,98 \pm 0,58) \times 10^8$	-
<b>23</b>	$(1,39 \pm 0,11) \times 10^7$	$(1,60 \pm 0,82) \times 10^8$	-	$(2,67 \pm 0,46) \times 10^8$	-
<b>24</b>	$(5,17 \pm 0,21) \times 10^6$	$(2,32 \pm 0,97) \times 10^7$	-	$(2,69 \pm 0,18) \times 10^8$	-
<b>25*</b>	$(2,50 \pm 0,95) \times 10^6$	$(1,01 \pm 0,16) \times 10^8$	-	$(1,36 \pm 0,95) \times 10^9$	-

---

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27)

O maior número de UFC/mL total ( $2,93 \times 10^9$ ) e de bifidobactéria ( $5,40 \times 10^8$ ) foi encontrado no tratamento 14 com 11g/100mL de extrato de soja, 1g/100mL de frutooligossacarídeo, uma proporção de 40% de lactobacilos e agitação de 75 rpm.

Estudos mostram que concentrações de aproximadamente 10 a 13% de soja no meio fermentativo têm efeito positivo no processo (9,25). Além disso, assim como observado por Farnworth et al. (2007) (26), a soja tem pouca habilidade de ação tamponante e, por isso, foram observadas altas taxas de acidificação (tempos de fermentação de até 10 horas).

Estudos realizados por Mondragón-Bernal et al. (2012) (14) utilizando extrato de soja e culturas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também encontraram que a razão de 40:60 apresenta bons resultados para a produção de bebida simbiótica à base de soja, pois atingiu uma contagem total de culturas probióticas de aproximadamente de  $10^{10}$  e um tempo de fermentação de aproximadamente 12 horas.

Na Tabela 4 são apresentados os valores reais (entre parêntesis) e os codificados das variáveis estudadas no DCCR: teor de extrato de soja (%ES), teor de frutooligossacarídeo (%FOS), proporção de lactobacilos (Lacto:Bifido) e agitação, bem como as respostas obtidas fator de crescimento total (%FCtot) e fator de crescimento de bifidobactéria (%FCbifid).

Tabela 4. Matriz DCCR com valores codificados e reais (entre parêntesis) e variáveis respostas fator de crescimento total e fator de crescimento de bifidobactéria.

<b>Tratamentos</b>	<b>%ES</b>	<b>%FOS</b>	<b>Lacto:Bifido</b>	<b>Agit.</b>	<b>%FCtot</b>	<b>%FCbifd</b>
<b>1</b>	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	121,84	125,88
<b>2</b>	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	123,38	124,77
<b>3</b>	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	109,96	110,70
<b>4</b>	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	117,15	117,03
<b>5</b>	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	124,50	126,35
<b>6</b>	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	121,84	123,89
<b>7</b>	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	123,31	122,35
<b>8</b>	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	122,88	126,89
<b>9</b>	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	127,66	126,57
<b>10</b>	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	128,42	129,24
<b>11</b>	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	131,37	133,72
<b>12</b>	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	121,32	124,66
<b>13</b>	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	121,18	124,70
<b>14</b>	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	126,10	133,69
<b>15</b>	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	126,76	116,16

<b>16</b>	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	131,03	127,21
<b>17</b>	-2 (8)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	135,25	135,00
<b>18</b>	+2 (12)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	133,59	138,98
<b>19</b>	0 (10)	-2 (0)	0 (30)	0 (50)	132,46	127,91
<b>20</b>	0 (10)	+2 (4)	0 (30)	0 (50)	133,23	132,74
<b>21</b>	0 (10)	0 (2)	-2 (10)	0 (50)	134,87	133,33
<b>22</b>	0 (10)	0 (2)	+2 (50)	0 (50)	127,01	123,77
<b>23</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	-2 (0)	118,07	124,80
<b>24</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	+2 (100)	125,63	119,66
<b>25</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	144,44	140,88
<b>26</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	145,86	137,44
<b>27</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	139,33	135,48

---

Como pode ser visto na Tabela 4, os maiores fatores de crescimento total foram obtidos nos tratamentos 25, 26 e 27, com valores entre 139 e 146%, assim como para os fatores de crescimento das bifidobactérias, com valores entre 135 e 141%, acrescido do tratamento 18, em que foi também obtido bom crescimento das bifidobactérias.

Na Tabela 5, são mostrados os coeficientes de regressão para fator de crescimento total e fator de crescimento de bifidobactéria e, em negrito são destacados os parâmetros significativos.

Tabela 5. Coeficientes de regressão e p-valor associados para fator de crescimento total e bifidobactéria.

	%FCtot		%FCbifid	
	Reg.	p-valor	Reg.	p-valor
<b>Média/ Interação</b>	143,210	0,000	137,933	0,000
<b>X<sub>1</sub>(L)</b>	0,185	0,938	2,409	0,390
<b>X<sub>1</sub>(Q)</b>	<b>-6,510</b>	<b>0,022</b>	-2,078	0,482
<b>X<sub>2</sub>(L)</b>	-0,800	0,739	-2,225	0,426
<b>X<sub>2</sub>(Q)</b>	<b>-7,297</b>	<b>0,012</b>	-5,411	0,083
<b>X<sub>3</sub>(L)</b>	0,065	0,978	-0,870	0,753
<b>X<sub>3</sub>(Q)</b>	<b>-8,250</b>	<b>0,006</b>	<b>-6,298</b>	<b>0,048</b>
<b>X<sub>4</sub>(L)</b>	<b>5,341</b>	<b>0,042</b>	2,437	0,385
<b>X<sub>4</sub>(Q)</b>	<b>-12,795</b>	<b>0,0002</b>	<b>-9,638</b>	<b>0,005</b>
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	-0,447	0,878	0,596	0,860
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	0,832	0,777	2,911	0,396
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,717	0,807	0,793	0,814
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	3,982	0,191	0,541	0,872
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	3,172	0,291	1,433	0,672
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	-2,987	0,319	-4,191	0,229
<b>R<sup>2</sup></b>	0,768		0,608	

X<sub>1</sub>: extrato de soja; X<sub>2</sub>: frutooligossacarídeo; X<sub>3</sub>: proporção de lactobacilos; X<sub>4</sub>: agitação; L: termo linear; Q: termo quadrático.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a um nível de confiança de 95% (p<0,05), os termos quadráticos do teor de extrato de soja e teor de FOS apresentaram efeito significativo negativo apenas sobre o

fator de crescimento total e os termos quadráticos da proporção de lactobacilos e da agitação apresentaram efeito significativo negativo sobre os dois fatores de crescimento. Já o termo linear da agitação apresentou efeito significativo positivo apenas sobre o fator de crescimento total, o que indica que um aumento na agitação proporciona um aumento no fator de crescimento total. As análises de variância para os modelos de regressão foram feitas e apresentadas na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Análise de variância para fatores de crescimento.

%FCtot						
FV	SQ	gL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab (5%)</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	1319,97	14	94,28	2,85	2,64	0,03
<b>Erro</b>	396,95	12	33,07			
<b>Total</b>	1716,93	26				
R <sup>2</sup> =0,76						
%FCbifid						
FV	SQ	gL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab (5%)</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	819,89	14	58,56	1,33	2,64	0,31
<b>Erro</b>	527,00	12	43,91			
<b>Total</b>	1346,89	26				
R <sup>2</sup> =0,60						

SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

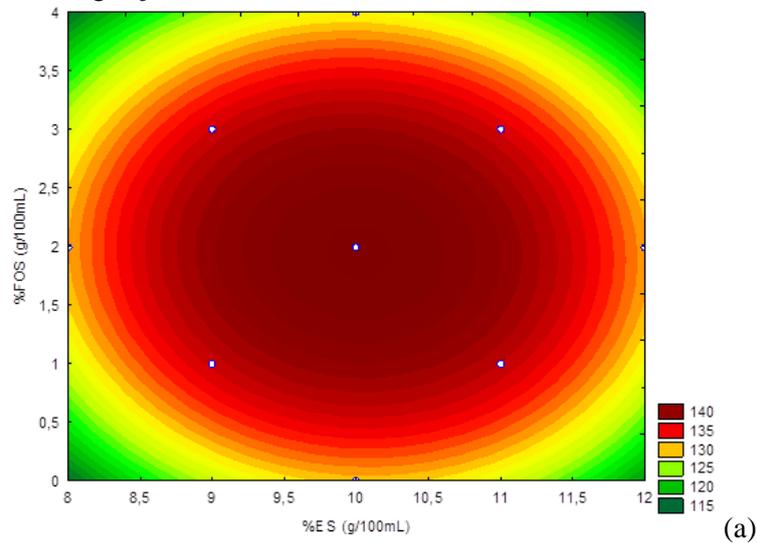
Observa-se na Tabela 6 que o modelo de regressão para o fator de crescimento total é significativo pelo Teste F, sendo que o  $F_{calc} > F_{tab}$  para o modelo, além de apresentar o p-valor baixo, o que não ocorre para o fator de crescimento das bifidobactérias (%FCbifid). O bom ajuste desse modelo foi também verificado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), sendo que o valor acima de 0,70 é considerado satisfatório para confirmar a significância do modelo (17).

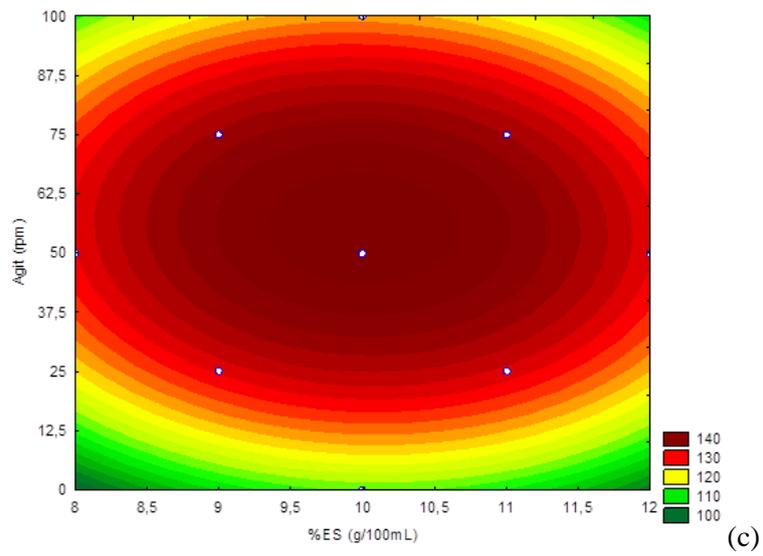
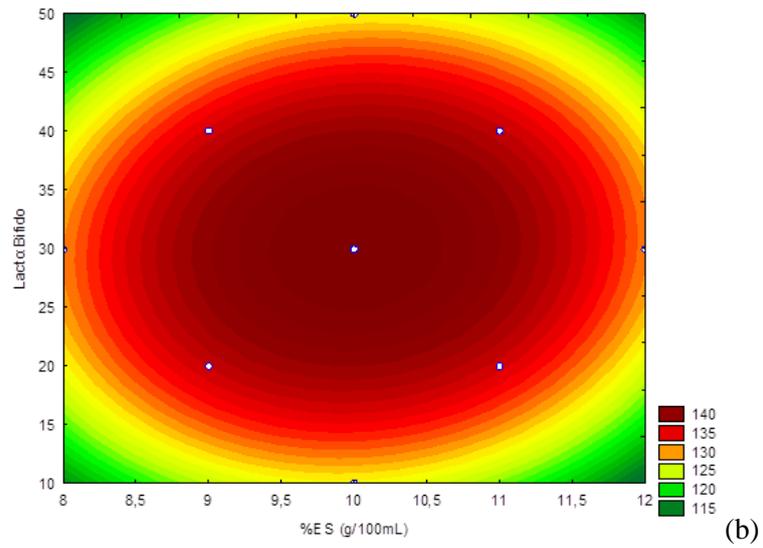
O modelo de regressão codificado obtido para o fator de crescimento total está expresso na Equação 4.

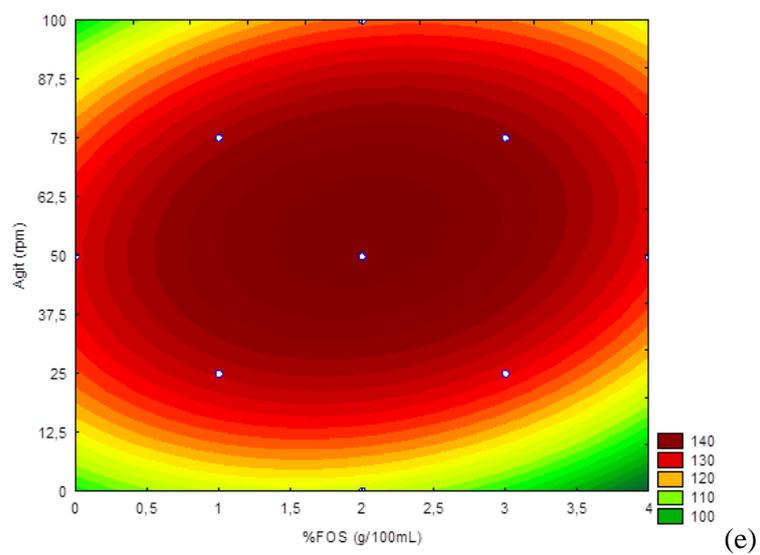
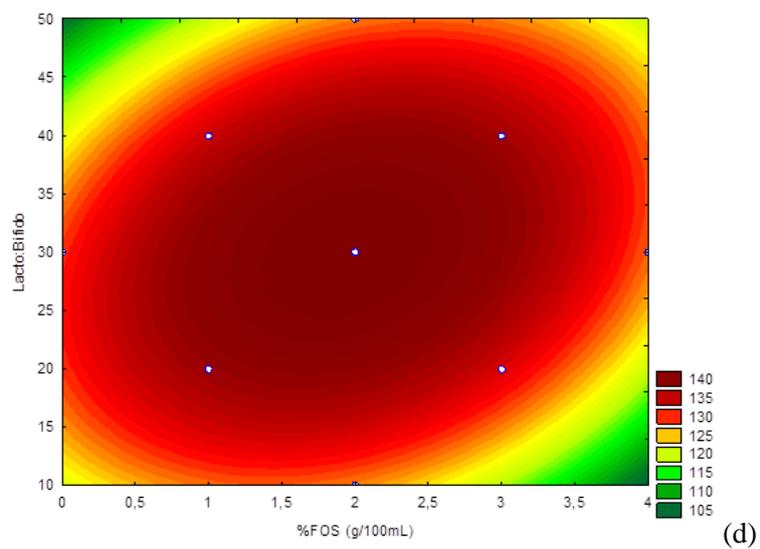
$$\begin{aligned} \%FC_{tot} = & 143,21 + 0,18x_1 - 6,51x_1^2 - 0,80x_2 - 7,29x_2^2 + 0,06x_3 \\ & - 8,25x_3^2 + 5,34x_4 - 12,79x_4^2 - 0,44x_1x_2 + 0,83x_1x_3 \\ & - 0,72x_1x_4 + 3,98x_2x_3 + 3,17x_2x_4 - 2,98x_3x_4 \\ & /4/ \end{aligned}$$

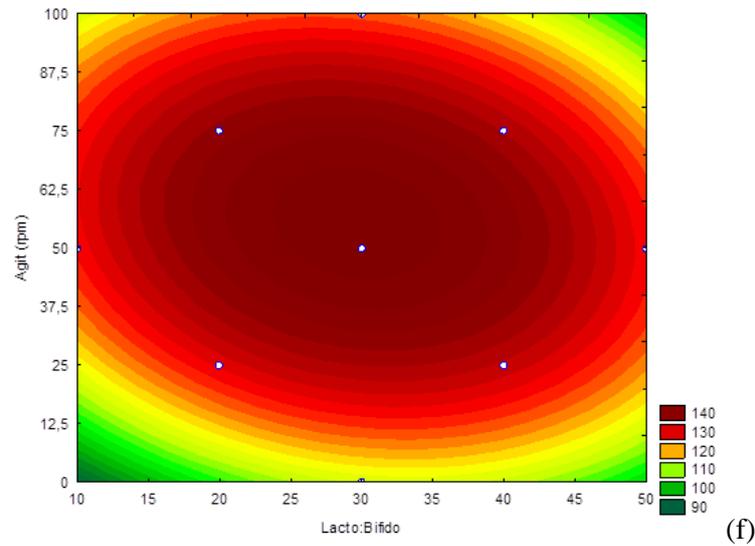
Na Figura 5 são apresentadas curvas de contorno para o fator de crescimento total.

Figura 5. Curvas de contorno para o fator de crescimento total em relação às variáveis (a) %ES e %FOS; (b) %ES e proporção de lactobacilos; (c) %ES e agitação; (d) %FOS e proporção de lactobacilos; (e) %FOS e agitação e (f) proporção de lactobacilos e agitação.









Ao analisar a Figura 5 é possível observar que o ponto central é o ponto ótimo para o fator de crescimento total em relação às variáveis estudadas. Pode-se observar também que nas Figuras 5c, 5e e 5f há um deslocamento da região ótima para valores mais altos de agitação.

Além de uma fonte de carbono, bactérias probióticas são exigentes nutricionalmente. Estudos mostram que meios à base de soja suplementados com 2% (m/v) de FOS aumenta a atividade e o crescimento de *Lactobacillus* spp., assim como também aumentam a viabilidade das culturas probióticas (12).

### Acidez titulável

A análise e determinação de ácidos foi feita através da acidez titulável em ácido láctico do produto final da fermentação. A Tabela 7 apresenta a porcentagem média em ácido láctico para cada tratamento.

Tabela 7. Matriz DCCR com valores codificados e reais e acidez titulável em ácido láctico do produto final da fermentação.

Tratamentos	%ES	%FOS	Lacto:Bifido	Agitação	AT em ácido láctico (%)
1	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	7,13±0,18 <sup>gdefg</sup>
2	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	7,07±0,63 <sup>bcdefg</sup>
3	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	7,31±0,62 <sup>bcdefg</sup>
4	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	7,96±0,95 <sup>efghi</sup>
5	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	7,78±0,41 <sup>efghi</sup>
6	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	9,68±0,37 <sup>hi</sup>
7	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	8,73±0,36 <sup>ghi</sup>
8	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	9,98±0,18 <sup>i</sup>
9	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	4,93±0,21 <sup>abc</sup>
10	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	4,81±0,64 <sup>ab</sup>
11	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	5,35±0,47 <sup>abcd</sup>
12	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	8,49±0,09 <sup>fghi</sup>
13	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	7,43±0,09 <sup>defgh</sup>
14	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	8,20±0,47 <sup>efghi</sup>

<b>15</b>	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	8,20±1,35 <sup>efghi</sup>
<b>16</b>	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	8,79±0,90 <sup>ghi</sup>
<b>17</b>	-2 (8)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	4,75±0,41 <sup>a</sup>
<b>18</b>	+2 (12)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	6,36±0,10 <sup>abcdef</sup>
<b>19</b>	0 (10)	-2 (0)	0 (30)	0 (50)	8,08±0,27 <sup>efghi</sup>
<b>20</b>	0 (10)	+2 (4)	0 (30)	0 (50)	4,75±0,10 <sup>a</sup>
<b>21</b>	0 (10)	0 (2)	-2 (10)	0 (50)	5,05±0,21 <sup>abc</sup>
<b>22</b>	0 (10)	0 (2)	+2 (50)	0 (50)	4,69±0,72 <sup>a</sup>
<b>23</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	-2 (0)	6,95±0,71 <sup>ebcdefg</sup>
<b>24</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	+2 (100)	6,00±0,37 <sup>abcde</sup>
<b>25*</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	8,43±0,82 <sup>fghi</sup>

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Os tratamentos 6, 8 e 16 apresentaram os maiores valores de acidez, 9,68, 9,98 e 8,79%, respectivamente. Esses três tratamentos utilizaram uma proporção de *Lactobacillus* mais alta (40%), associada a uma disponibilidade maior de substrato e devido à concentração mais alta de extrato de soja (11g/100mL), proporcionou uma maior produção de ácido láctico durante a fermentação.

Os menores valores de acidez foram encontrados nos tratamentos 17 (4,75%), 20 (4,75%) e 22 (4,69%), onde foi utilizada uma proporção de *Lactobacillus* de 30% e menores concentrações de extrato de soja, 8g/100mL para o tratamento 17 e 10g/100mL para os tratamentos 20 e 22, esses fatores associados contribuíram para uma menor produção de ácido láctico ao longo do tempo de fermentação.

Mondragón-Bernal et al. (2012) (14), em seus estudos, utilizando extrato de soja fermentado por *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e *Bifidobacterium longum* BL-04, obtiveram uma acidez titulável em ácido láctico de 17,9% em um tempo de fermentação maior (12 horas), com uma proporção de bactérias lácticas e bifidobactérias de 40:60, com 12g/100mL de extrato de soja e sem agitação, o que justifica valores maiores de acidez, quando comparados aos tratamentos que obtiveram maior acidez.

### **Determinação de açúcares redutores (AR) e totais (AT)**

Os resultados do consumo de açúcares redutores e totais em cada tratamento podem ser observados nas Tabelas 8 e 9.

A concentração inicial de açúcares redutores (AR) entre os 25 tratamentos ficou em uma faixa de 3,0 g/L a 20 g/L (Tabela 8), onde o tratamento 8 apresentou a maior concentração com 20,12 g/L e o tratamento 19 a menor concentração de 3,37 g/L, pois no tratamento 19 não foi adicionado FOS. Ao final da fermentação a concentração de AR reduziu entre 1,0 e 12,0 g/L, 1,01 g/L para o tratamento 19 e 11,19 g/L para o tratamento 20.

A concentração inicial de açúcares totais (Tabela 9) apresentou seu maior valor também no tratamento 8 (53,33 g/L) e seu menor valor foi encontrado também no tratamento 19 (13,53 g/L). Os teores de AT reduziram após a fermentação para valores entre 5 e 35 g/L, onde o tratamento 19 apresentou uma concentração de 5,15 g/L e o tratamento 20, 33,68 g/L.

Tabela 8. Cinética de consumo de açúcares redutores (AR).

Tratamentos	Concentração de AR (g/L)					
	Tempo (h)					
	0	2	4	6	8	10
1	11,84±0,01 <sup>cdefg</sup>	8,04±0,01 <sup>bcdefg</sup>	6,29±0,01 <sup>bcde</sup>	4,24±0,01 <sup>abcd</sup>	-	-
2	7,19±0,01 <sup>abcd</sup>	6,54±0,02 <sup>abcde</sup>	5,88±0,02 <sup>abcd</sup>	4,39±0,01 <sup>abcd</sup>	3,90±0,01 <sup>abcd</sup>	-
3	14,66±0,03 <sup>fghi</sup>	13,46±0,01 <sup>ijk</sup>	12,17±0,02 <sup>hijk</sup>	9,59±0,02 <sup>fghij</sup>	9,21±0,02 <sup>ghij</sup>	-
4	13,15±0,03 <sup>efghi</sup>	10,41±0,01 <sup>efghij</sup>	9,53±0,02 <sup>efghij</sup>	7,83±0,01 <sup>defgh</sup>	6,60±0,01 <sup>cdefgh</sup>	-
5	6,61±0,02 <sup>ab</sup>	5,38±0,01 <sup>ab</sup>	4,24±0,02 <sup>ab</sup>	3,41±0,01 <sup>abc</sup>	2,85±0,01 <sup>ab</sup>	-
6	8,03±0,01 <sup>abcd</sup>	5,49±0,02 <sup>ab</sup>	4,77±0,01 <sup>ab</sup>	3,92±0,01 <sup>abc</sup>	3,57±0,01 <sup>abcd</sup>	-
7	13,05±0,02 <sup>efghi</sup>	11,86±0,02 <sup>ghijk</sup>	10,17±0,02 <sup>fghij</sup>	9,51±0,01 <sup>fghij</sup>	8,14±0,02 <sup>efghi</sup>	-
8	20,12±0,01 <sup>j</sup>	15,20±0,01 <sup>k</sup>	10,75±0,01 <sup>ghij</sup>	9,49±0,01 <sup>fghij</sup>	-	-
9	7,09±0,01 <sup>abc</sup>	6,31±0,03 <sup>abcd</sup>	5,78±0,03 <sup>abcd</sup>	4,94±0,04 <sup>abcde</sup>	3,29±0,01 <sup>abc</sup>	-
10	6,66±0,02 <sup>ab</sup>	5,78±0,02 <sup>abc</sup>	5,32±0,01 <sup>abc</sup>	3,96±0,03 <sup>abc</sup>	2,82±0,01 <sup>ab</sup>	-
11	15,75±0,05 <sup>ghij</sup>	14,01±0,04 <sup>ijk</sup>	12,26±0,05 <sup>hijk</sup>	10,58±0,06 <sup>ghijk</sup>	8,64±0,02 <sup>fghi</sup>	-
12	15,21±0,02 <sup>fghij</sup>	13,73±0,05 <sup>ijk</sup>	12,39±0,02 <sup>ijk</sup>	11,77±0,01 <sup>ijk</sup>	10,09±0,02 <sup>hij</sup>	-
13	6,55±0,03 <sup>ab</sup>	5,69±0,04 <sup>abc</sup>	3,92±0,02 <sup>ab</sup>	3,12±0,01 <sup>ab</sup>	2,67±0,01 <sup>ab</sup>	-
14	7,79±0,01 <sup>abcd</sup>	6,87±0,01 <sup>abcde</sup>	4,44±0,01 <sup>ab</sup>	3,73±0,02 <sup>abc</sup>	3,23±0,04 <sup>abc</sup>	-

<b>15</b>	17,30±0,06 <sup>ij</sup>	15,35±0,04 <sup>k</sup>	14,83±0,04 <sup>k</sup>	12,70±0,06 <sup>ik</sup>	10,75±0,05 <sup>ij</sup>	-
<b>16</b>	14,66±0,04 <sup>fghi</sup>	13,01±0,01 <sup>hijk</sup>	12,59±0,01 <sup>jk</sup>	10,91±0,01 <sup>hijk</sup>	7,79±0,03 <sup>efghi</sup>	-
<b>17</b>	8,69±0,04 <sup>bcde</sup>	7,26±0,03 <sup>bcdef</sup>	7,09±0,03 <sup>bcdef</sup>	6,35±0,01 <sup>bcdef</sup>	5,59±0,03 <sup>bcdef</sup>	5,67±0,01 <sup>b</sup>
<b>18</b>	10,90±0,06 <sup>bcdefg</sup>	8,51±0,05 <sup>bcdefg</sup>	7,29±0,03 <sup>bcdef</sup>	6,94±0,03 <sup>bcdefg</sup>	6,77±0,03 <sup>cdefgh</sup>	5,88±0,03 <sup>b</sup>
<b>19</b>	3,37±0,02 <sup>a</sup>	3,22±0,02 <sup>a</sup>	2,71±0,01 <sup>a</sup>	1,92±0,01 <sup>a</sup>	1,04±0,01 <sup>a</sup>	1,01±0,01 <sup>a</sup>
<b>20</b>	16,86±0,03 <sup>hij</sup>	15,20±0,02 <sup>k</sup>	14,36±0,03 <sup>k</sup>	13,47±0,03 <sup>k</sup>	12,39±0,01 <sup>j</sup>	11,19±0,01 <sup>c</sup>
<b>21</b>	10,64±0,03 <sup>bcdef</sup>	9,94±0,03 <sup>defghi</sup>	9,10±0,02 <sup>defghi</sup>	8,51±0,01 <sup>efghi</sup>	7,79±0,01 <sup>efghi</sup>	6,80±0,02 <sup>b</sup>
<b>22</b>	10,82±0,03 <sup>bcdefg</sup>	9,40±0,01 <sup>cdefgh</sup>	8,89±0,02 <sup>defgh</sup>	7,13±0,02 <sup>cdefgh</sup>	5,78±0,06 <sup>bcdefg</sup>	-
<b>23</b>	12,07±0,03 <sup>defgh</sup>	11,02±0,04 <sup>fghij</sup>	10,32±0,05 <sup>fghij</sup>	9,62±0,06 <sup>fghij</sup>	8,67±0,06 <sup>fghi</sup>	-
<b>24</b>	13,66±0,09 <sup>fghi</sup>	10,79±0,01 <sup>fghij</sup>	9,60±0,01 <sup>efghij</sup>	8,44±0,01 <sup>efghi</sup>	6,97±0,03 <sup>defgh</sup>	-
<b>25*</b>	11,63±0,08 <sup>cdefg</sup>	8,86±0,18 <sup>bcdefg</sup>	8,46±0,15 <sup>cdefg</sup>	6,33±0,04 <sup>bcdef</sup>	4,71±0,05 <sup>bcde</sup>	-

---

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Tabela 9. Cinética de consumo de açúcares totais (AT).

Tratamentos	Concentração de AT (g/L)					
	Tempo (h)					
	0	2	4	6	8	10
1	52,77±0,01 <sup>k</sup>	30,84±0,01 <sup>fg hij</sup>	22,68±0,01 <sup>bcde</sup>	22,59±0,01 <sup>defg</sup>	-	-
2	23,12±0,02 <sup>abcde</sup>	20,06±0,02 <sup>abcdef</sup>	18,81±0,02 <sup>abcde</sup>	16,59±0,02 <sup>abcde</sup>	12,93±0,02 <sup>abcdef</sup>	-
3	37,87±0,06 <sup>fg hij</sup>	35,93±0,04 <sup>defghi</sup>	34,15±0,06 <sup>fg hij</sup>	30,34±0,04 <sup>ghijk</sup>	26,37±0,02 <sup>hij</sup>	-
4	31,99±0,02 <sup>cdefgh</sup>	29,96±0,02 <sup>efghi</sup>	26,43±0,03 <sup>cdefghi</sup>	24,77±0,01 <sup>efghij</sup>	23,74±0,01 <sup>ghij</sup>	-
5	16,56±0,01 <sup>ab</sup>	14,12±0,01 <sup>ab</sup>	10,64±0,01 <sup>a</sup>	10,50±0,01 <sup>ab</sup>	8,96±0,01 <sup>ab</sup>	-
6	20,81±0,07 <sup>abc</sup>	16,87±0,05 <sup>abc</sup>	15,28±0,05 <sup>abc</sup>	12,50±0,05 <sup>abc</sup>	9,14±0,01 <sup>abc</sup>	-
7	33,43±0,04 <sup>cdefgh</sup>	30,87±0,01 <sup>fg hij</sup>	27,43±0,04 <sup>defghi</sup>	23,43±0,03 <sup>efghi</sup>	21,84±0,03 <sup>fg hij</sup>	-
8	53,33±0,01 <sup>k</sup>	48,36±0,01 <sup>l</sup>	45,08±0,01 <sup>j</sup>	34,12±0,01 <sup>jk</sup>	-	-
9	21,74±0,02 <sup>abcd</sup>	18,71±0,05 <sup>abcde</sup>	17,15±0,04 <sup>abcd</sup>	13,37±0,04 <sup>abcd</sup>	11,09±0,04 <sup>abcd</sup>	-
10	27,81±0,01 <sup>abcdefg</sup>	23,06±0,01 <sup>bcdefg</sup>	20,09±0,02 <sup>abcde</sup>	17,87±0,02 <sup>abcde</sup>	14,46±0,01 <sup>abcdefg</sup>	-
11	47,33±0,06 <sup>hijk</sup>	41,77±0,06 <sup>ijkl</sup>	35,52±0,04 <sup>ghij</sup>	30,77±0,03 <sup>ghijk</sup>	28,43±0,04 <sup>ijk</sup>	-
12	48,80±0,04 <sup>ijk</sup>	41,30±0,02 <sup>ijkl</sup>	37,15±0,06 <sup>ij</sup>	32,08±0,03 <sup>hijk</sup>	28,40±0,05 <sup>ijk</sup>	-
13	23,20±0,02 <sup>abcde</sup>	18,34±0,03 <sup>abcd</sup>	14,87±0,05 <sup>ab</sup>	10,96±0,02 <sup>ab</sup>	8,71±0,01 <sup>ab</sup>	-
14	24,49±0,02 <sup>abcdef</sup>	19,78±0,03 <sup>abcdef</sup>	17,09±0,01 <sup>abcd</sup>	15,90±0,01 <sup>abcde</sup>	12,43±0,02 <sup>abcde</sup>	-

<b>15</b>	40,96±0,06 <sup>ghijk</sup>	37,43±0,02 <sup>hijkl</sup>	35,38±0,03 <sup>ghij</sup>	32,52±0,05 <sup>ijk</sup>	30,46±0,08 <sup>jk</sup>	-
<b>16</b>	47,18±0,03 <sup>hijk</sup>	44,08±0,01 <sup>kl</sup>	36,80±0,07 <sup>hij</sup>	32,71±0,07 <sup>ijk</sup>	19,78±0,03 <sup>defghi</sup>	-
<b>17</b>	32,52±0,03 <sup>cdefg</sup>	28,06±0,06 <sup>cdefgh</sup>	22,46±0,02 <sup>bcde</sup>	19,90±0,03 <sup>bcdef</sup>	18,30±0,05 <sup>cdefgh</sup>	16,06±0,06 <sup>b</sup>
<b>18</b>	32,30±0,03 <sup>cdefg</sup>	25,56±0,01 <sup>bcdefg</sup>	24,65±0,01 <sup>bcdefg</sup>	23,31±0,01 <sup>efghi</sup>	21,53±0,01 <sup>efghij</sup>	19,71±0,01 <sup>b</sup>
<b>19</b>	13,53±0,01 <sup>a</sup>	10,56±0,02 <sup>a</sup>	10,00±0,02 <sup>a</sup>	8,56±0,02 <sup>a</sup>	7,09±0,01 <sup>a</sup>	5,15±0,03 <sup>a</sup>
<b>20</b>	51,49±0,12 <sup>jk</sup>	46,61±0,06 <sup>l</sup>	41,68±0,03 <sup>j</sup>	39,46±0,01 <sup>k</sup>	37,09±0,04 <sup>k</sup>	33,68±0,05 <sup>c</sup>
<b>21</b>	35,27±0,05 <sup>defghi</sup>	30,71±0,04 <sup>fghij</sup>	29,90±0,04 <sup>efghi</sup>	27,71±0,01 <sup>fghij</sup>	26,90±0,01 <sup>hij</sup>	24,49±0,03 <sup>ab</sup>
<b>22</b>	33,55±0,10 <sup>cdefgh</sup>	30,23±0,01 <sup>efghij</sup>	23,71±0,05 <sup>bcdef</sup>	22,74±0,05 <sup>defgh</sup>	18,84±0,04 <sup>defgh</sup>	-
<b>23</b>	36,46±0,09 <sup>efghi</sup>	30,12±0,05 <sup>ghijk</sup>	24,06±0,03 <sup>bcdef</sup>	18,04±0,01 <sup>bcde</sup>	16,65±0,06 <sup>bcdefg</sup>	-
<b>24</b>	28,81±0,01 <sup>bcdefg</sup>	27,52±0,02 <sup>cdefgh</sup>	25,74±0,02 <sup>bcdefgh</sup>	24,43±0,02 <sup>efghi</sup>	20,93±0,05 <sup>efghi</sup>	-
<b>25*</b>	30,80±0,25 <sup>bcdefg</sup>	29,34±0,16 <sup>defgh</sup>	26,06±0,25 <sup>bcdefghi</sup>	21,43±0,11 <sup>cdefg</sup>	15,03±0,11 <sup>abcdefg</sup>	-

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

O consumo de açúcares redutores (AR) de todos os tratamentos durante a fermentação variou, aproximadamente, entre 30 e 70%, sendo que o tratamento 23 apresentou menor consumo de AR (28,16%) e o tratamento 19 o maior consumo de AR (70,13%). Em relação ao consumo de açúcares totais, essa taxa variou aproximadamente de 25 a 60%, onde os tratamentos 4 e 15 tiveram um menor consumo de AT de 25,78 e 25,63%, respectivamente. A taxa de maior consumo de AT (62,43%) correspondeu ao tratamento 13.

Na Tabela 10 são mostrados os coeficientes de regressão para o consumo de açúcares redutores (%ConsAR) e consumo de açúcares totais (%ConsAT) e, em negrito são demonstrados os parâmetros significativos.

Tabela 10. Coeficientes de regressão e p-valor associados para consumo de açúcares redutores e totais.

	%ConsAR		%ConsAT	
	Regressão	P-valor	Regressão	P-valor
<b>Média/ Interação</b>	59,53	0,000	53,47	0,000
<b>X<sub>1</sub>(L)</b>	2,59	0,438	-0,77	0,843
<b>X<sub>1</sub>(Q)</b>	-7,41	0,051	-3,92	0,358
<b>X<sub>2</sub>(L)</b>	<b>-15,23</b>	<b>0,0005</b>	<b>-14,51</b>	<b>0,002</b>
<b>X<sub>2</sub>(Q)</b>	-1,66	0,637	-2,19	0,601
<b>X<sub>3</sub>(L)</b>	3,30	0,328	4,87	0,231
<b>X<sub>3</sub>(Q)</b>	-6,92	0,067	-7,71	0,084
<b>X<sub>4</sub>(L)</b>	2,86	0,394	-0,83	0,833
<b>X<sub>4</sub>(Q)</b>	<b>-8,32</b>	<b>0,032</b>	-5,90	0,175
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	5,22	0,213	6,02	0,227
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	4,33	0,296	5,96	0,232
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,85	0,832	3,28	0,501
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	0,07	0,984	0,14	0,976
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	-2,63	0,519	4,14	0,398
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	0,82	0,839	0,17	0,971
<b>R<sup>2</sup></b>	0,75		0,67	

X<sub>1</sub>: extrato de soja; X<sub>2</sub>: frutooligossacarídeo; X<sub>3</sub>: proporção de lactobacilos; X<sub>4</sub>: agitação; L: termo linear; Q: termo quadrático.

Pelos resultados apresentados na Tabela 10, a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), o termo linear do teor de FOS apresentou efeito significativo negativo sobre o consumo de açúcares redutores e consumo de açúcares totais, o que significa que com o aumento da concentração de FOS, há uma diminuição no consumo de AR e AT. O termo quadrático da agitação teve efeito significativo negativo apenas no consumo de AR. As análises de variância para os modelos de regressão foram feitas e são apresentadas na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Análise de variância para consumo de açúcares redutores e totais.

%ConsAR						
FV	SQ	gL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab (5%)</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	2377,07	14	169,79	2,69	2,64	0,04
<b>Erro</b>	756,58	12	63,04			
<b>Total</b>	3133,65	26				
R <sup>2</sup> =0,75						
%ConsAT						
FV	SQ	gL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab (5%)</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	2211,74	14	157,98	1,75	2,64	0,16
<b>Erro</b>	1078,02	12	89,83			
<b>Total</b>	3289,77	26				
R <sup>2</sup> =0,67						

SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

Observa-se na Tabela 11, que somente o modelo de regressão para consumo de açúcares redutores é significativo pelo Teste F, sendo que o  $F_{calc} > F_{tab}$ , além de apresentar o p-valor baixo. O bom ajuste do modelo foi também verificado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), acima de 0,70. (17).

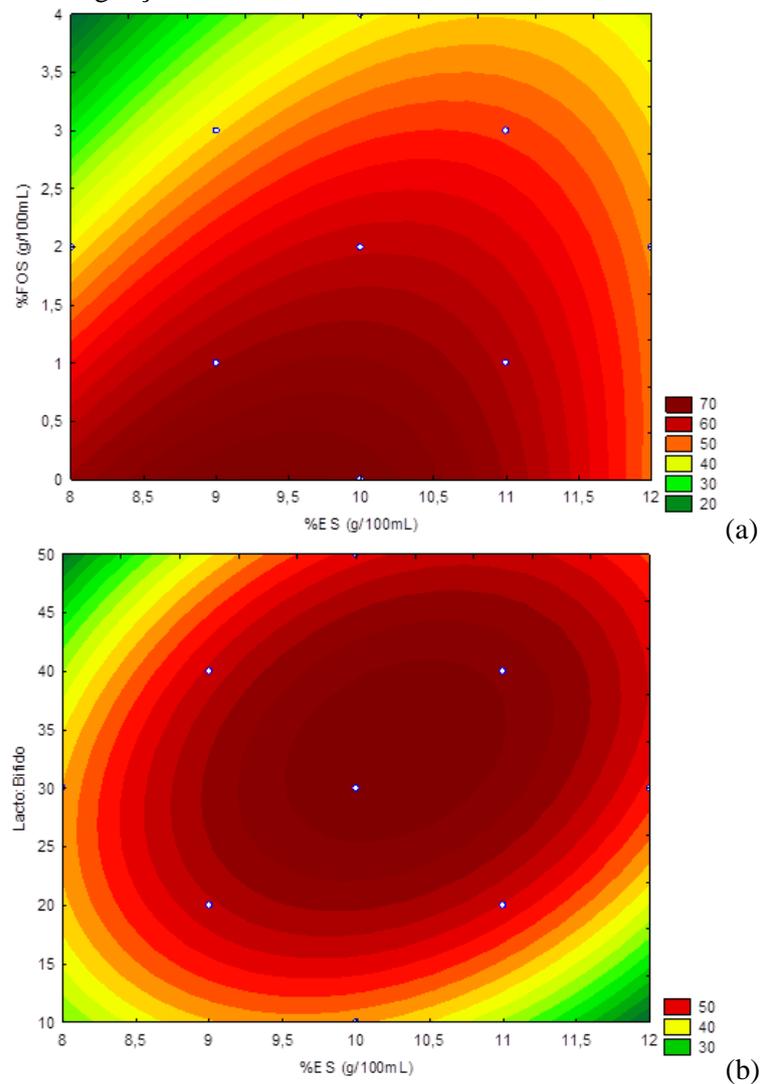
O modelo de regressão codificado obtido para o consumo de açúcares redutores (%ConsAR) está expresso na Equação 5.

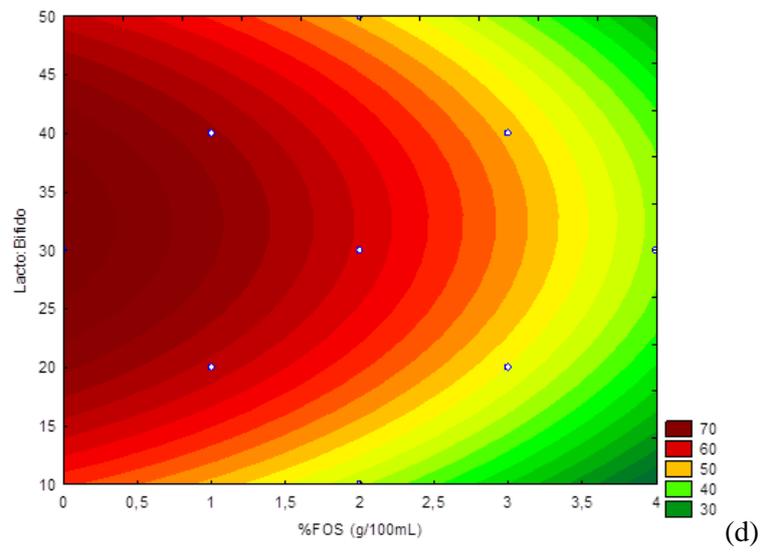
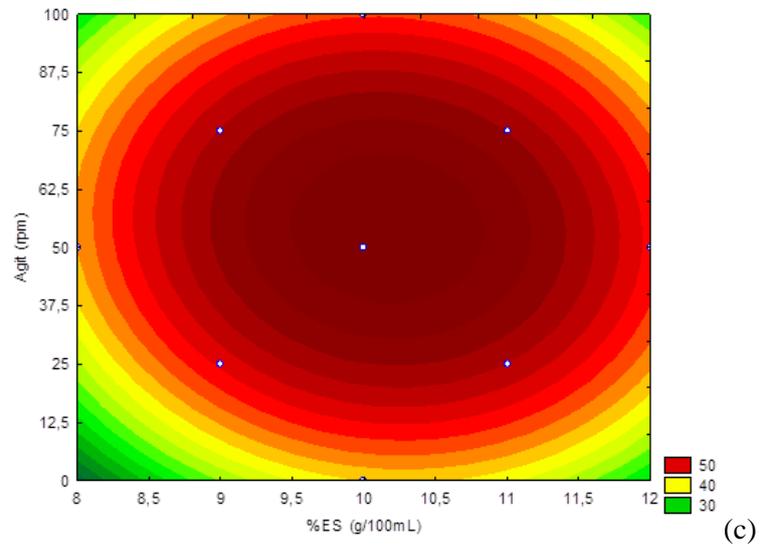
$$\begin{aligned} \%ConsAR = & 59,53 + 2,59x_1 - 7,41x_1^2 - 15,23x_2 - 1,66x_2^2 + 3,30x_3 \\ & - 6,92x_3^2 + 2,86x_4 - 8,32x_4^2 + 5,22x_1x_2 + 4,33x_1x_3 \\ & - 0,85x_1x_4 + 0,07x_2x_3 - 2,63x_2x_4 + 0,82x_3x_4 \end{aligned}$$

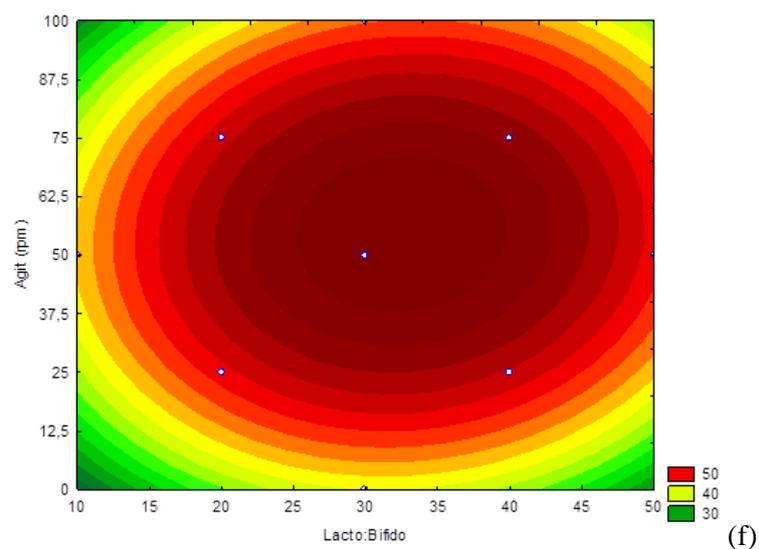
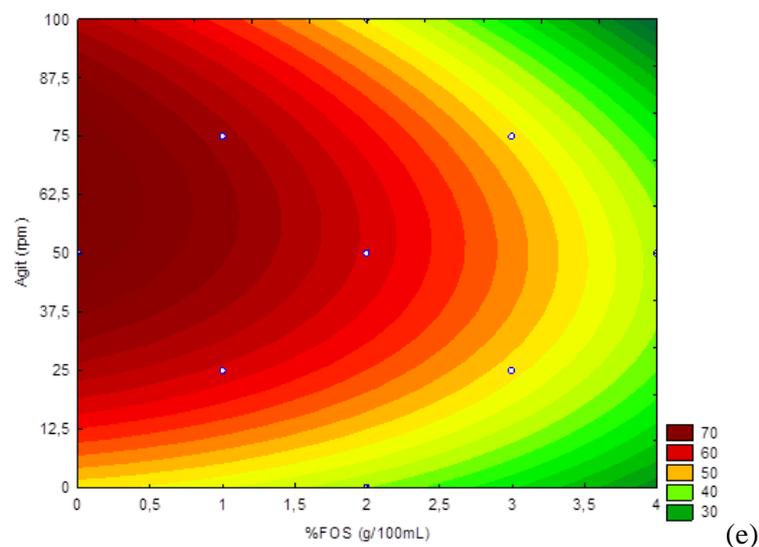
/5/

A Figura 6 apresenta as curvas de contorno para o consumo de açúcares redutores.

Figura 6. Curvas de contorno para o consumo de açúcares redutores em relação às variáveis (a) %ES e %FOS; (b) %ES e proporção de lactobacilos; (c) %ES e agitação; (d) %FOS e proporção de lactobacilos; (e) %FOS e agitação e (f) proporção de lactobacilos e agitação.







Ao analisar as Figuras 6a, 6d e 6e observa-se que a região de maior consumo de açúcares redutores encontra-se em valores de menor concentração de FOS.

Isso se deve ao fato de que ao haver menos FOS disponível para o metabolismo das bactérias probióticas, estas irão consumir os açúcares presentes no extrato de soja, reduzindo assim, a concentração final de açúcares redutores, já que bactérias do gênero *Bifidobacterium* ssp. apresentam atividade  $\alpha$ -galactosidase e hidrolisam a rafinose e a estaquiose.

Hou et al. (2000) (27), utilizando um preparado de soja, mostrou que as concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose diminuem durante a fermentação por *B. infantis* e *B. longum*. No meio de cultivo com 10% de extrato de soja, após 48 horas de fermentação com *B. infantis*, a concentração de sacarose caiu de 14,41 mmol/L para 11,91 mmol/L e 13,88 com *B. longum*. A concentração inicial de rafinose reduziu de 1,38 mmol/L para 0,84 mmol/L com *B. infantis* e 0,97 mmol/L com *B. longum*. A redução de estaquiose também ocorreu durante a fermentação com *B. infantis* e *B. longum*, a concentração inicial de 5,88 mmol/L diminuiu para uma concentração final de 2,07 mmol/L e 2,90 mmol/L, respectivamente.

Nas Figuras 6b, 6c e 6f é possível constatar que o consumo de açúcares redutores é maior na região do ponto central em relação às variáveis porcentagem de extrato de soja, proporção de lactobacilos e agitação.

### **Determinação de exopolissacarídeos (EPS) e Sinérese**

Na Tabela 12 são apresentados os valores de concentração inicial e final (g/L), a produção de exopolissacarídeos (EPS) de cada tratamento e a porcentagem de sinérese que o produto final sofreu.

A quantificação de EPS mostrou que alguns tratamentos (T4, T6, T10, T13, T16, T17 e T22) não apresentaram produção de exopolissacarídeos. O tratamento 11 apresentou a maior produção de EPS (2,67 g/L) com uma concentração inicial de 1,41 g/L e concentração final de 4,08 g/L. Mondragón-Bernal et al. (2012) (14) obtiveram concentrações de EPS de até 3,7 g/L em um meio de soja com 12% de sacarose inoculado com *L. rhamnosus* LR-32 e mix de probióticos.

A quantidade de EPS é resultado de fatores ambientais e condições operacionais, como composição do meio, particularmente aminoácidos, vitaminas e sais minerais, como o  $Mg^{2+}$ , pH e temperatura (29). Além disso,

a quantificação de EPS produzido sofre muita interferência devido às interações com as proteínas da soja e com o FOS adicionado (14).

Em um estudo de Li et al. (2014) (28), utilizando um meio de soja, adicionado de 4% de sacarose e inoculado com 4% (v/v) de *L. rhamnosus*, após 12 horas de fermentação à 37°C, sem agitação, observou-se a produção de 0,64 g/L de exopolissacarídeos, com uma contagem de células viáveis menor de, aproximadamente,  $10^7$  UFC/mL. Além disso, notou-se a capacidade desses compostos de estabilizar suspensões, quando comparada ao controle que não apresentou capacidade de retenção de água (CRA) e o meio com *L. rhamnosus* que apresentou 76,55% de CRA.

Os EPS são os principais componentes dos biofilmes, que possuem propriedades importantes, como a alteração da densidade e capacidade de retenção de água. O aumento da concentração de EPS também aumenta os valores de viscosidade aparente do meio (28).

No meio de soja, a produção de exopolissacarídeos está relacionada ao fortalecimento do gel proteico, o qual é um equilíbrio entre o efeito desnaturante da acidificação nas proteínas, a atividade das enzimas proteolíticas (pH ótimo em torno de 4,5), e o rearranjo dos peptídeos através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e dissulfeto (12).

Tabela 12. Matriz DCCR com variáveis codificadas e reais e variáveis respostas concentrações iniciais e finais, produção de exopolissacarídeos e a sinérese para cada tratamento.

Tratamentos	%ES	%FOS	Lacto:Bifido	Agitação	Concentração de EPS (g/L)		Prod. de EPS (g/L)	%Sinérese
					Tempo inicial	Tempo final		
<b>1</b>	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	1,72	2,55	0,84	43,33±2,88
<b>2</b>	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	-1 (25)	2,11	2,47	0,35	0,00±0,01
<b>3</b>	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	2,01	2,17	0,16	0,00±0,01
<b>4</b>	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	-1 (25)	2,24	1,61	0,00	3,33±0,50
<b>5</b>	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	1,01	1,07	0,06	40,05±8,78
<b>6</b>	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (25)	1,27	0,95	0,00	44,63±2,63
<b>7</b>	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	1,77	2,93	1,15	41,50±2,79
<b>8</b>	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	-1 (25)	2,14	2,81	0,68	42,61±2,50
<b>9</b>	-1 (9)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	0,99	1,10	0,11	6,34±2,74
<b>10</b>	+1 (11)	-1 (1)	-1 (20)	+1 (75)	1,09	1,08	0,00	5,10±0,50
<b>11</b>	-1 (9)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	1,41	4,08	2,67	17,69±5,30
<b>12</b>	+1 (11)	+1 (3)	-1 (20)	+1 (75)	2,12	2,99	0,87	20,00±1,99
<b>13</b>	-1 (9)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	0,95	0,67	0,00	21,66±5,77

<b>14</b>	+1 (11)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (75)	1,21	1,44	0,23	18,33±2,88
<b>15</b>	-1 (9)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	1,99	2,14	0,15	16,66±5,77
<b>16</b>	+1 (11)	+1 (3)	+1 (40)	+1 (75)	2,12	1,33	0,00	19,68±0,54
<b>17</b>	-2 (8)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	0,94	0,90	0,00	18,33±1,25
<b>18</b>	+2 (12)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	1,73	1,91	0,18	17,87±3,67
<b>19</b>	0 (10)	-2 (0)	0 (30)	0 (50)	1,05	1,18	0,13	21,62±1,96
<b>20</b>	0 (10)	+2 (4)	0 (30)	0 (50)	1,99	3,04	1,05	0,00±0,01
<b>21</b>	0 (10)	0 (2)	-2 (10)	0 (50)	1,94	2,20	0,26	0,00±0,01
<b>22</b>	0 (10)	0 (2)	+2 (50)	0 (50)	1,04	0,52	0,00	1,00±0,01

<b>23</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	-2 (0)	1,84	2,31	0,47	0,00±0,05
<b>24</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	+2 (100)	0,77	2,58	1,81	19,22±5,68
<b>25*</b>	0 (10)	0 (2)	0 (30)	0 (50)	1,49±0,06	3,40±0,49	1,91	21,50±2,12

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27)

A Tabela 13 mostra os coeficientes de regressão para a produção de exopolissacarídeos (EPS) e, em negrito são demonstrados os parâmetros significativos.

Tabela 13. Coeficientes de regressão e p-valor associados para produção de exopolissacarídeos (EPS).

	Produção de EPS	
	Regressão	p-valor
<b>Média/ Interação</b>	1,91	0,000
<b>X<sub>1</sub>(L)</b>	-0,22	0,399
<b>X<sub>1</sub>(Q)</b>	<b>-0,92</b>	<b>0,004</b>
<b>X<sub>2</sub>(L)</b>	0,49	0,075
<b>X<sub>2</sub>(Q)</b>	<b>-0,67</b>	<b>0,027</b>
<b>X<sub>3</sub>(L)</b>	-0,26	0,308
<b>X<sub>3</sub>(Q)</b>	<b>-0,90</b>	<b>0,005</b>
<b>X<sub>4</sub>(L)</b>	0,28	0,277
<b>X<sub>4</sub>(Q)</b>	-0,39	0,165
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	-0,27	0,399
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	0,26	0,415
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,07	0,803
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	-0,08	0,778
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	0,32	0,315
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,47	0,152
<b>R<sup>2</sup></b>	0,71	

X<sub>1</sub>: extrato de soja; X<sub>2</sub>: frutooligossacarídeo; X<sub>3</sub>: proporção de lactobacilos; X<sub>4</sub>: agitação; L: termo linear; Q: termo quadrático.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), os termos quadráticos de teor de extrato de soja, teor de FOS e proporção de lactobacilos apresentaram efeito significativo negativo sobre a produção de EPS. As análises de variância para o modelo de regressão foram feitas e apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de variância para produção de exopolissacarídeos (EPS).

Produção de EPS						
<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>gL</b>	<b>QM</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab (5%)</sub></b>	<b>p-valor</b>
<b>Regressão</b>	11,67	14	0,83	2,16	2,64	0,09
<b>Erro</b>	4,62	12	0,38			
<b>Total</b>	16,30	26				
<b>R<sup>2</sup>=0,71</b>						

SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

Observa-se na Tabela 14, que o modelo de regressão para os dados de produção de EPS não é significativo pelo Teste F, já que o  $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ , apesar de apresentar o p-valor baixo e o valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,70, considerado satisfatório para confirmar a significância do modelo (17).

A porcentagem de sinérese entre os 25 tratamentos apresentou uma grande variação, entre 0 e 45%. Os tratamentos 2, 3, 20, 21 e 23 não sofreram sinérese (0%). E o tratamento 6 teve a maior taxa de sinérese (44,63%).

No mesmo estudo em que Li et al. (2014) (28) utilizaram a soja, mostrou-se que o produto fermentado com *L. rhamnosus* obteve um valor de 76,55% de capacidade de retenção de água. Segundo os autores, as diferenças nos valores de CRA, de 0% para o controle e 76,55% para o meio com *L. rhamnosus*, podem ser atribuídas à variação da quantidade de EPS, 0,02 g/L e 0,64 g/L, respectivamente, o que justifica valores tão discrepantes de porcentagem de sinérese (0 e 45%, pois, o aumento da capacidade de retenção de água está associado à prevenção da sinérese (30). A quantidade destes presentes no produto final são resultado de fatores ambientais e de condições operacionais (29).

Na Tabela 15 estão os coeficientes de regressão para porcentagem de sinérese.

Tabela 15. Coeficientes de regressão e p-valor associados para porcentagem de sinérese.

	%Sinérese	
	Regressão	p-valor
<b>Média/ Interação</b>	21,46	0,025
<b>X<sub>1</sub>(L)</b>	-2,76	0,651
<b>X<sub>1</sub>(Q)</b>	2,03	0,753
<b>X<sub>2</sub>(L)</b>	-4,97	0,421
<b>X<sub>2</sub>(Q)</b>	-1,53	0,812
<b>X<sub>3</sub>(L)</b>	12,48	0,058
<b>X<sub>3</sub>(Q)</b>	-6,71	0,309
<b>X<sub>4</sub>(L)</b>	-4,16	0,498
<b>X<sub>4</sub>(Q)</b>	-1,41	0,827
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	6,83	0,368
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	5,33	0,479
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	5,39	0,474
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	0,99	0,893
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	8,93	0,245
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	-12,92	0,102
<b>R<sup>2</sup></b>	0,53	

X<sub>1</sub>: extrato de soja; X<sub>2</sub>: frutooligossacarídeo; X<sub>3</sub>: proporção de lactobacilos; X<sub>4</sub>: agitação; L: termo linear; Q: termo quadrático.

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que nenhuma variável teve efeito significativo na porcentagem de sinérese a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). As análises de variância para o modelo de regressão foram feitas e apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Análise de variância para porcentagem de sinérese.

	%Sinérese						
	FV	SQ	gL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab (5%)</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>		2990,88	14	213,63	1,00	2,64	0,50
<b>Erro</b>		2562,68	12	213,55			
<b>Total</b>		5553,56	26				
R <sup>2</sup> =0,53							

SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

Pela análise de variância (Tabela 16) observa-se que o modelo de regressão para os dados de porcentagem de sinérese não é significativo pelo Teste F, já que o  $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ , e pelo valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ser menor que 0,70, considerado o valor mínimo satisfatório para confirmar a significância do modelo (17).

### **Validação do modelo**

Para a validação dos modelos para fator de crescimento total e consumo de açúcares redutores, foram conduzidos 2 experimentos em triplicata, na região de maior fator de crescimento celular e de maior consumo de açúcares redutores. Na Tabela 17 são apresentados os valores codificados e reais (entre parêntesis), das variáveis estudadas na região de maior crescimento total e de consumo de açúcares redutores, bem como as respostas experimentais, preditas e erro relativo.

Tabela 17. Variáveis codificadas e reais (entre parêntesis) para validação do modelo, valores experimentais e preditos e erro relativo.

<b>%FCtot</b>							
<b>Tratamentos</b>	<b>%ES</b>	<b>%FOS</b>	<b>Lact:Bifd</b>	<b>Agit.</b>	<b>%FCtot experimental</b>	<b>%FCtot predito</b>	<b>%Erro relativo</b>
1	0(10)	-1(1)	0(30)	0(50)	138,16	136,71	1,04
2	0(10)	-0,5 (1,5)	0(30)	0(50)	137,87	141,78	-2,83
<b>%ConsAR</b>							
<b>Tratamentos</b>	<b>%ES</b>	<b>%FOS</b>	<b>Lact:Bifd</b>	<b>Agit.</b>	<b>%ConsAR experimental</b>	<b>%ConsAR predito</b>	<b>%Erro relativo</b>
1	0(10)	-1(1)	0(30)	0(50)	45,27	42,64	5,87
2	0(10)	-0,5 (1,5)	0(30)	0(50)	46,45	51,49	-10,96

Pode-se observar, na Tabela 17, que os erros relativos para o fator de crescimento total e consumo de açúcares redutores foram baixos, isto indica que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios em relação às variáveis respostas, estando os modelos, validados.

### **Propriedades reológicas**

Os dados reológicos dos tratamentos foram descritos adequadamente pelo modelo Lei de Newton (T1, T5, T6, T7, T8, T12, T24, T25, T26 e T27), pelo modelo Lei da Potência (T11, T13, T14, T15, T16, T17, T18 e T19) e pelo modelo Herschel-Bulkley (T2, T3, T4, T9, T10, T20, T21, T22 e T23). Conforme apresentado nas Tabelas 18, 19 e 20, os parâmetros reológicos determinados segundo cada modelo utilizado foram: I) viscosidade ( $\mu$ ) por meio da Lei de Newton; II) índice de consistência ( $K$ ) e índice de comportamento do fluido ( $n$ ) através da Lei da Potência; e III) índice de consistência ( $K$ ), índice de comportamento do fluido ( $n$ ), tensão inicial ( $\tau$ ) obtidos pelo modelo Herschel-Bulkley, respectivamente. Com referência aos ajustes dos pontos experimentais, pode-se afirmar que os modelos estudados foram adequados, uma vez que apresentaram os bons valores de  $R^2$  (coeficiente de determinação) e de RSME (quadrado médio do resíduo).

Tabela 18. Parâmetro reológico obtido para os diferentes tratamentos por meio da Lei de Newton.

Tratamentos	Lei de Newton		
	$\mu$	R <sup>2</sup>	RMSE
1	0,003678 <sup>ab</sup> ± 0,000077	0,9954	0,0212
5	0,003656 <sup>ab</sup> ± 0,000038	0,9987	0,0116
6	0,003091 <sup>a</sup> ± 0,000042	0,9981	0,0122
7	0,003301 <sup>ab</sup> ± 0,000030	0,9986	0,0111
8	0,003833 <sup>b</sup> ± 0,000046	0,9980	0,0152
12	0,005451 <sup>c</sup> ± 0,000007	0,9836	0,0582
24	0,008108 <sup>e</sup> ± 0,000025	0,9869	0,0752
25	0,006260 <sup>d</sup> ± 0,000308	0,9904	0,0508
26	0,006426 <sup>d</sup> ± 0,000073	0,9844	0,0657
27	0,006117 <sup>d</sup> ± 0,000512	0,9966	0,0309

$\mu$  = viscosidade (Pa.s); R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; RMSE = quadrado médio do resíduo; Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Tabela 19. Parâmetros reológicos obtidos para os diferentes tratamentos por meio da Lei da Potência.

Tratamentos	Lei da Potência			
	$K$	$n$	R <sup>2</sup>	RMSE
11	0,039284 <sup>bc</sup> ± 0,000164	0,752713 <sup>c</sup> ± 0,002687	0,9937	0,0611
13	0,032306 <sup>ab</sup> ± 0,005883	0,745179 <sup>c</sup> ± 0,028820	0,9815	0,0809
14	0,044016 <sup>c</sup> ± 0,000559	0,722548 <sup>bc</sup> ± 0,002109	0,9936	0,0593
15	0,061816 <sup>d</sup> ± 0,002573	0,682944 <sup>b</sup> ± 0,011482	0,9925	0,0680
16	0,027008 <sup>a</sup> ± 0,001286	0,805516 <sup>d</sup> ± 0,009176	0,9970	0,0403
17	0,093850 <sup>e</sup> ± 0,009948	0,627827 <sup>a</sup> ± 0,018880	0,9900	0,0852
18	0,042358 <sup>bc</sup> ± 0,001472	0,758073 <sup>c</sup> ± 0,003009	0,9971	0,0470
19	0,041412 <sup>bc</sup> ± 0,002330	0,727198 <sup>c</sup> ± 0,007754	0,9941	0,0534

$K$  = índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>);  $n$  = índice de comportamento do fluido (adimensional); R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; RMSE = quadrado médio do resíduo; Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

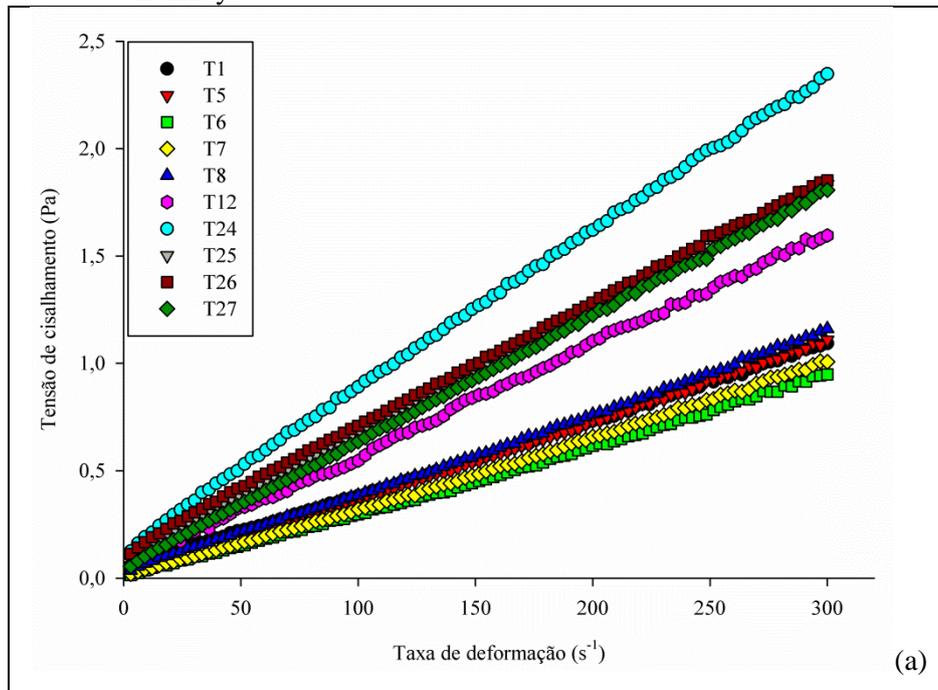
Tabela 20. Parâmetros reológicos obtidos para os diferentes tratamentos por meio do modelo Herschel-Bulkley.

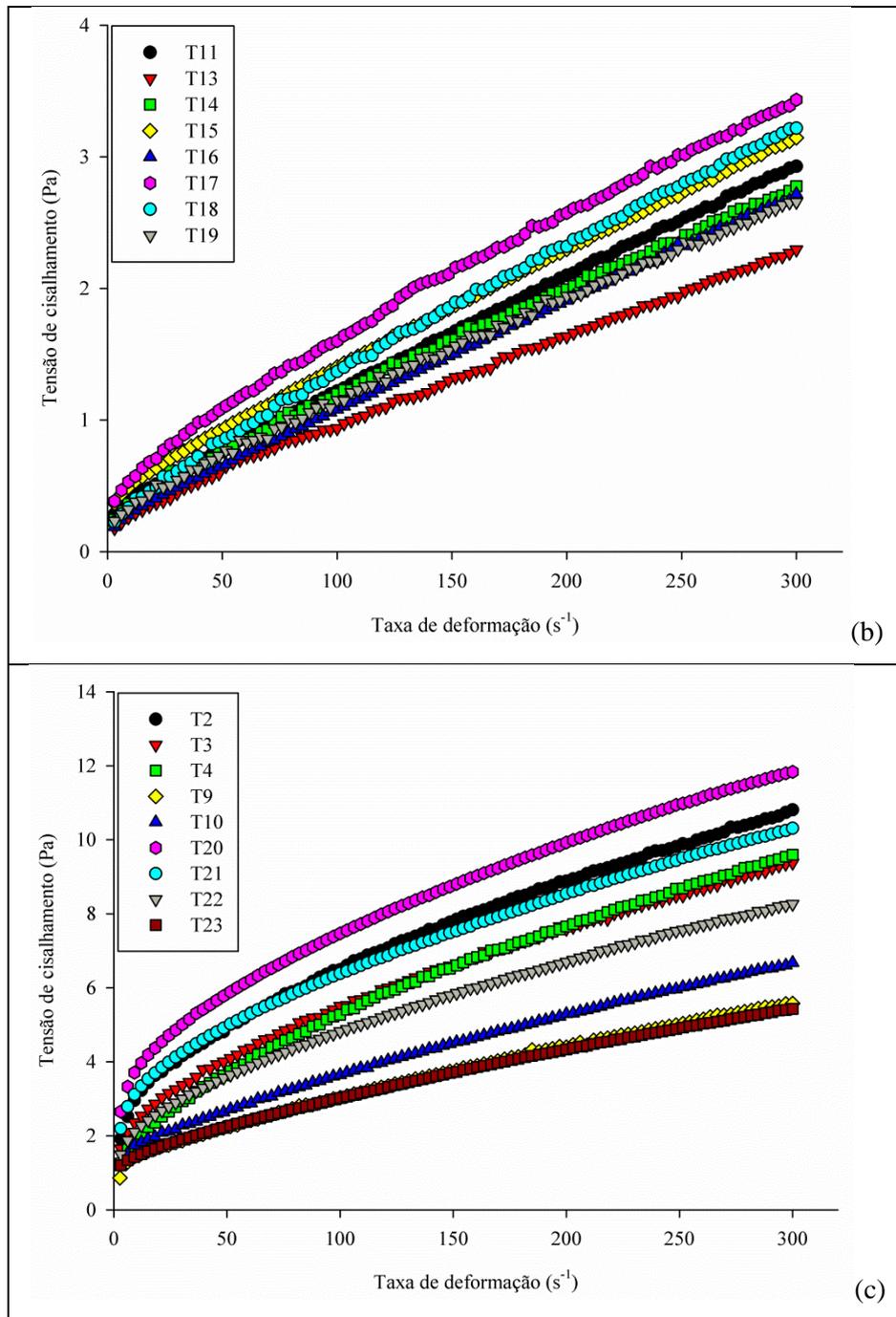
Tratamentos	Modelo Herschel-Bulkley				
	$K$	$n$	$\tau$	$R^2$	RMSE
<b>2</b>	0,391161 <sup>de</sup> ± 0,113422	0,556142 <sup>a</sup> ± 0,081945	1,527577 <sup>c</sup> ± 0,023008	0,9914	0,2192
<b>3</b>	0,272409 <sup>cd</sup> ± 0,206271	0,594477 <sup>a</sup> ± 0,041912	1,302913 <sup>bc</sup> ± 0,014780	0,9844	0,2687
<b>4</b>	0,282276 <sup>cd</sup> ± 0,130066	0,708004 <sup>a</sup> ± 0,079776	0,748972 <sup>a</sup> ± 0,193011	0,9872	0,2698
<b>9</b>	0,070477 <sup>a</sup> ± 0,083230	0,734085 <sup>a</sup> ± 0,012715	1,001887 <sup>ab</sup> ± 0,024126	0,9966	0,0759
<b>10</b>	0,081906 <sup>ab</sup> ± 0,017687	0,731810 <sup>a</sup> ± 0,004683	1,227921 <sup>bc</sup> ± 0,011306	0,9989	0,0496
<b>20</b>	0,415400 <sup>e</sup> ± 0,057457	0,550875 <sup>a</sup> ± 0,017607	2,240046 <sup>d</sup> ± 0,006644	0,9995	0,0538
<b>21</b>	0,320594 <sup>cde</sup> ± 0,003933	0,571798 <sup>a</sup> ± 0,038101	1,943615 <sup>d</sup> ± 0,014445	0,9999	0,0663
<b>22</b>	0,207520 <sup>bc</sup> ± 0,054632	0,617189 <sup>a</sup> ± 0,019843	1,275822 <sup>bc</sup> ± 0,012617	0,9996	0,0388
<b>23</b>	0,066727 <sup>a</sup> ± 0,102687	0,733977 <sup>a</sup> ± 0,007920	1,077294 <sup>b</sup> ± 0,009432	0,9996	0,0240

$K$  = índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>);  $n$  = índice de comportamento do fluido (adimensional);  $\tau$  = tensão inicial (Pa);  $R^2$  = coeficiente de determinação; RMSE = quadrado médio do resíduo; Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

A Figura 7 demonstra a variação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação aplicada, descrita pelo modelo de Newton (Figura 7a), pelo modelo Lei da Potência (Figura 7b) e pelo modelo Herschel-Bulkley (Figura 7c).

Figura 7. Efeito da taxa de deformação sobre a tensão de cisalhamento à temperatura de 25°C dos diferentes tratamentos, descrito pelo modelo: (a) Lei de Newton; (b) Lei da Potência; e (c) Herschel-Bulkley.



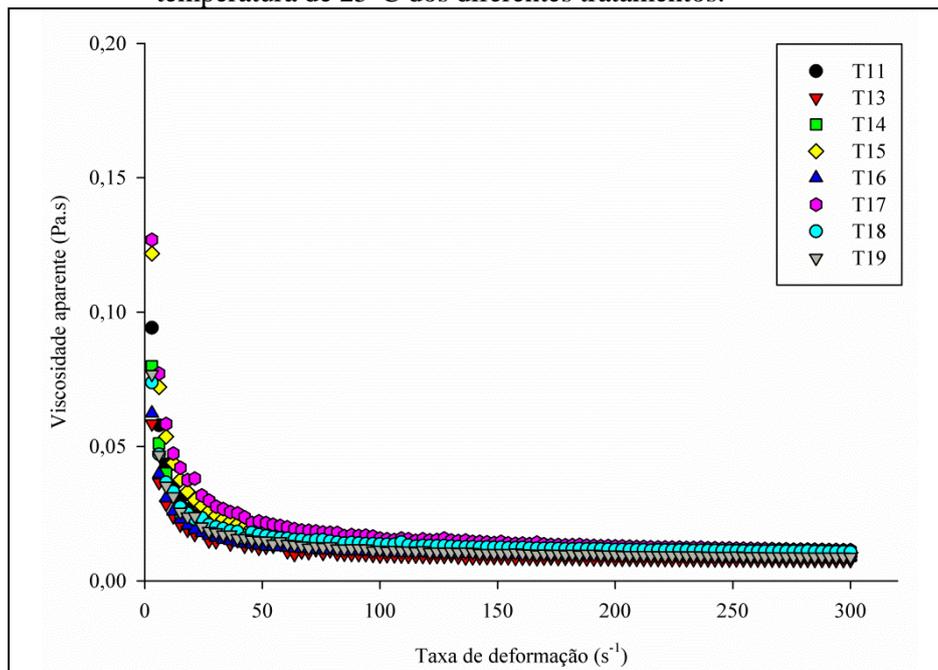


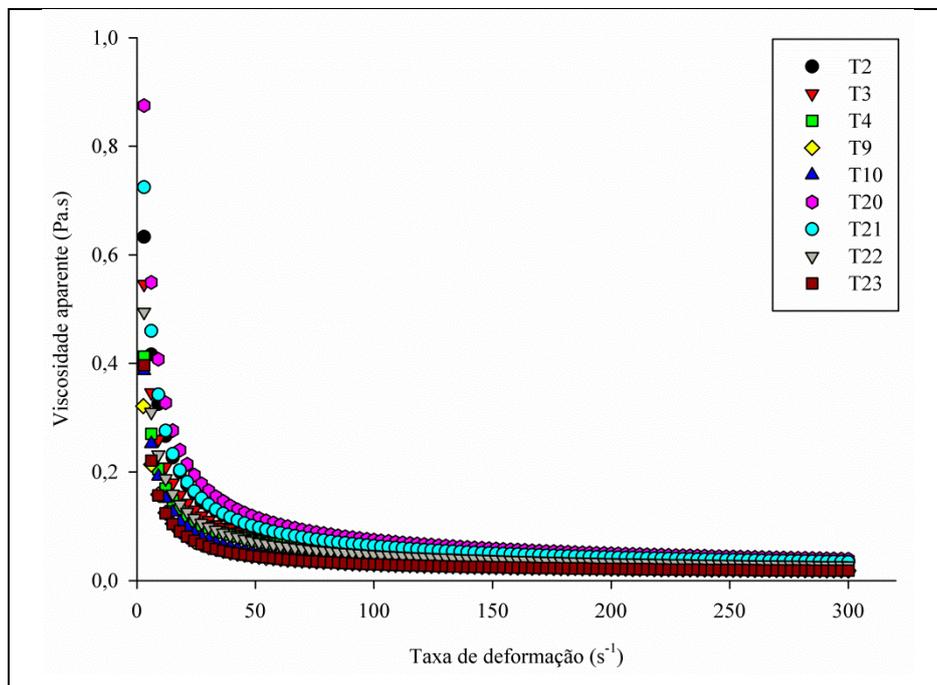
No reograma 7a, pode-se observar que os tratamentos apresentaram relação de tensão de cisalhamento e taxa de deformação próxima à linear, ou

seja, comportamento tipicamente newtoniano. Já o comportamento reológico apresentado pelos reogramas 7b e 7c é típico de fluidos não newtonianos, uma vez que se encontra evidente a diminuição da inclinação das curvas com o aumento da taxa de deformação. Para confirmar a pseudoplasticidade destas amostras, pode-se observar na Tabela 17 que o índice de comportamento de fluxo ( $n$ ) apresentou valores menores que uma unidade.

A Figura 8 representa o comportamento da viscosidade aparente dos tratamentos que apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, os quais apresentaram decréscimo nos valores da viscosidade em função do aumento da taxa de deformação.

Figura 8. Efeito da taxa de deformação sobre a viscosidade aparente à temperatura de 25°C dos diferentes tratamentos.





Espírito-Santo et al. (2015) (12), mostraram que em meio de soja a viscosidade aparente aumenta significativamente como resultado da fermentação. Em seus estudos, observaram também, que os menores valores de  $\eta_{ap}$  foram obtidos nos meios de soja fermentados por *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *B. lactis*. Nas fermentações utilizando *L. casei* e *B. lactis* o meio de soja fermentado apresentou a maior área tixotrópica, o que aponta que essas bactérias produziram exopolissacarídeos que estabilizaram a rede de gel de proteína ou promoveu menos proteólise. E os menores valores de  $\eta_{ap}$  dos meios de soja fermentados por *L. acidophilus* e *B. lactis* podem ser atribuídos a uma atividade proteolítica mais extensa por esses microrganismos em pH próximos a 4,5.

No seu estudo Li et al. (2014) (28), utilizando meio de soja, adicionado de 4% de sacarose e inoculado com 4% (v/v) de *L. rhamnosus*, também observaram que a viscosidade dos produtos fermentados de soja diminuiu acentuadamente com o aumento da taxa de deformação, o que indica que esses produtos são fluidos pseudoplásticos. A baixa viscosidade

desses produtos pode ser explicada pela boa dispersão da água nos espaços da estrutura de rede homogênea. À medida que a taxa de deformação aumenta, a capacidade do gel para reter água diminui adversamente.

Os resultados obtidos mostram que os tratamentos T1, T5, T6, T7, T8, T12, T24, T25, T26 e T27 podem ser classificados como fluidos Newtonianos, com uma viscosidade muito baixa, assemelhando-se aos 'leites fermentados' encontrados no mercado. Os tratamentos T11, T13, T14, T15, T16, T17, T18 e T19 são fluidos pseudoplásticos e os tratamentos T2, T3, T4, T9, T10, T20, T21, T22 e T23 classificam-se como fluidos Herschel-Bulkley. Os tratamentos que tiveram comportamento não-Newtoniano, apesar de terem apresentado baixa viscosidade aparente, se assemelham ao comportamento dos iogurtes lácteos do mercado.

As análises reológicas permitem a classificação do produto desenvolvido e sua avaliação para que atenda aos interesses dos consumidores e tenha uma aceitação sensorial positiva.

## CONCLUSÃO

O extrato de soja mostrou-se um substrato adequado para a produção de um produto simbiótico, com fontes de carbono, que se tornam acessíveis às bactérias do ácido láctico quando utilizado em simbiose com bactérias do gênero *Bifidobacterium*.

A relação de simbiose pode ser comprovada pelos tratamentos que utilizaram uma proporção de 30% de *Lactobacillus* totais em relação à bifidobactéria, obtendo um fator de crescimento total de aproximadamente 145%.

O consumo de açúcares também mostra que o inóculo, com uma proporção de 30 a 40% de bactérias lácticas, é adequado para o processo fermentativo, pois em tratamentos utilizando-se essa proporção, o consumo de açúcares redutores foi de 70,13% e de 62,43% para açúcares totais, respectivamente.

A adição do frutooligossacarídeo – FOS também melhora o processo fermentativo e o produto final, diminuindo o tempo de fermentação em até 6 horas, o que se torna um ponto de interesse para a indústria. O produto final apresenta características de textura que possam vir a ter uma aceitação maior por parte dos consumidores, uma vez que tem valores de viscosidade semelhantes às de iogurtes.

Nos tratamentos onde se adicionou FOS em concentrações mais altas como 3g/100mL e 2g/100mL, a produção de exopolissacarídeos foi maior (2,67 g/L e 1,91 g/L, respectivamente) e, portanto, o produto final sofreu menos sinérese, as taxas foram de 17,69% para o tratamento com maior produção de EPS (2,67 g/L) e 21,50% para o tratamento com 1,91 g/L de EPS.

Baixas taxas de sinérese são importantes para a qualidade final do produto, assim como o comportamento reológico também é responsável pela aceitação sensorial do consumidor. Os tratamentos apresentaram diferentes comportamentos reológicos, os quais classificam-se como fluidos

Newtonianos, fluidos pseudoplásticos e fluidos Herschel-Bulkley, com isso, o produto pode ser desenvolvido para obter o tipo de fluido que atenda à aceitação sensorial do consumidor, de acordo com o que é desejado e está disponível no mercado, como leite fermentado ou iogurte.

O produto desenvolvido apresentou características importantes que atendem às legislações vigentes e as demandas de mercado, o DCCR foi uma ferramenta eficaz para obter esses resultados, já que possibilitou conhecer as melhores condições de fermentação e quais variáveis são significativas ou não para o processo.

## REFERÊNCIAS

1. Food Processing. Probiotic Market Propagates. Estados Unidos, 2012. Disponível em: <http://www.foodprocessing.com/articles/2012/probiotic-market-propagates/>
2. Food Processing. Probiotics Showing Growth in the Food and Beverage Market. Estados Unidos, 2014. Disponível em: <http://www.foodprocessing.com/articles/2014/probiotics-showing-growth/>
3. FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. 2001.
4. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde” Resolução nº18. Brasil, 2008.
5. Presti I, D’orazio G, Labra M, La Ferla B, Mezzasalma V, Bizzaro G, Giardina S, Michelotti A, Tursi F, Vassalo M, Di Genaro P. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015;99:5613-5626.
6. Moon JS, Shin SY, Choi HS, Joo W, Cho SK, Li L, Kang JH, Kim TJ, Han NS. In vitro digestion and fermentation properties of linear sugar-beetarabinan and its oligosaccharides. Carbohydrate Polymers. 2015;131:50-56.

7. Morris C, Morris GA. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. *Food Chemistry*. 2012;133:237-248.
8. Mishra S, Mishra HN. Effect of Synbiotic Interaction of Fructooligosaccharide and Probiotics on the Acidification Profile, Textural and Rheological Characteristics of Fermented Soy Milk. *Food Bioprocess Technology*. 2012;6:3166-3176.
9. Pandey SM, Mishra HN. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;62:458-467.
10. Food Processing. Formulation Trends for 2017. Estados Unidos, 2016. Disponível em: <http://www.foodprocessing.com/articles/2017/formulation-trends/?start=0>
11. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento: Levantamentos de Safras. Brasil, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>.
12. Espírito-Santo AP, Mouquet-Rivier C, Humblot C, Cazevielle C, Icard-Vernière C, Soccol CR, Guyot JP. Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. *Food Research International*. 2014;57:104-113.

13. Olmos AR, Bru E, Garro MS. Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;196:16-23.
14. Mondragón-Bernal OL, Maugeri FF, Alves JGLF, Rodrigues MI. Synbiotic Soy Beverages: Principles and Sensory Attributes. In: Hui YH, Evranuz EÖ. (Org.) *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. Flórida: CRC Press; 2012. pp. 103-130.
15. Souza ERN, Tebaldi, VMR, Piccoli, RH. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. *Rev Bras PI Med*. 2015;17:528-533.
16. Doleyres Y, Paquin C, Leroy M, Lacroix C. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;60:168-173.
17. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. São Paulo:Editora Cárita; 2014.
18. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Zenebon O, Pascuet NS, Tiglea P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31:3:426-428.
20. Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Barro N, Ouattara AS, Traeré AS. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid

bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*. 2004;3:3:189-194.

21. Goh KT, Haisman DR., Archer RH, Singh H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Research International*. 2005;38:605–613.

22. Grattepanche F, Audet P, Lacroix C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*. 2007;17:2:123-132.

23. Bourn M. *Food Texture and Viscosity*. Massachusetts: Academic Press; 2002.

24. Matias NS, Bedani R, Castro IA, Saad SMI. A probiotic soy-based innovative product as an alternative to petit-suisse cheese. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;59:411-417.

25. Evangelista SR, Ghiselli G, Maugeri F. Development of a soy-based synbiotic beverage. *Food and Nutrition Sciences*. 2012;3:1128-1135.

26. Farnworth ER, Mainville I, Desjardins MP, Gardner N, Fliss I, Champagne C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;116:174-181.

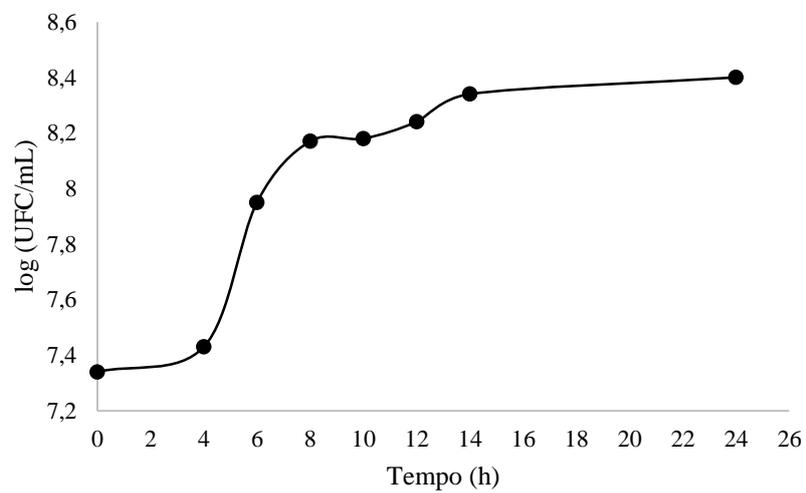
27. Hou JW, Yu RC, Chou CC. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International*. 2000;33:393–397.

28. Li C, Li W, Chen X, Feng M, Rui X, Jiang M, Dong M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;57:477-485.
29. Liang Z, Li W, Yang S, Du P. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere*. 2010;81:626-632.
30. Robert N F. Dossiê Técnico – Fabricação de Iogurtes. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/>

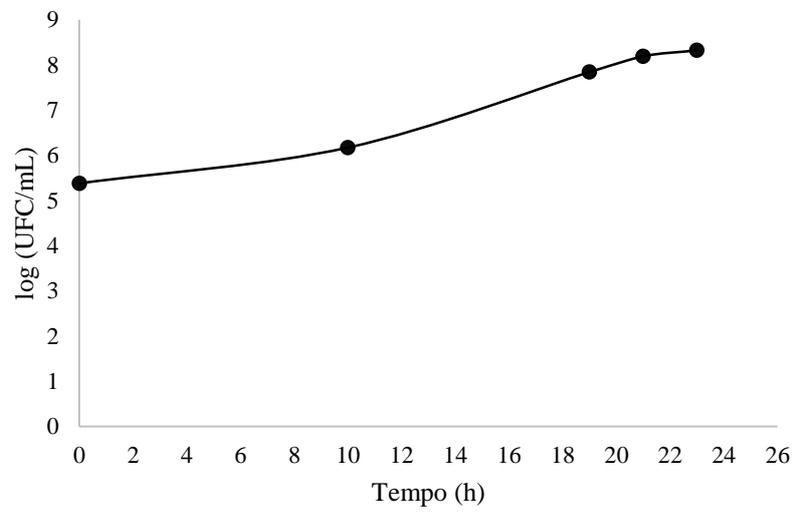
**APÊNDICES****APÊNDICE A**

A Figura 9 apresenta a curva de crescimento para as cepas de *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e *Lactobacillus rhamnosus* LR-32.

Figura 9. Curva de crescimento (a) *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e (b) *Lactobacillus rhamnosus* LR-32.



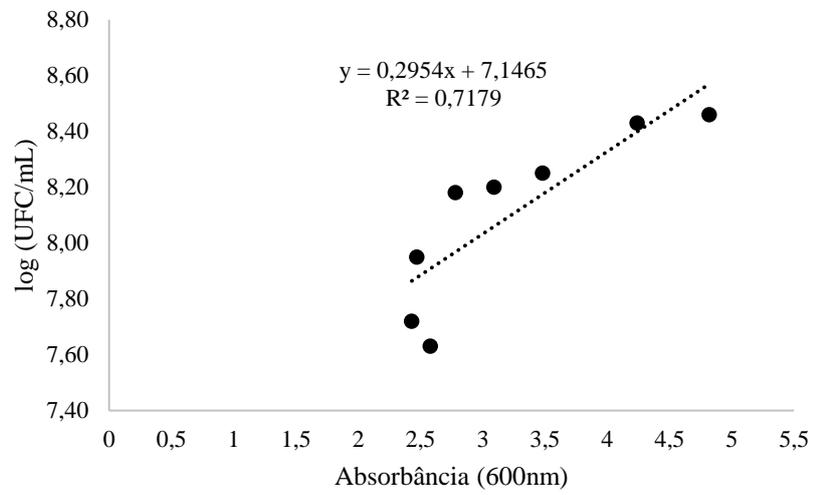
(a)



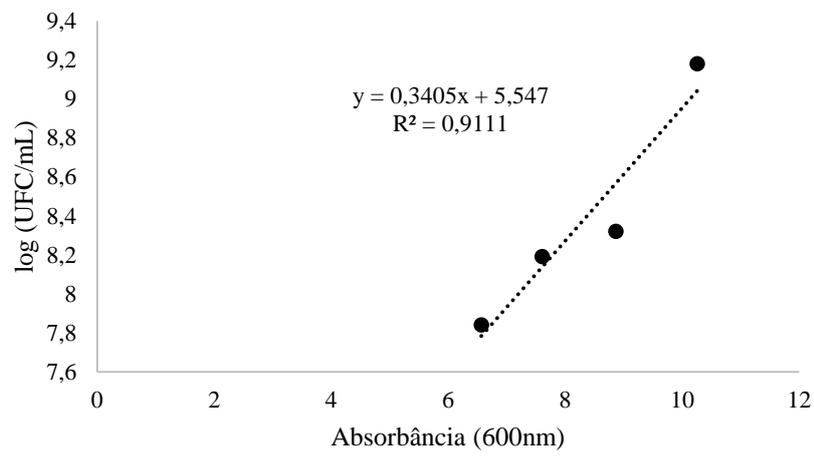
(b)

A partir dos dados obtidos pelas curvas de crescimento, foram construídos os gráficos que mostram a correlação entre absorbância e a contagem de células viáveis (Figura 10).

Figura 10. Correlação entre absorbância e viabilidade celular de (a) *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e (b) *Lactobacillus rhamnosus* LR-32.



(a)



(b)

## APÊNDICE B

A Tabela 21 apresenta a cinética de redução do pH durante o tempo de fermentação para os 25 tratamentos.

Tabela 21. Valores médios de pH durante os 25 tratamentos.

Tratamentos	Tempo (h)					
	0	2	4	6	8	10
1	5,63±	5,40±	5,01±	4,48±	-	-
	0,09	0,14	0,04	0,10	-	-
2	6,63±	6,26±	5,91±	4,89±	4,39±	-
	0,04	0,01	0,10	0,09	0,05	-
3	6,29±	6,23±	5,69±	4,72±	4,25±	-
	0,01	0,04	0,16	0,08	0,05	-
4	6,30±	6,25±	5,48±	4,61±	4,12±	-
	0,02	0,03	0,16	0,10	0,04	-
5	6,33±	6,21±	5,44±	4,50±	4,14±	-
	0,09	0,01	0,14	0,06	0,06	-
6	6,32±	6,12±	5,16±	4,38±	4,09±	-
	0,04	0,01	0,11	0,08	0,05	-
7	6,25±	5,90±	4,72±	4,23±	4,02±	-
	0,01	0,11	0,07	0,01	0,02	-
8	5,53±	5,44±	4,89±	4,24±	-	-
	0,23	0,17	0,03	0,04	-	-
9	6,39±	6,17±	6,00±	5,49±	4,58±	-
	0,02	0,03	0,04	0,03	0,05	-
10	6,43±	6,18±	6,05±	5,50±	4,69±	-
	0,04	0,01	0,02	0,07	0,08	-
11	6,33±	6,28±	6,06±	5,37±	4,60±	-
	0,01	0,02	0,02	0,11	0,05	-
12	6,36±	6,23±	5,46±	4,57±	4,23±	-
	0,07	0,05	0,09	0,05	0,01	-
13	6,17±	5,94±	4,80±	4,34±	4,14±	-
	0,02	0,04	0,05	0,04	0,05	-
14	6,19±	6,00±	5,08±	4,34±	4,16±	-
	0,02	0,03	0,61	0,06	0,06	-
15	6,27±	6,18±	5,64±	4,70±	4,19±	-

	0,18	0,20	0,43	0,33	0,16	
16	6,31±	6,28±	5,74±	4,72±	4,23±	-
	0,01	0,04	0,20	0,14	0,09	
17	6,42±	6,35±	6,20±	5,61±	5,06±	4,66±
	0,01	0,02	0,04	0,11	0,08	0,03
18	6,42±	6,40±	6,27±	5,83±	5,17±	4,71±
	0,02	0,01	0,05	0,13	0,06	0,02
19	6,39±	6,37±	6,12±	5,52±	4,92±	4,61±
	0,02	0,02	0,08	0,11	0,10	0,15
20	6,45±	6,41±	6,25±	5,80±	4,99±	4,38±
	0,03	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05
21	6,42±	6,34±	6,26±	5,94±	5,23±	4,73±
	0,05	0,02	0,04	0,04	0,03	0,05
22	6,30±	6,24±	5,91±	5,19±	4,76±	-
	0,02	0,02	0,04	0,09	0,04	
23	6,21±	6,04±	5,73±	5,30±	4,67±	-
	0,08	0,23	0,35	0,31	0,12	
24	6,18±	6,00±	5,51±	5,17±	4,75±	-
	0,09	0,15	0,19	0,16	0,10	
25*	6,45±	6,28±	5,67±	4,68±	4,12±	-
	0,02	0,09	0,14	0,09	0,03	

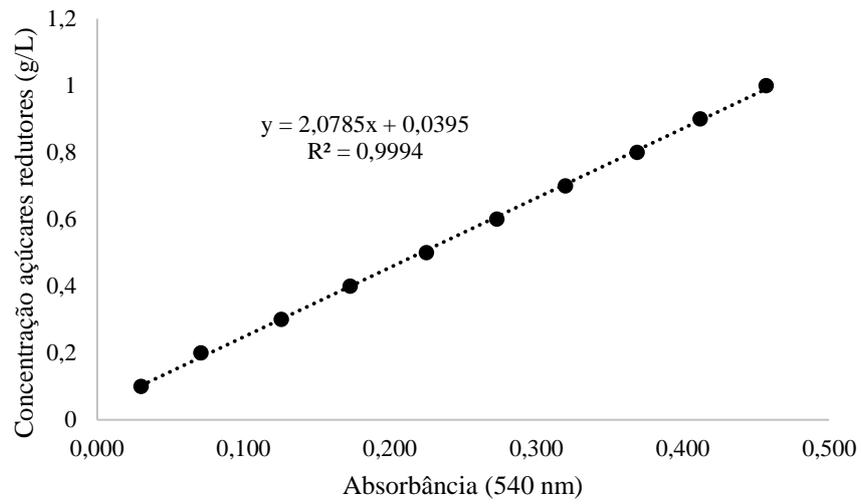
---

\*Média do ponto central (tratamentos 25, 26 e 27).

## APÊNDICE C

A Figura 11 mostra a curva padrão de glicose utilizada na determinação de açúcares redutores (AR).

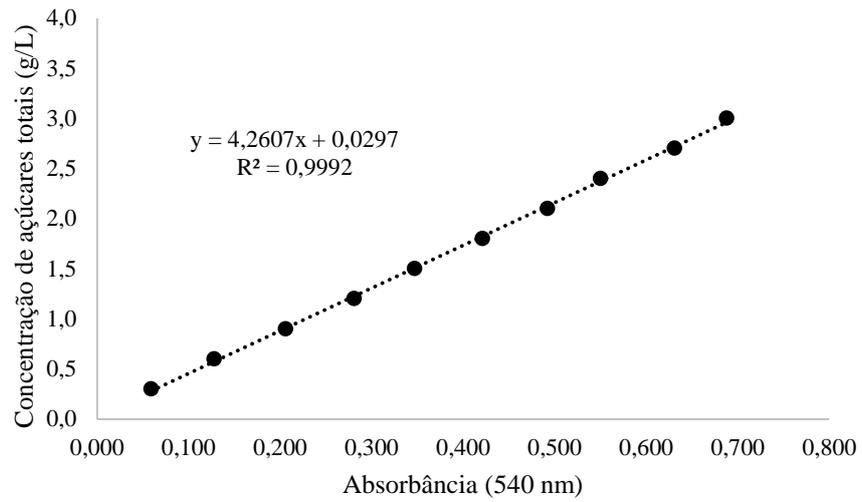
Figura 11. Curva padrão de glicose para determinação de AR.



**APÊNDICE D**

A Figura 12 mostra a curva padrão de sacarose utilizada na determinação de açúcares totais (AT).

Figura 12. Curva padrão de glicose para determinação de AT.



## APÊNDICE E

A Figura 13 apresenta a curva padrão de dextrana 9300Da utilizada na determinação de exopolissacarídeos (EPS).

Figura 13. Curva padrão de dextrana 9300Da para determinação de EPS.

