



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**OTIMIZAÇÃO EM PROCESSO FERMENTATIVO POR  
BACTÉRIAS LÁTICAS E DESENVOLVIMENTO DE MOLHO  
CREMOSO DE SOJA PROBIÓTICO**

---

Londrina  
2016

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**OTIMIZAÇÃO EM PROCESSO FERMENTATIVO POR  
BACTÉRIAS LÁTICAS E DESENVOLVIMENTO DE MOLHO  
CREMOSO DE SOJA PROBIÓTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moraes Filho, Marsilvio de Lima.

Otimização em processo fermentativo por bactérias lácticas e desenvolvimento de molho cremoso de soja probiótico / Marsilvio de Lima Moraes Filho. - Londrina, 2016.

149 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Produtos - Tese. 2. Alimentos fermentados - Tese. 3. Isoflavonas - Tese. 4. Molhos - Tese. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**OTIMIZAÇÃO EM PROCESSO FERMENTATIVO POR BACTÉRIAS  
LÁTICAS E DESENVOLVIMENTO DE MOLHO CREMOSO DE SOJA  
PROBIÓTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Grasielle Scaramal Madrona  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Marta Toledo Benassi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Neide Kiyoko Kondo Kamizake  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 23 de setembro de 2016.

*Agradeço primeiramente à Deus, por ter me concedido o privilégio de conquistar todos os meus sonhos, tendo sempre ao meu lado pessoas que me amam e torcem pelo meu sucesso. Aos meus pais, Marsilvio e Ednubia, por não medirem esforços para que seus filhos pudessem sonhar.*

*À minha querida irmã Rebeca e Avó Maria do Socorro, por me escutarem, por me fazer rir e por sentir orgulho de mim.*

*Aos amigos e familiares. Muito obrigado!*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

*À professora Dr<sup>a</sup> Sandra Garcia pela paciência e ensinamentos demonstrados ao longo da realização deste trabalho.*

*À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de aprendizado.*

*À chefia e coordenação do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e colaboração.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária, pela concessão de bolsa de estudo.*

*À doutoranda e amiga Marli Busanello por todo carinho, amizade, auxílio, força, determinação e alegria, tornando os meus dias mais alegres.*

*As Hermanas que a vida me presenteou Karla Guergoletto, Alessandra Bosso, Maria Thereza, Naiara Ramos, Suzana Tiemi e Fernanda Farinazzo, onde eu for sempre levarei vocês comigo.*

*As amigas Sabrina Penteado, Bruna Auriema, Talita Kato, Natália Bom pela amizade e ajuda.*

*Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Neusa C. dos Santos, Sandra Rezende, Alessandra, Rubens Borges Santos.*

“Mas ele respondeu: As coisas que são impossíveis aos homens são  
possíveis a Deus”  
Lucas 18:27

MORAES FILHO, M. L. **Otimização em processo fermentativo por bactérias lácticas e desenvolvimento de molho cremoso de soja probiótico.** 2016. 149 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A soja [*Glycine max (L.) Merrill*] é um grão mundialmente difundido, podendo ser consumido na forma de produtos fermentados e não fermentados. Apresentam em sua composição muitos constituintes de interesse biológico, tais como proteínas de alta qualidade, fitoesteróis, isoflavonas, etc. Atualmente a aplicação de bactérias lácticas, principalmente as que possuem alegações de probióticos em processos fermentativos não está restrita à indústria de laticínios, sendo incorporados a diferentes matrizes alimentares (animal e vegetal). O objetivo deste trabalho visou estudar as melhores condições para a fermentação de extrato de soja contendo farinha de okara por *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus plantarum* BG112, otimizando por meio da metodologia de superfície de resposta as variáveis independentes: Temperatura de incubação e pH inicial, tendo como resposta o crescimento dos microrganismos, caracterizando as matérias-primas para composição química, curva de conversão de isoflavonas e atividade antioxidante, habilidade de proteção contra a oxidação do DNA, ácidos orgânicos, capacidade in vitro de inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) para a condição de fermentação já estabelecida. As condições otimizadas para LP BG112 foram de pH inicial: 6,0 com uma temperatura de incubação de 37 °C e para o LA3 as condições consistiram em pH inicial: 5,0 com uma temperatura de incubação de 31 °C. Os extratos fermentados nas condições otimizadas apresentaram acúmulo de ácidos durante a fermentação, com redução do pH e aumento da acidez. O processo fermentativo proporcionou o aumento na capacidade in vitro de inibição de ACE em decorrência de provável produção de peptídeos bioativos, além de apresentarem aumento na capacidade antioxidante e capacidade de proteção contra a oxidação do DNA. Posteriormente, utilizando a matriz otimizada e por meio de delineamento simplex-centróide aplicou-se goma guar, goma xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca na elaboração de molho cremoso de soja probiótico com otimização das variáveis: capacidade de retenção de água (CRA), viscosidade e firmeza. O molho otimizado foi caracterizado quanto a estabilidade durante armazenamento por 30 dias a 5 °C para contagem de microrganismos probióticos, sobrevivência nas condições gastrointestinais, estabilidade da cor, CRA, viscosidade, fenólicos totais, capacidade antioxidante e aceitação sensorial. Após aplicação do delineamento simplex-centróide e análise dos dados, a mistura binária de goma guar e goma xantana foi escolhida para a formulação dos molhos mediante respostas para CRA, viscosidade e firmeza. Em relação às análises de estabilidade do produto durante 30 dias a 5 °C, as contagens no produto permaneceram elevadas, apresentado uma taxa de sobrevivência dos probióticos quando mantidas nas condições gastrointestinais simuladas, além de alcançarem uma boa aceitação sensorial.

**Palavras-chave:** Isoflavonas. *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus plantarum*. Okara.

MORAES FILHO, M. L. **Optimization in fermentative process by lactic acid bacteria and development of probiotic soy creamy sauce.** 2016. 149 p. Thesis (Doctor's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill ] is a globally widespread crop which can be consumed in different products, among them the soymilk and its residue, okara. Soybean presents in its composition many constituents of biological interest, such as high-quality protein, phytosterols, isoflavones, etc. Currently, the application of lactic acid bacteria, especially those with probiotics claims in fermentation processes is not restricted to the dairy industry, being incorporated into different food matrices (animal and plant). This work aimed to study the best conditions for soymilk fermentation by *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Lactobacillus plantarum* BG112, containing okara flour optimized through response surface methodology the following independent variables: Incubation temperature and initial pH. The responses analyzed were: growth of microorganisms, characterization of the raw materials for chemical composition, isoflavone conversion curve, antioxidant activity, protection ability against DNA oxidation, organic acids, in vitro ability to inhibit the conversion of enzyme angiotensin (ACE) at the best condition of fermentation. The optimized conditions to LP BG112 were: initial pH: 6.0 and incubation temperature of 37 °C and for LA3 conditions the conditions consisted of initial pH: 5.0 and incubation temperature of 31 °C. Soymilks fermented in optimized conditions showed an accumulation of acid during fermentation, pH reduction and an increase in the acidity. The fermentation process provided an increase in the in vitro ACE inhibitory capacity probably in response to a production of bioactive peptides, and, in addition, resulted in an increase in the antioxidant capacity and the protection capacity against oxidation of DNA. Subsequently, using the optimized matrix and through simplex centroid design guar gum, xanthan gum and pregelatinized cassava starch were applied for the development of a probiotic soy creamy sauce through the optimization of the following variable responses: water holding capacity (WHC), viscosity and firmness. The probiotic soy creamy sauce optimized was characterized for stability during storage for 30 days at 5 °C, for counting of probiotic microorganisms, survival in gastrointestinal conditions, color stability, WHC, viscosity, total phenolic compounds, antioxidant capacity and sensory acceptance. After applying the simplex centroid design and analysis of data, the binary mixture of guar gum and xanthan gum was chosen for the formulation of probiotic soy creamy sauce by the responses to WHC, viscosity and firmness. With regard to product stability analysis for 30 days at 5 °C, the counts remained high in the product with a good survival rate of probiotics when held in the gastrointestinal conditions, and both probiotic microorganisms presented a good sensory acceptance.

**Keywords:** Isoflavones. *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus plantarum*. Okara.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1</b> – E estrutura geral de um flavonóide.....	28
<b>Figura 2</b> – Estrutura química das isoflavonas encontradas na soja .....	29
<b>Figura 3</b> – Estrutura Química da goma guar .....	37
<b>Figura 4</b> – Estrutura goma xantana .....	38
<b>Figura 5</b> – Planejamento de mistura tipo simplex-centroide .....	48

### Artigo I

<b>Figure 1</b> – Response surface: (A) <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3: log CFU.g <sup>-1</sup> (B) <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112: log CFU.g <sup>-1</sup> .....	78
<b>Figure 2</b> – Growth of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 (- - - -) and <i>Lactobacillus plantarum</i> BG122 (—) in soymilk with okara flour during 72 hours .....	80
<b>Figure 3</b> – pH (—) and titratable acidity (- - -) to LA3 (1) and LPBG 112 (2) in soymilk with okara flour during 72 hours. Different lowercase and uppercase letters show a significant difference (p<0.05).....	81
<b>Figure 4</b> – Total phenolic compounds in soymilk with okara flour after LPBG 112 (—) and LA3 (- - -) fermentation, expressed as mg GAE.mL <sup>-1</sup> of sample .....	82
<b>Figure 5</b> – Antioxidant activity: DPPH• (—) and ABTS +• (- - -) tests during LA3 (1) and LP BG112 (2) fermentation of soymilk with okara flour .....	83
<b>Figure 6</b> – Isoflavone aglycones in soymilk with okara flour during 72 hours fermentation by LPBG 112 and LA3 expressed as μmol.g <sup>-1</sup> on a degreased dry basis .....	84
<b>Figure 7</b> – Protective ability against DNA oxidation. A: LP BG112; B: LA3; +C: positive control (plasmid DNA); -C: negative control (plasmid DNA + Fenton's reagent); 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72: time in hours.....	86

## Artigo II

- Figura 1** – (1) Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE);  
(2) Ácidos orgânicos em extrato de soja contendo farinha de okara fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG 112. ....103
- Figura 2** – (1) Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE);  
(2) Ácidos orgânicos em extrato de soja contendo farinha de okara fermentado por *Lactobacillus acidophilus* LA3 .....104
- Figura 3** – Superfície de resposta para y1= CRA (%) (a), y2= Viscosidade (centipoise) (b), y3 = Firmeza (N) (c) para misturas contendo goma guar, xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca em molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112 .....108
- Figura 4** – Superfície de resposta para y1= CRA (%) (A), y2= Viscosidade (centipoise) (B), y3 = Firmeza (N) (C) para misturas contendo goma guar, xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca em molho cremoso de soja com *Lactobacillus acidophilus* LA3 .....109

## Artigo III

- Figura 1** – Molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112 durante 30 dias de armazenamento a 5° C .....130
- Figura 2** – Molho cremoso de soja com *Lactobacillus acidophilus* LA3 durante 30 dias de armazenamento a 5° C .....131
- Figura 3** – Molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112: cor .....132
- Figura 4** – Molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112: cor .....132

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

- Tabela 1** – Variáveis codificadas e decodificadas no planejamento fatorial ( $2^2$ ) para fermentação .....42
- Tabela 2** – Planejamento experimental simplex-centróide para o desenvolvimento de molho cremoso probiótico de soja.....49
- Tabela 3** – Ingredientes para a formulação de produto.....50

### Artigo I

- Table 1** – RCCD for fermentation with *Lactobacillus acidophilus* LA3 or *Lactobacillus plantarum* BG 112 and response functions  $Y_A$  and  $Y_P$ .....73
- Table 2** – ANOVA for growth of *Lactobacillus acidophilus* LA3 or *Lactobacillus plantarum* BG112 in soymilk with okara flour.....77

### Artigo II

- Tabela 1** – Planejamento experimental simplex-centróide para o desenvolvimento de molho cremoso de soja probiótico. Variáveis codificadas, decodificadas e variáveis respostas100
- Tabela 2** – Ingredientes para a formulação de produto.....101
- Tabela 3** – Coeficientes de regressão e análise de variância dos modelos matemáticos ajustados às variáveis respostas para *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3.....107
- Tabela 4** – Composição Química: Soja BRS 257, Farinha de okara, Extrato de soja, Extrato de soja contendo 3% de farinha de okara e molho cremoso de soja probiótico.....112

### Artigo III

<b>Tabela 1</b> – Ingredientes para a formulação de produto.....	123
<b>Tabela 2</b> – Contagem de células viáveis em molho cremoso de soja fermentado por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 e sobrevivência a simulação in vitro nas condições gastrointestinais durante 30 dias de armazenamento .....	127
<b>Tabela 3</b> – Fenólicos Totais e atividade antioxidante (DPPH•, ABTS+• e FRAP•) com 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 5° C para molho cremoso de soja com <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 (base seca).....	133
<b>Tabela 4</b> – Aceitação sensorial de molho cremosos de soja probiótico com <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 .....	136
<b>Tabela 5</b> – Aceitação sensorial de molho cremosos de soja probiótico com <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 .....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ABTS	2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ABTS+•	Radical do cátion ABTS
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Componente amarelo-azul
CFU	Colony forming units
CLUAE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CRA	Capacidade de retenção de água
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
HPLC	High performance liquid chromatography
L*	Luminosidade
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UFC	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2.2.1	Otimização das condições de fermentação.....	20
2.2.2	Otimização do molho cremoso de soja.....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
3.1	SOJA .....	22
3.2	EXTRATO AQUOSO DE SOJA .....	25
3.3	OKARA.....	26
3.4	ISOFLAVONAS .....	28
3.5	PROBIÓTICOS .....	31
3.5.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	33
3.5.2	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	34
3.6	POLISSACARÍDEOS –AMIDO E HIDROCOLOIDES.....	34
3.6.1	Amido de Mandioca.....	36
3.6.2	Goma Guar.....	37
3.6.3	Goma Xantana .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1	MATERIAL.....	40
4.1.1	Soja .....	40
4.1.2	Culturas .....	40
4.2	MÉTODOS .....	40
4.2.1	Cultura.....	40
4.2.2	Preparo das Amostras.....	40
4.2.3	Composição Centesimal.....	41
4.2.4	Fermentação .....	41
4.2.5	Contagem de Bactérias Láticas.....	42

4.2.6	Determinação e Quantificação de Isoflavonas por CLUAE .....	42
4.2.7	Compostos Fenólicos Totais .....	43
4.2.8	Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestras Radicais DPPH• .....	44
4.2.9	Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestras Radicais Livres ABTS+• .....	44
4.2.10	Atividade Antioxidante Avaliada pelo Poder de Redução do Ferro – FRAP .....	45
4.2.11	Atividade de Proteção Contra a Oxidação do DNA .....	45
4.2.12	pH e Acidez Titulável .....	46
4.2.13	Inibição in vitro da Enzima Conversora da angiotensina (ACE) .....	46
4.2.14	Ácidos Orgânicos .....	46
4.2.15	Simulação in vitro da Sobrevivência nas Condições Gastrointestinais .....	47
4.2.16	Cor .....	48
4.2.17	Planejamento de Misturas Simplex–Centróide .....	48
4.2.18	Capacidade de Retenção de Água .....	50
4.2.19	Viscosidade .....	50
4.2.20	Firmeza .....	51
4.2.21	Análise Sensorial .....	51
4.2.22	Análise Estatística .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>53</b>

<b>ARTIGO I – Optimization of the fermentation parameters for the growth of <i>Lactobacillus</i> in soymilk with okara flour .....</b>		<b>68</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>69</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and Methods .....</b>	<b>71</b>
<b>2.1</b>	<b>Soybeans .....</b>	<b>71</b>
<b>2.2</b>	<b>Culture .....</b>	<b>71</b>

2.3	Soy milk, okara flour production and fermentation conditions.....	71
2.4	Central Composite Rotational Design .....	72
2.5	Counts of probiotics .....	73
2.6	Extraction and quantification of isoflavones .....	73
2.7	pH and titratable acidity .....	74
2.8	Total phenolic compounds .....	74
2.9	Antioxidant activity .....	75
2.10	Protective ability Against DNA oxidation .....	75
2.11	Statistical analysis .....	75
3.	Results and discussion .....	76
3.1	Effect of temperature and pH on the growth of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 and <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 in soymilk with okara flour... ..	76
3.2	Growth, pH and titratable acidity .....	79
3.3	Total phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity .....	82
3.4	Protective ability against DNA oxidation.....	85
4.	Conclusion.....	87
	References .....	88

<b>ARTIGO II – Extrato de soja com farinha de okara fermentado por <i>Lactobacillus</i>: Delineamento simplex-centróide aplicado na elaboração molho cremoso de soja probiótico.....</b>	<b>94</b>
--	-----------

1.	Introdução.....	95
2.	Materiais e Metodos .....	97
2.1	Soja e Cultura .....	97
2.2	Extrato de soja, farinha de okara e Fermentação .....	97
2.3	Composição Química.....	97
2.4	Inibição in vitro da enzima conversora de angiotensina (ACE) .....	97

2.5	Ácidos orgânicos .....	98
2.6	Delimitação Experimental .....	99
2.7	Capacidade de Retenção de água, Viscosidade e Firmeza .....	102
2.8	Análise estatística .....	102
3.	Resultados e Discussão .....	103
3.1	Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) e ácidos orgânicos.....	103
3.2	Otimização da formulação de molho cremoso de soja.....	106
3.3	Composição Química.....	111
4.	Conclusão .....	113
	References.....	114

<b>ARTIGO III – Molho cremoso de soja Fermentado Com <i>Lactobacillus Plantarum</i> BG112 ou <i>Lactobacillus Acidophilus</i> LA3: Caracterização, estabilidade ao armazenamento e aceitação sensorial .....</b>	<b>119</b>
--	------------

1.	Introdução .....	120
2.	Materiais e Metodos .....	122
2.1	Soja e Cultura .....	122
2.2	Extrato de soja, farinha de okara e Fermentação .....	122
2.3	Elaboração dos molhos cremosos probióticos.....	122
2.3.1	Controles.....	123
2.4	CRA e Viscosidade.....	123
2.5	Contagem de Bactérias Láticas Totais.....	124
2.6	Simulação <i>in vitro</i> da sobrevivência das bactérias láticas (LP BG112 ou LA3) em condições gastrointestinais .....	124
2.7	Cor .....	125
2.8	Compostos Fenólicos Totais .....	125
2.9	Atividade Antioxidante.....	125

2.10	Análise Sensorial.....	126
2.12	Análise estatística .....	127
3.	Resultados e Discussão .....	127
3.1	Sobrevivência ao armazenamento e simulação <i>in vitro</i> em condições gastrointestinais para <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3.....	127
3.2	Cor, Viscosidade e CRA.....	130
3.3	Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante .....	133
3.4	Aceitação sensorial.....	136
4.	Conclusão .....	138
	Referencias .....	139
	Conclusão Geral.....	144
	ANEXOS .....	145
	ANEXO 1 – Parecer Comite de Ética .....	146
	ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	147
	ANEXO 3 – Ficha para Avaliação Sensorial .....	149

## 1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente o uso de bactérias lácticas é associado às indústrias de laticínios, em vista da grande demanda existente para seus produtos. Entretanto, no decorrer dos anos, houve a necessidade de se adequar e fornecer diferentes produtos que viessem a atender populações específicas, passando a existir uma maior diversificação de produtos e introdução de novas matrizes alimentares utilizadas para a fermentação. Dentre as novas matrizes, a soja vem se destacando, pois além de apresentar características nutricionais favoráveis ao crescimento destes microrganismos, possui em sua composição alguns componentes tidos como benéficos à saúde. Alguns exemplos de compostos bioativos encontrados na soja e derivados são compostos fenólicos, isoflavonas, fitosteróis, fibras, oligossacarídeos, etc.

O consumo de soja pode ocorrer na forma de produtos fermentados e não fermentados, por exemplo extrato de soja, tofu, shoyu. O extrato de soja é o produto obtido após a trituração dos grãos em água e filtração. Seu consumo ocorre diretamente na forma de bebida adicionada ou não de outros ingredientes, servindo de base na elaboração de produtos como “iogurtes”. O *okara* é o resíduo sólido obtido da elaboração do extrato de soja após a etapa de filtração. Com baixa empregabilidade na alimentação humana, o uso restringe-se predominantemente à alimentação animal. Esta matriz apresenta elevada qualidade nutricional, retendo a maior parte dos nutrientes encontrados no grão.

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo de flavonóides encontradas sob 12 formas, sendo agrupadas em 4 grupos: Agliconas,  $\beta$ -glicosídicas, Malonil-glicosídicas e Acetil-glicosídicas. Estes compostos apresentam atividade antioxidante que varia de acordo com sua estrutura, tendo as isoflavonas agliconas um maior poder antioxidante pela presença em maior número de sítios ativos, além de serem consideradas como as formas com maior biodisponibilidade.

A conversão das formas  $\beta$ -glicosídicas às agliconas pode ocorrer mediante a ação da enzima endógena  $\beta$ -glicosidase. Entretanto muitos

microrganismos têm sido relatados como produtores desta enzima, dentre os quais se encontram algumas bactérias lácticas com alegações de probióticos.

Muitas bactérias lácticas comumente empregadas na produção de produtos são consideradas como probióticas, ou seja, estas bactérias quando ingeridas de forma regular, podem ocasionar diferentes benefícios ao consumidor, como auxílio do organismo na defesa contra patógenos e melhora no fluxo intestinal. Alimentos contendo probióticos são considerados alimentos funcionais, ou seja, alimentos que além de fornecerem os nutrientes essenciais a manutenção do indivíduo, quando usados em uma dieta, apresentam efeitos benéficos ao consumidor, contribuindo na manutenção da saúde, como por exemplo compostos com características antioxidantes, retardando os efeitos causados pela oxidação.

Na busca pelo desenvolvimento e inovação de produtos com apelo de funcionalidade, proporcionando diferentes benefícios aos consumidores, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo fermentativo por diferentes bactérias lácticas com alegações de probióticos em sistema extrato de soja/farinha de okara, tendo como variáveis independentes: pH inicial e temperatura de incubação, visando o maior crescimento dos microrganismos, favorecendo assim a manutenção de altas contagens ao longo do armazenamento. Posteriormente esta matriz otimizada foi empregada na elaboração de molho cremoso de soja probiótico por meio de planejamento *simplex-centróide*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Estudar o crescimento dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus plantarum* BG112 em sistema composto por extrato de soja com adição de farinha de okara e aplicação na elaboração de molho cremoso de soja probiótico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Otimização das condições de fermentação

- ✓ Otimizar as condições de fermentação por *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus plantarum* BG112 em sistema extrato de soja com adição de farinha de okara por meio da metodologia de superfície de resposta.
- ✓ Caracterizar as matérias-primas quanto à composição química: grão, farinha de okara, extrato de soja sem e com adição de 3 % de farinha okara;
- ✓ Verificar a curva de conversão de isoflavonas agliconas, fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH• e ABTS<sup>+</sup>•);
- ✓ Determinar a curva de crescimento, pH e acidez titulável;
- ✓ Verificar a capacidade de proteção contra a oxidação do DNA;
- ✓ Medir a capacidade de inibição de ACE e produção de ácidos orgânicos.

#### 2.2.2 Otimização molho cremoso de soja probiótico

- ✓ Otimizar por meio de planejamento *simplex-centróide* a influência da adição de X1: Goma Guar; X2: Goma Xantana; X3: Amido pré-gelatinizado de mandioca sobre as variáveis respostas: viscosidade,

capacidade de retenção de água e firmeza na elaboração de molho cremoso de soja probiótico.

- ✓ Caracterizar o produto otimizado quanto a composição química e estabilidade ao armazenamento por 30 dias a 5 °C para contagem de probióticos, viscosidade, capacidade de retenção de água, aceitação sensorial, fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH• , ABTS+• e FRAP•), cor e simulação in vitro da sobrevivência em condições gastro intestinais.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SOJA

A soja [*Glycine max (L.) Merril*] é um grão originário do continente asiático, estando presente na alimentação dessa população há milhares de anos, sendo considerada uma das principais fontes proteicas para os habitantes, fornece aminoácidos essenciais em sua composição o que contribuiu para a classificação como uma excelente fonte vegetal de proteínas de alta qualidade. Nos Estados Unidos, a soja passou a ser introduzida em maior escala na alimentação da população a partir da Segunda Guerra Mundial em virtude da escassez de outras fontes de óleos e fontes tradicionais de proteínas (FICHER et al., 2001; GOLBITZ; JORDAN, 2006; HYMOWITZ, 2008; ROSA et al., 2009). Segundo dados do IBGE, a previsão para a safra de 2016 no Brasil é de 96 milhões de toneladas, sendo no ano de 2014 o 2º maior produtor mundial deste grão, atrás apenas dos Estados Unidos, com uma representatividade na produção mundial de aproximadamente 30%.

No Brasil a introdução ocorreu no início do século 20, passando a um maior destaque apenas na década de 70 em decorrência do maior interesse para a produção e demanda de óleos no comércio internacional, recebendo incentivos fiscais por parte do governo o que contribuiu para o avanço da produção, tendo atualmente a região de Mato Grosso a maior produção (BOWLES & DEMIATE, 2006; EMBRAPA, 2016).

Em média, o grão de soja apresenta 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos. Entretanto, as características nutricionais sofrem influência de diversos fatores, tais como cultivar empregado, características climáticas, entre outros (GOLBITZ; JORDAN, 2006; CORREA et al., 2010; EMBRAPA, 2016).

O consumo da soja e benefícios à saúde relacionados a sua ingestão tornou-se tema recorrente de pesquisas em virtude de apresentarem muitos compostos de interesse biológico como fitosteróis, inibidores de proteases, isoflavonas, ácido fítico, tendo alguns destes compostos funções antioxidantes e anticancerígenas. Estudos epidemiológicos vêm demonstrando os benefícios do consumo de soja e derivados na alimentação, como a menor incidência de

doenças cardiovasculares e cânceres na população asiática quando comparados aos ocidentais, uma vez que mesmo apresentando alta produtividade mundial e propriedades funcionais e nutricionais já comprovadas, o consumo da soja e derivados ainda apresenta-se baixo no Brasil e em outros países ocidentais, característica relacionada principalmente ao sabor e odor característico, sendo seu cultivo destinado principalmente a alimentação animal e extração de óleo (GRIESHOP; FAHEY JR, 2001; VASCONCELOS et al., 2001; ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002; ROUDSARI et al.; 2005; MEDIC, ATKINSON, HURBURGH, 2014).

O grão de soja é recoberto externamente pela casca representando aproximadamente 8% do peso do grão, e composta por 86% de carboidratos insolúveis, variando sua coloração entre amarelo, verde, marrom e preto. Os outros 92% correspondem a 90% de cotilédone e 2% de hipocótilo. Industrialmente, o principal produto derivado da soja com elevado valor de mercado é o óleo, presente em maior quantidade no cotilédone. A composição apresenta em média 15% de ácidos graxos saturados e 85% insaturados, variando entre 35 a 60% para o ácido linoleico e 2 a 15% para o ácido linolênico, ambos ácidos graxos insaturados. O consumo destes estão associados à redução do colesterol de baixa densidade (LDL – *Low density lipoprotein*) relacionados a doenças cardíacas e processos inflamatórios (LIU, 1997; GOLBITZ, JORDAN, 2006).

O grão apresenta em torno de 10% de carboidratos solúveis, como rafinose (4 – 5%) e estaquiose (3,5 – 4,5%) e apesar de serem considerados indesejáveis por alguns pesquisadores devido à associação a alguns desconfortos como cólicas, diarreia e flatulência, estes compostos promovem o crescimento de bactérias benéficas no intestino como as bifidobactérias (LIU, 1997; CHEN et al., 2000).

Estes compostos são produzidos a partir da sacarose, acumulando-se nos cotilédones durante a maturação e servindo como fonte de carboidratos de fácil utilização durante o processo de germinação (NISHIZAWA-YOKOI, YABUTA, SHIGEOTA, 2008). A rafinose é um trissacarídeo com uma molécula de galactose ligada a uma molécula de sacarose por ligações  $\alpha$  (1 – 6). Já a estaquiose é um tetrassacarídeo contendo uma molécula de galactose ligada a

rafinose por ligações  $\alpha$  (1 – 6). A associação destes compostos a respostas indesejáveis se dá pela ausência da enzima  $\alpha$ -galactosidase na mucosa do intestino o que inviabiliza sua hidrólise e absorção, levando à fermentação por microrganismos presentes no intestino, com produção de gases e outros compostos culminando em desconforto ao consumidor (MIDDELBOS & FAHEY, 2008; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Entretanto, sabe-se que estes oligossacarídeos apresentam efeitos prebióticos, favorecendo o crescimento de bactérias desejáveis no intestino e manutenção da saúde do hospedeiro pelo aumento da colonização do intestino por bactérias benéficas e produção de compostos de interesse, como ácidos graxos de cadeia curta (LIU, 2004; GIL & BENGMARK, 2006; MIDDELBOS & FAHEY, 2008).

A fração de carboidratos insolúveis é composta em grande parte por celulose e hemicelulose, sendo classificados como fibra alimentar, auxiliam na redução nos níveis de colesterol e controle da diabetes, sendo a soja, fonte de minerais como potássio, fósforo, magnésio e vitaminas, tais como tiamina, riboflavina, niacina (LIU, 1997; GOLBITZ, JORDAN, 2006; MEDIC, ATKINSON, HURBURGH, 2014).

No ano de 1999, o FDA (*Food and Drug Administration*) divulgou um documento para conhecimento público onde ressaltava os benefícios do consumo da soja, autorizando as indústrias a informarem no rótulo os benefícios de se consumirem produtos derivados da soja. Além disso, este mesmo órgão informou que a ingestão de aproximadamente 25 g de proteína de soja associando seu consumo a uma dieta de baixa concentração de ácidos graxos saturados e colesterol, podem reduzir o risco de doenças cardíacas.

Fonte de aminoácidos leucina e lisina apresentam limitações como fonte de aminoácidos que contém enxofre como metionina, cisteína e cistina (LIU, 1997; FICHER, 2001; Carrão-Panizzi, 2000). Segundo estudo de Chen et al.(2006), o consumo de proteínas de soja foi eficaz na diminuição dos níveis de colesterol plasmático. Além do caráter nutricional, as proteínas da soja apresentam propriedades tecnológicas importantes, como a fração 7S que apresenta alta solubilidade e capacidade emulsificante, enquanto a fração 11S é descrita como uma melhor fonte para obtenção de géis mais firmes,

propriedade associada ao grande número de grupos sulfrídilas (LIU, 1997; MANION & CORREDIG, 2006).

### 3.2 Extrato de Soja

O extrato de soja é uma bebida rica em proteínas, caracterizada por ser uma emulsão do tipo óleo em água obtida por diferentes métodos, sendo comumente utilizadas as etapas de seleção, hidratação, maceração, cocção da massa triturada e filtração. O resíduo sólido obtido após a filtração é denominado de okara e o filtrado de extrato de soja. O extrato de soja é semelhante ao leite animal, podendo ser comercializado com ou sem adição de aromatizante e outros ingredientes, torna-se uma alternativa aos consumidores intolerantes à lactose por não conter a presença desse açúcar (BENEDETTI; FALCÃO, 2003; MORAES et al., 2006; LIU, 2008; CRUZ et al., 2009, CHEN et al. 2014).

A aceitabilidade por parte dos consumidores ocidentais é limitada devido ao sabor característico, sendo que muitos compostos que contribuem para o sabor já estão presentes no grão ou são formados durante a obtenção do extrato pela ação da temperatura ou enzimas. Um dos principais meios de comercialização é realizado juntamente a sucos de frutas, o que elevou a aceitabilidade por parte dos consumidores (BENEDETTI; FALCÃO, 2003; MORAES et al., 2006; CRUZ et al., 2009). Mudanças na metodologia de obtenção ou mudanças no armazenamento vem sendo constantemente estudadas a fim de minimizar esses efeitos negativos no produto, como a inativação da lipoxigenase, remoção de compostos indesejáveis ou emprego de ingredientes que minimizem essas características indesejáveis (BERK, 1992).

O extrato de soja possui características que permitem a utilização para fermentação, como a presença dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose (carboidratos classificados como prébióticos) e peptídeos que servem como substrato para o crescimento de bactérias probióticas. Além disso, o processo de fermentação por diferentes microrganismos com ênfase em bactérias lácticas proporciona melhorias nas características sensoriais do extrato de soja e por

fim a aceitabilidade (HOU; YU; CHOU, 2000; BEASLEY; TUORILA; SARIS, 2003; BENEDETTI; FALCÃO, 2003; HAULY; FUCHS; FERREIRA, 2005; BLAGDEN; GILLILAND, 2005; MORAES et al., 2006; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Durante a fermentação do extrato de soja são formados produtos como acetaldeído e diacetil conferindo características sensoriais agradáveis, além de promover a diminuição do pH pela fermentação de açúcares e produção de ácidos, levando à coagulação de proteínas por modificação da carga superficial (CRUZ et al., 2009). O extrato de soja é considerado uma alternativa para muitos consumidores que apresentam restrição ao consumo de leite animal, apresentando em 100 mL de extrato de soja aproximadamente 52 calorias, 2,5% de carboidratos, 3,4% de proteínas, 2,3% de lipídios, 40 mg de cálcio, 105 mg de potássio e 1,2 mg de ferro, 40 mg de vitamina B1 e 120 mg de vitamina B2. (CRUZ et al., 2009; Embrapa, 2016).

O consumo per capita no ano de 2010 ficou em aproximadamente 2,8 litros por ano, tendo demonstrado uma tendência de aumento no mercado brasileiro (ABIR, 2011), sendo comercializados na forma líquida ou em pó. Industrialmente para a elaboração pode-se partir de grãos inteiros ou de soja pré-processada, o que facilita a hidratação e diminui o tempo de processamento, sendo que essas características do processamento influenciam diretamente na composição.

### 3.3 Okara

O okara é o subproduto da produção de extrato de soja obtido após a etapa de filtração. Por meio da filtração com diferentes materiais e porosidades ou através de centrifugação, separa-se o extrato de soja (fase líquida) e o okara (resíduo sólido). Devido ao baixo valor agregado e limitações de uso em decorrência do menor tempo de validade, o okara é destinado quase que exclusivamente à alimentação animal ou é descartado, sendo de grande importância o estudo de seu uso pela indústria. Apresentam elevada taxa de

produção e o descarte inadequado podem ocasionar danos ambientais (ROSENTHAL et al. 2003; YAN-CHUN et al. 2011; LI, QIAO, LU, 2012).

Em média, 1 kg de soja produz 1,1 kg de okara (base úmida) e 250 g de farinha (base seca). O okara apresenta elevada qualidade nutricional, tendo em média 30% de proteínas, 8,5% de lipídios, 3,8% de carboidratos, 3,0% de cinzas e 55,5% de fibras em base seca, apresentando um grande potencial de aplicabilidade em produtos alimentícios (O'TOOLE, 1999; PARK et al., 2001; VILLANUEVA et al., 2010).

Devido à alta perecibilidade em virtude do elevado teor de umidade (aproximadamente 80%) o uso torna-se inviável em função do grande volume de produção existente, o que torna o processo de secagem uma alternativa de processamento visando o aumento da vida de prateleira, além de facilitar o uso e armazenamento. A utilização de okara como ingrediente não altera as características sensoriais dos produtos dependendo da concentração empregada, promovendo o aumento do valor nutricional, sendo fonte de isoflavonas e outros compostos, tendo aplicação em produtos de panificação, doces, cereais e produtos cárneos (JACKSON et al., 2001; BOWLES & DEMIATE, 2006; SILVA et al., 2006; PERUSSELO, 2008; LESCANO, 2009).

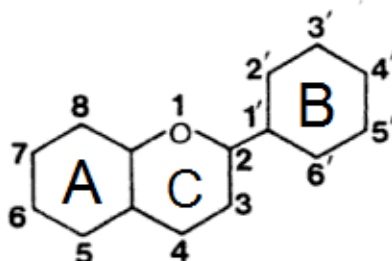
Waliszewski et al. (2002) aplicaram diferentes porcentagens de okara em tortilhas. Já Aplevicz e Demiate (2007) aplicaram diferentes concentrações de okara em misturas para produção de pão de queijo relatando uma boa aceitação sensorial. Bowles e Demiate (2006) suplementaram massas de pães do tipo francês com okara e obtiveram uma alta aceitação dos pães nas concentrações de 5 e 10%, com respectivas médias de 8,02 e 7,78.

O okara é fonte de compostos antioxidantes, além de conter elevado teor de fibras contribuindo no controle e redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos, auxiliando na prevenção de doenças cardíacas e diabetes (AMIN e MUKHRIZAH, 2006; JENKINS et al., 2002; KEENAN et al., 2007). Segundo Jackson et al. 2001, pelo menos um terço do conteúdo de isoflavonas presentes no grão permanecem no okara após o processamento.

### 3.4 Isoflavonas

Dentre os compostos fenólicos, encontram-se diferentes subclasses que abrangem inúmeros compostos. Os flavonóides pertencem aos compostos fenólicos. Esta subclasse abrange outras 11 classes secundárias de compostos, tais como: isoflavonas, antocianinas, flavanas e flavanonas. A estrutura básica (Figura 1) é constituída por um núcleo flavona composto por 2 anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (C) (LIU, 1997; SILVA et al., 2002; DORNAS et al., 2007).

Figura 1. Estrutura geral de um flavonóide (LIU, 1997).



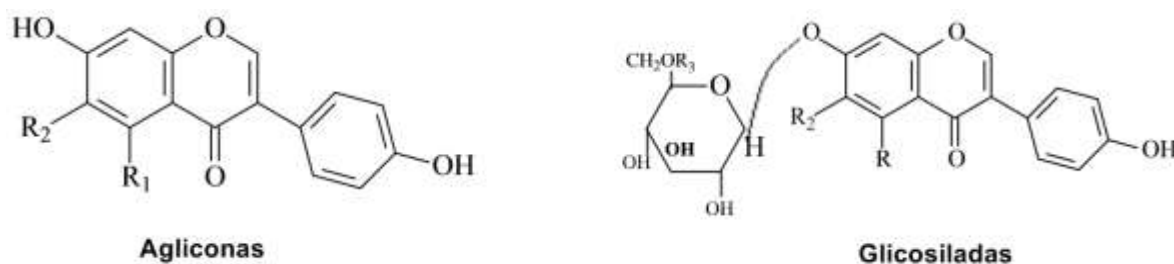
Apresentam atividade antiinflamatória, antialérgica, antiosteoporótica, anticarcinogênica, sendo muitos de seus efeitos farmacológicos relacionados à interação com várias enzimas e à sua atividade antioxidante (LIU, 1997; SILVA et al., 2002; DORNAS et al., 2007). A síntese está associada ao sistema de defesa das plantas, ocorrendo em condições ambientais desfavoráveis, como falta de nutrientes e pragas. No grão, a maior concentração de isoflavonas situa-se no hipocótilo, que apresenta um teor de 4 a 6 vezes mais elevado que o cotilédone (HOWITZ & SINCLAIR, 2008; KIM et al. 2007).

Compostos fenólicos possuem atividade antioxidante podendo doar átomos de hidrogênio e/ou elétrons a radicais instáveis, impedindo a propagação da oxidação pelo sequestro dos primeiros radicais formados, além de apresentarem propriedades quelantes de íons metálicos com formação de radicais estáveis (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; NACZK; SHAHIDI, 2004). O teor de compostos fenólicos no grão de soja é variável, segundo trabalho de Xu e Chang (2008), os valores encontrados pelos autores

variam de aproximadamente 3,5 a 6 mg equivalente de ácido gálico (EAG / g) para soja preta e 2,2 a 2,6 (EAG / g) para soja amarela.

As isoflavonas são compostos fenólicos encontrados no grão de soja e em seus derivados. A concentração de isoflavonas nos grãos varia de 0,1 a 5 mg/g dependendo das condições climáticas, processamento ou cultivar. Difere dos demais flavonoides devido à posição do segundo anel aromático, sendo que para as isoflavonas a ligação ocorre na posição 3 (Figura 2) (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999).

Figura 2. Estrutura química das isoflavonas encontradas na soja (LIU, 1997).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Composto
H	H	-	Daidzeina
OH	H	-	Genisteina
H	OCH <sub>3</sub>	-	Gliciteina
H	H	H	Daidzina
OH	H	H	Genistina
H	OCH <sub>3</sub>	H	Glicitina
H	H	COCH <sub>3</sub>	6''-O-Acetildaidzina
OH	H	COCH <sub>3</sub>	6''-O-Acetilgenistina
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	6''-O-Acetilglicitina
H	H	COCH <sub>2</sub> COOH	6''-O-Malonildaidzina
OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH	6''-O-Malonilgenistina
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH	6''-O-Malonilglicitina

Pertencem à classe dos fitoestrógenos podendo-se ligar aos receptores de estrogênio desencadeando respostas estrogênicas ou antiestrogênicas, dependendo dos níveis hormonais. Essa propriedade é exercida pelas frações agliconas, uma vez que apresentam estrutura química semelhante ao hormônio feminino  $17\beta$ -estradiol, tendo alguns de seus metabólitos secundários a capacidade de interagir com os receptores de estrogênio (MESSINA, 2010; MEDIC, ATKINSON, HURBURGH, 2014; LEE et al. 2015). Podem ser encontradas em 12 diferentes formas:  $\beta$ -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídicas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), malonilglicosídica (malonildaizina, malonilgenistina, e malonilglicitina) e em sua forma aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Figura 2) (LIU, 1997; SETCHELL, 1998; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

A forma glicosilada comumente está presente em maior quantidade e por meio de transformações enzimáticas relacionadas ao processo digestivo ocorrem modificações estruturais. Seu consumo está relacionado com a prevenção de doenças como câncer de mama e cólon pela capacidade de inibir enzimas ligadas ao desenvolvimento de cânceres, como a tirosina quinase, além da atividade antioxidante, inibindo espécies reativas prevenindo problemas cardiovasculares (LIU, 1997; SETCHELL, 1998; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

As concentrações de isoflavonas em derivados de soja estão diretamente relacionadas ao processamento. Dwyer et al. (1994) encontraram em média a quantidade de 2,2 mg / g para proteína texturizada e farinha de soja, 0,80 mg / g em proteína isolada de soja e 67 mg / g em tofu. Segundo Nagata et al. (1998), em relação a ingestão média de genisteína, o consumo entre os ocidentais e asiáticos apresenta-se de forma desigual, enquanto os consumidores ocidentais ingerem aproximadamente de 1 – 3 mg / dia de genisteína, os orientais apresentam um consumo entre 20 – 80 mg / dia.

Durante o processamento pode ocorrer a conversão das formas malonil e acetil em seus correspondentes  $\beta$ -glicosídeos quando submetidos a tratamentos térmicos. Além disso, um fator importante a ser considerado durante a ingestão é a biodisponibilidade, uma vez que as formas agliconas são absorvidas rapidamente devido a massa molecular inferior quando

comparadas a seus correspondentes glicosilados, o que facilita a difusão e absorção (MESSINA, 2010; TORO-FUNES et al. 2012). Diferente das formas agliconas, as formas glicosiladas devem ser convertidas no intestino para a forma aglicona correspondente para que ocorra a absorção. A conversão é proporcionada pelas bactérias presentes no intestino pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase (DONKOR & SHAH, 2008; CEDERROTH & NEF, 2009).

Naturalmente, o grão de soja possui a presença da enzima  $\beta$ -glicosidase. Esta enzima é capaz de catalisar a reação de hidrólise das isoflavonas glicosiladas às correspondentes agliconas. Além disso, muitas bactérias presentes no intestino, dentre as quais podemos destacar os lactobacilos e bifidobactérias produzem esta enzima e aumentam o teor de isoflavonas agliconas quando utilizadas em processos fermentativos, podendo transformar as isoflavonas agliconas em outros metabólitos, como *p*-etilfenol (Genisteína) e equol (Daidzeína) (XU et al., 1995; PARK et al., 2002; KIM; CHUNG, 2007).

### 3.5 Probiótico

Alimentos funcionais são os que fornecem em sua composição substâncias que promovem benefícios a saúde do consumidor. Esse termo surgiu no Japão na década de 80 e a partir do ano de 1991 o país passou a ter uma legislação específica para esse tipo de alimento, sendo denominados de FOSHU (Foods for Specified Health Use). Atualmente para um alimento ser considerado funcional, este deve apresentar algum composto que promova diretamente benefícios ao ser consumido, ressaltando que alimentos funcionais não são medicamentos e por isso sua associação com benefícios a saúde esta relacionada a prevenção de doenças e não à cura (STRINGHETA et al. 2007; HOWLETT, 2008).

Dentre os diversos tipos de alimentos tidos como funcionais, podemos destacar os alimentos probióticos. Segundo o regulamento técnico para substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde da Resolução RDC nº02 da ANVISA de 07 de janeiro de 2002, probióticos são microrganismos vivos, capazes de melhorar o

equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Por meio da ingestão ocorre aumento e atividade de microrganismos benéficos ao hospedeiro (FULLER, 1989).

Para ser considerada probiótica, a bactéria não deve ser patogênica, tóxica, mutagênica ou carcinogênica ao hospedeiro; deve ser preferencialmente de origem humana e isolada do trato gastrointestinal saudável, possuir atividade antagônica a microrganismos patogênicos, resistência à acidez para sobreviver ao processo digestivo, sais biliares e a baixos níveis de oxigênio. Devem aderir às superfícies epiteliais e persistir no trato gastrointestinal humano (SAARELA et al., 2000; MATTILA SANDHOLM et al., 2002; KUMURA et al., 2004; COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Existem divergências em diferentes países quanto ao número e tipo de microrganismos aceitos como probióticos (SHAH, 2007, SOCCOL et al. 2010)

O consumo de alimentos contendo probióticos deve ocorrer de forma regular e em quantidade suficiente para promover algum benefício ao consumidor, como melhora na motilidade intestinal e absorção de nutrientes; diminuição no teor de lactose possibilitando uma alternativa ao consumo de determinados alimentos que apresentem em sua composição este açúcar e diminuição dos níveis de colesterol (FAO/WHO, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Para ser considerado um alimento probiótico e promover a colonização intestinal, o produto deve apresentar contagem igual ou superior a  $10^8 - 10^9$  UFC na porção do produto. Segundo a legislação no Brasil, as bactérias consideradas probióticas são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2013).

Os microrganismos probióticos devem apresentar resistência às condições gastrointestinais, como o baixo pH e ação de enzimas presentes durante o processo digestivo, para chegar ao epitélio e aderir à mucosa

intestinal (OHASHI & USHIDA, 2009; JENSEN et al. 2012). Alguns mecanismos de ação destes microrganismos envolvem síntese de substâncias e competição por nutrientes contra bactérias patogênicas, modificação do pH intestinal, aumento da secreção da mucosa, inativação de toxinas e seus receptores, estimulação a respostas imunológicas contra agentes patogênicos (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). Kemgang et al. (2014) reportam que o consumo de *Lactobacillus ssp* auxilia no alívio de constipação intestinal. Walker (2008) associa o consumo de probióticos a melhora em síndromes do intestino irritável e doença de Crohn pelo aumento nos níveis de anticorpos. Liong & Shah (2005) atribuem os efeitos de diminuição da hipertensão e hipercolesterolemia a ação dos microrganismos probióticos no metabolismo lipídico, o que contribui com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

Segundo Saarela et al. (2000), os microrganismos probióticos devem apresentar características tecnológicas e adequadas propriedades sensoriais e manter-se viáveis durante o processamento e armazenamento do produto. Para Gomes e Malcata (1999) culturas probióticas contribuem na melhora do sabor do produto final, tendo uma menor capacidade de promover a pós-acidificação durante o armazenamento.

### 3.5.1 *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus acidophilus* foi isolado primeiramente no ano de 1900. Classificado como uma bactéria Gram positiva, não formadora de esporos, imóvel e microaerófila, com pH ótimo entre 5,5 a 6,0, com resistência ao armazenamento e a temperaturas de refrigeração, apresentam-se como bastonetes longos e finos quando cultivados em meio MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (OLIVEIRA, 1995 ; STIPP, 1996; GOMES; MALCATA, 1999).

É uma bactéria láctica homofermentativa, convertendo açúcares em ácido láctico e pequenas quantidades de compostos voláteis (LEROY; VUYST, 2004). A maioria das linhagens consegue metabolizar amígdalina, celobiose, glicose, maltose, manose, sacarose, trealose, esculina, lactose, salicina (ROBINSON, 1991), rafinose e estaquiose (WANG et al., 2003). Apresenta resistência à bile,

estabelecendo-se no intestino e está associada à produção de metabólitos como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, lactacina B, acidofilucina A, dentre outros compostos com ação contra patógenos (REQUENA; PELÁEZ, 1995).

### 3.5.2 *Lactobacillus plantarum*

O *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria láctica, heterofermentativa, Gram-positiva que possui resistência ao trato gastrointestinal colonizando o intestino (ZAGO et al, 2011). Alguns estudos reportam ao *L. plantarum* habilidades de modular o sistema imune, reduzir o risco de doenças cardiovasculares, atenuar problemas intestinais entre outros (PAOLILLO et al., 2009).

Aplicado em diferentes produtos, incluindo fermentados lácteos, cárneos e vegetais (VESCOVO et al., 1993). Assim como outros microrganismos, em alguns países o *L. plantarum* é considerado probiótico e vem sendo utilizado como promotor da saúde, entretanto no Brasil ainda não pertence à lista com tais alegações.

### 3.6 Polissacarídeos – Amido e Hidrocolóides

Polissacarídeos são carboidratos complexos formados pela junção de monossacarídeos por ligações glicosídicas. Compostos de unidades glicosil em arranjos lineares, possuem em sua maioria um DP (degree of polymerization) de 200 – 3.000, podendo apresentar em alguns casos um DP > 60.000 (amilopectina). Podem ser obtidos de fontes vegetais e a partir do metabolismo de microrganismos (ROJAS, ROSELL, BARBER, 1998; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MATHIAS et al., 2013).

Utilizados em preparações alimentícias como espessantes e/ou gelificantes em soluções aquosas. A viscosidade produzida está relacionada ao tamanho e forma de suas moléculas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MATHIAS et al., 2013).

O amido é um dos mais importantes e abundantes hidrocolóides utilizados pela indústria de alimentos. Comercialmente extraídos de diferentes cereais como o milho, trigo, arroz, além de tubérculos e raízes como a batata e mandioca, esses diferentes tipos de amidos conferem características e propriedades particulares quando utilizados. Representam o ingrediente básico na formulação de produtos como pães e macarrões, além das características de agente espessante, estabilizante (BOBBIO, BOBBIO, 1995; GONERA; CORNILLON, 2002; FUNAMI et al. 2005).

Pertence a categoria de polissacarídeos com alto peso molecular presente em diversos vegetais como carboidrato de reserva. Apresenta-se sob a forma de grânulos e é formado por cadeias de amilose (cadeia linear – ligações  $\alpha$  1-4) e amilopectina (cadeia ramificada: ligações  $\alpha$  1-4 e  $\alpha$  1-6 nas ramificações). A proporção de amilose/amilopectina e teor de fósforo varia de acordo com a fonte, possuindo desta forma características distintas. Os amidos nativos possuem baixa solubilidade a frio em água, aumentando sua capacidade espessante quando em soluções tratadas termicamente, promovendo o inchaço dos grânulos de forma irreversível até a ruptura das estruturas cristalinas do grânulo, ocorrendo a absorção de água. Após o resfriamento é comum ocorrer a retrogradação, fenômeno associado ao rearranjo das cadeias por pontes de hidrogênio. Este fenômeno é indesejável, uma vez que produz uma estrutura mais rígida com propriedades tecnológicas indesejáveis (MUNHOZ, WEBER, CHANG, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DENARDIN; SILVA, 2009).

Os hidrocolóides são obtidos de diversas fontes como algas marinhas, sementes ou sintetizados por microrganismos. Assim como os amidos, seu emprego visa proporcionar efeitos como espessante e/ou estabilizante. Essas propriedades tem relação com a solubilização da molécula que exerce a função por sua organização, pode reter água pela interação direta ou formação de redes (gel). A variação da resposta dos hidrocolóides em relação às propriedades funcionais esta relacionada a características como peso molecular, presença de grupos funcionais, temperatura, etc (GLICKSMAN, 1982; WHISTLER, BEMILLER, 1993; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Por apresentarem funções de estabilizar, espessar, conferir viscosidade, os hidrocolóides têm sido muito empregados como substituintes de gordura, uma vez que a gordura é fundamental para efeitos sensoriais, além de contribuírem para substituir o açúcar, sendo utilizados em produtos light por atuarem nas propriedades reológicas de produtos cremosos (MARUYAMA et al. 2006).

### 3.6.1 Amido de Mandioca

Dentre os tipos de amidos obtidos comercialmente, o amido mandioca é extraído de suas raízes. A mandioca é uma raiz tuberosa de origem brasileira, apresentando aproximadamente 30% de amido, destaca-se por ser uma fonte barata e abundante em nosso país, tendo no ano de 2013 uma safra de aproximadamente 21 milhões de toneladas (TENSIRIPONG et al., 2005, LACERDA, 2006; DEMIATE & KOTOVICZ, 2011).

Considerado um bom espessante para produtos alimentícios, proporciona alta viscosidade com aparência clara e sabor neutro. O uso está relacionado à incorporação conjunta de outros hidrocolóides para obtenção de produtos com características mais adequadas (TENSIRIPONG et al., 2005, LACERDA, 2006; DEMIATE & KOTOVICZ, 2011).

Segundo Damodaran, Parkin, Fennema (2010), o amido nativo apresenta características limitadas para o uso industrial, todavia sua modificação possui a finalidade de adequar suas propriedades físicas e químicas para o processamento como, estabilidade ao calor, cisalhamento, acidez e para o uso com funções específicas (estabilidade ao armazenamento). A modificação é realizada por meio de tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos. Existem muitos tipos de amido quimicamente modificados como, por exemplo, através de hidrólise ácida, oxidação, esterificação e formação de ligações cruzadas que receberam na última década especial atenção (RAPAILLE; VANHEMELRIJCK, 1997; RUTENBERG; SOLAREK, 1984).

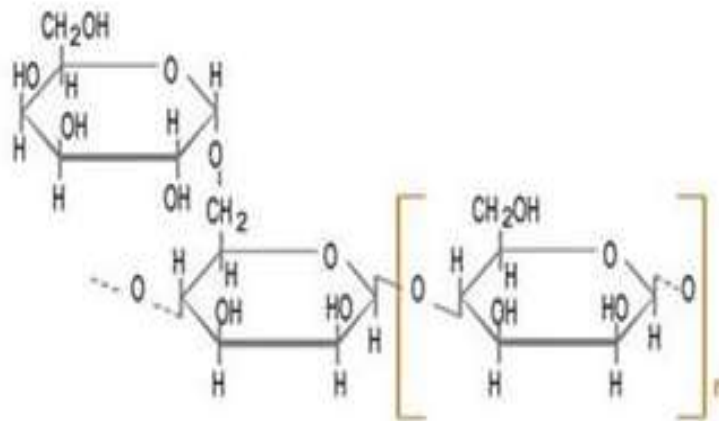
O amido pré-gelatinizado é obtido pela ação do calor, sendo feito em autoclaves (bateladas) ou de forma contínua (jet-cooking), seguido por desidratação em spray-dryer. Pode ser usado em muitos produtos da

panificação, sopas, cremes e sobremesas instantâneas (CEREDA; VILPOUX; DEMIATE, 2004).

### 3.6.2 Goma Guar

É uma goma obtida da moagem do endosperma de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* pertencente à família das leguminosas. É constituída principalmente de galactomananas que consistem em uma cadeia linear principal de  $\beta$ -D-manopiranosil com ligações  $\beta(1 - 4)$  ramificações de uma unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosil ligadas por ligações  $\alpha(1 - 6)$  (FIGURA 3), possuindo poucos locais adequados para a formação de zonas de junção, apresenta compatibilidade com outras gomas e não é afetada com valores de pH ácidos, sendo dentre as gomas naturais a goma que produz a mais alta viscosidade (NIKAEDO et al., 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

FIGURA 3. Estrutura Química da Goma Guar (Goma Guar, 2013).



Por apresentarem resíduos de galactose, as aproximações das cadeias ficam limitadas favorecendo a hidratação das moléculas, promovendo elevada viscosidade em sistemas aquosos com uma capacidade espessante 5 a 8 vezes maior que o amido (CUBERO et al; 2002). Possui de 33- 40% de galactose, característica que favorece a hidratação, tornando esta goma solúvel em temperaturas em torno a 25 °C e insolúvel quando ocorre a remoção de

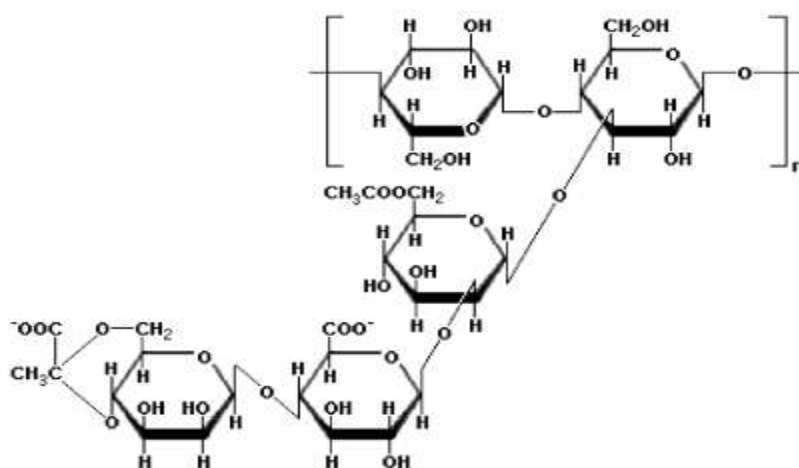
unidades de galactose por processos enzimáticos (PHILLIPS & WILLIAMNS, 2000).

Apresenta estabilidade na faixa de pH entre 3 – 11, sendo solúvel a frio diminuiu a viscosidade quando ocorre o aumento da temperatura, principalmente se este tratamento for intenso. É pouco sensível aos efeitos mecânicos e tem boa resistência aos ciclos de congelamento/descongelamento. Apresenta boa estabilidade quando os produtos são armazenados à temperatura ambiente (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000; CUBERO et al; 2002).

### 3.6.3 Goma Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo obtido pelo metabolismo da bactéria *Xanthomonas campestris*, também denominada de exopolissacarídeo é produzida comercialmente em grandes fermentadores a partir de substratos de baixo custo como xarope de glicose e derivados de amônia a temperaturas de 28 °C, durante aproximadamente 80 horas de fermentação. Constituída de uma cadeia principal idêntica a da celulose, possui unidades de D-glicose ligadas por ligações  $\beta(1 - 4)$  com resíduos de  $\beta$ -D-manose-1,4- $\beta$ -D-ácido glicurônico-1,2- $\alpha$ -D-manose (FIGURA 4) (COTRELL, KANG, KOVACX, 1980; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

FIGURA 4. Estrutura goma Xantana (NERY et al. 2008).



Apresenta solubilidade em água quente ou fria, alta viscosidade em baixas concentrações e estabilidade a diferentes temperaturas, sendo estáveis em produtos ácidos. As aplicações industriais ocorrem principalmente em produtos como molho para saladas, catchup e produtos dietéticos como agente espessante e estabilizante (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Possui alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (2 -12) apresentando uma baixa variação em extremos de pH. Essa mudança na viscosidade é acentuada com o aumento da temperatura, que associados aos valores extremos de pH promovem a hidrólise do polissacarídeo, refletindo sobre a viscosidade (PHILLIPS & WILLIAMNS, 2000).

Segundo Kim & Yoo (2006), a goma xantana quando utilizada em alimentos aumenta a viscosidade em baixa taxa de cisalhamento e diminui com aumentos na taxa de cisalhamento. Esta característica é interessante, pois confere aos produtos propriedades como aumento do escoamento e facilidade de bombeamento de alimentos.

Sereno, Hill e Mitchell (2007) reportam que a temperatura de dissolução do polímero afeta a viscosidade do produto final em decorrência da conformação molecular e posição ordenada das estruturas. A baixas temperaturas tem estruturas de predominância helicoidal estabilizada por ligações intermoleculares. Em altas temperaturas, a solução tende a apresentar maior viscosidade pela mudança na forma estrutural de suas moléculas, apresentando-se de uma forma mais desordenada, expondo uma maior quantidade de grupos iônicos capazes de interagir com a água (MILAS & RINALDO, 1979).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Soja

Foram utilizados grãos de soja [*Glycine max (L.) Merrill*], cultivar BRS 257 (livre de lipoxigenase), safra 2012/2013, fornecidos pela empresa Sementes Paraná Ltda., Mauá da Serra-PR.

#### 4.1.2 Microrganismos

Foram utilizadas culturas comerciais liofilizadas fornecidas pela empresa Clericci-Sacco®, Cadorago – Itália. As linhagens utilizadas foram de *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus plantarum* BG112.

### 4.2 METÓDOS

#### 4.2.1 Cultura

A cultura liofilizada foi acrescentada em extrato de soja (0,1 g.100 mL<sup>-1</sup>) contendo 200 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. A cultura foi dividida em porções de 10 mL com contagem inicial de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e congelada a -23 °C para posterior utilização.

#### 4.2.2 Preparo da Amostra

Para produção do extrato de soja foi utilizada metodologia descrita por Ciabotti et al. (2007) e Rossi et al. (2004) com algumas modificações.

Primeiramente, os grãos de soja foram lavados e permaneceram em hidratação em água destilada (1:6 m/v) por 16 horas. Em seguida os grãos foram triturados por 10 minutos e filtrou-se para separar o extrato de soja e *okara*. O *okara* (umidade inicial ± 70%) foi seco em estufa com circulação de ar à 50 °C por 24 horas. Após este período foi triturado em moinho e padronização em peneira (mesh 20) e designado a partir deste momento como

farinha de *okara*. Ao extrato de soja foi adicionado 30 g.L<sup>-1</sup> de farinha de *okara*, sendo o pH ajustado de acordo com o planejamento experimental e posteriormente pasteurização a 98 ± 2 °C por 5 minutos, seguindo para o resfriamento com banho de gelo até temperatura de 45 °C.

#### 4.2.3 Composição centesimal

A avaliação da composição centesimal foi realizada seguindo as metodologias descritas pela AOAC (2006). Determinaram-se os teores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade. Os carboidratos foram obtidos por diferença.

#### 4.2.4 Fermentação

Para a fermentação foi adicionado 1 mL de inóculo contendo 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> a 100 mL de extrato de soja contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de farinha de *okara*.

Os parâmetros de fermentação com *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus plantarum* BG112 foram estabelecidos mediante testes preliminares. Posteriormente, aplicou-se o delineamento central composto rotacional (DCCR). Os valores para cada variável foram ajustados de acordo com os dados apresentados na Tabela 1 para cada microrganismo, contendo as variáveis codificadas ( $x_1$ ,  $x_2$ ) e as variáveis descodificadas ( $X_1$  = Temperatura de fermentação,  $X_2$  = pH inicial extrato de soja e farinha de *okara*).

Os modelos foram validados experimentalmente através de execução em triplicata dos ensaios com as melhores respostas e comparação da média dos resultados obtidos com o resultado estimado utilizando o teste t-Student ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1- Variáveis codificadas e descodificadas no planejamento fatorial ( $2^2$ ) para fermentação.

Tratamento	Codificadas		Descodificadas	
	$x_1$	$x_2$	$X_1$	$X_2$
1	-1	-1	31	6
2	1	-1	43	6
3	-1	1	31	8
4	1	1	43	8
5 (C)	0	0	37	7
6 (C)	0	0	37	7
7 (C)	0	0	37	7

\*  $X_1$  - temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $X_2$  - pH inicial

#### 4.2.5 Contagem de Bactérias Lácticas Totais

A contagem de bactérias lácticas totais foi realizada em meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe, HiMEDIA laboratories, Mumbai, Índia), plaqueadas em profundidade e incubadas em aerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 72 h (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

#### 4.2.6 Determinação e quantificação de Isoflavonas por *CLUAE* (cromatografia líquida de ultra eficiência).

Os extratos para quantificação de isoflavonas foram obtidos segundo Carrão-Panizzi, Favonni, Kikuchi (2002) e Yoshiara et al. (2012). As amostras liofilizadas (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterode am Harz, Alemanha) foram desengorduradas com hexano na proporção 1:10 (p/v) por 60 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Para extração de isoflavonas, 300 mg da amostra foram colocados com 6 mL de solvente extrator composto por água, etanol e acetona (1:1:1 v/v/v). Agitou-se a amostra com o solvente a cada 15 minutos por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo para banho ultrassônico

por 15 min e centrifugação (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) a 8000 x *g* a 4 °C, filtrando o sobrenadante em filtros Millex – LH (0,20 µm).

As condições cromatográficas utilizadas para a separação e quantificação de isoflavonas foram as descritas por Yoshiara et al. (2012), tendo uma coluna de fase reversa modelo Acquity UPLC BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm, partículas de 1,7 µm), em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (Waters, Acquity) e injetor automático de amostras. Para a separação, foi utilizado sistema com gradiente binário com fase inicial de 90% de H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. Após 8 minutos de eluição foi atingida uma proporção de 0% H<sub>2</sub>O e 100% acetonitrila, retornando aos 9 minutos para as condições iniciais, com um tempo total de corrida de 10 minutos. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL.min<sup>-1</sup> a temperatura de 35 °C. Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos (Waters, Acquity) ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação das isoflavonas ocorreu por comparação com curvas individuais de padrões de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína, acetil-daidzina, acetil-glicitina e acetil genistina (Sigma-Aldrich), malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina (Wako Pure Chemical Industries, Japan). A quantificação por padronização externa foi feita utilizando como referência as curvas dos padrões, sendo expressos em µmol / g em base seca desengordurada.

#### 4.2.7 Compostos Fenólicos Totais

Os extratos foram obtidos adaptando metodologia descrita por Adom e Liu (2002) e Hung et al. (2009). Os extratos permaneceram a -22 °C até seu uso. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais utilizou-se a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações, utilizando 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 10 %, 0,5 mL dos extratos das amostras e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5 %, permanecendo em repouso por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo para leitura em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom®, Cambridge, UK) a 760 nm. A

quantificação foi realizada por meio de curva padrão com ácido gálico (0,1 – 0,5 mM) e o resultado expresso em equivalente de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.8 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH<sup>•</sup>

A capacidade de sequestrar radicais DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi realizada segundo Brand-Williamns, Cuvelier, Berset (1995), onde 50 µL dos extratos das amostras foram adicionados a 1 ml de tampão acetato (100 mM, pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução de DPPH<sup>•</sup> 250 µM, sendo armazenada no escuro por 30 minutos e lidas em espectrofotômetro UV-visível (Libra S22, Biochrom®, Reino Unido) a 517 nm. Para a quantificação dos extratos, foi utilizada curva padrão de Trolox (100 a 1000 µM; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), sendo os resultados expressos em µmol de Trolox/g de amostra em base seca.

#### 4.2.9 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>

A capacidade de sequestrar o cátion radical livre ABTS<sup>•+</sup> (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi determinada pela metodologia descrita por Sanches-Gonzales, Jimenez-Escrig, Saura-Calixto (2005). Para análise foi preparada solução ABTS 7mM e persulfato de potássio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) 2,45 mM. Aproximadamente 16 horas antes da análise em ambiente escuro foram adicionados para reagir 5 mL da solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,45 mM). Esta solução foi diluída com etanol absoluto até apresentar absorvância  $0,700 \pm 0,020$  a 730 nm. A reação foi obtida pela junção de 30 µL da amostra a 3 mL da solução diluída de ABTS<sup>•+</sup>. Após 6 minutos de reação as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-visível (Libra S22, Biochrom®, Reino Unido) a 730 nm. A quantificação foi feita com base na curva padrão de Trolox (100 a 2000 µM; SIGMA Aldrich Chemie,

Steinheim, Alemanha), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ g de amostra em base seca.

#### 4.2.10 Atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP•

O poder de redução dos extratos foi realizado de acordo com Benzie, Strain (1996), com algumas modificações. O reagente FRAP é uma combinação de 2,5 mL de uma solução TPTZ 10 mM em HCl 40 mM, 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM e 25 mL de tampão de acetato 0,3 mM pH 3,6 sendo utilizado imediatamente após o seu preparo. Para a avaliação da capacidade antioxidante uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio acrescentados 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP preparado previamente. Após a homogeneização em agitador de tubos, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e a leitura da absorvância realizada em 595 nm. Soluções com diferentes concentrações de Trolox foram utilizadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra.

#### 4.2.11 Atividade de proteção contra a Oxidação do DNA

A capacidade de proteção dos extratos contra a oxidação do DNA foi realizada seguindo metodologia descrita Marrazza et al. (2013) com algumas modificações. 10  $\mu\text{L}$  de cada extrato e 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial foram adicionados a 10  $\mu\text{L}$  de reagente de Fenton (100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,1 mM ácido acético e 1,6 mM  $\text{FeCl}_3$ ) e incubados a 30 °C por 1 hora. DNA plasmidial tratado e não tratado com o reagente de Fenton foram utilizados como controle. Após a incubação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel contendo 1% de agarose a 65 V – 20 mA, sendo exposto em luz UV.

#### 4.2.12 pH e Acidez Titulável

O pH das amostras foi determinado utilizando-se potenciômetro digital (Hanna, HI 223). Para a determinação da acidez titulável das amostras utilizou-se o método da AOAC (2006) por meio de titulação com NaOH 0,1M. O resultado foi expresso em g de ácido láctico.100 g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.13 Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE)

A atividade inibitória sobre ACE foi realizada de acordo com a metodologia de Donkor et al. (2007) e Elfahri et al. (2014). A extração consistiu na adição de 20g da amostra em 5 mL de ácido tricloroacético TCA 0,75% sendo submetida à centrifugação 4000 (x g) a 4 °C por 30 minutos, ajustou-se o pH do sobrenadante para 8,3. Adicionou-se 20 µL do sobrenadante a 200 µL de HHL (Sigma) dissolvido em tampão borato de sódio pH 8,5. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL da solução ACE (Sigma), seguindo para incubação a 37 °C por 30 min. O término da reação foi realizado com a adição de 250 µL de ácido clorídrico (HCL) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 1,7 mL de acetato de etila. A camada de acetato de etila foi evaporada e o resíduo contendo ácido hipúrico foi redissolvido em 1 mL de água deionizada, seguindo para leitura a 228 nm em espectrofotômetro, utilizando água como branco. A inibição dada em porcentagem foi obtida por meio do cálculo a seguir:

$$\text{Atividade inibitória sobre ACE (\%)} = [1 - (C-D)/(A-B)] \times 100$$

Onde A: absorvância de ACE e tampão; B: absorvância do tampão; C: absorvância ACE + amostra + tampão; D: absorvância amostra e tampão.

#### 4.2.14 Ácidos Orgânicos

Os extratos foram obtidos segundo Donkor et al. (2007), pela mistura de 3 mL de amostra a 50 µL de ácido nítrico 15,5 mol.L<sup>-1</sup> e com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol.L<sup>-1</sup>), sendo centrifugadas a 14.000 (x g) por 30 min (Centrífuga 5804R – Alemanha). O sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante 0,20 µm (Millipore Corporation, MA, EUA).

A quantificação de ácido láctico e ácido acético foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, Japão), constituído por Bomba de alta pressão LC- 20AT, Injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de Refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica Shiseido CapCell Pak 5 $\mu$  C18 MG 250 x 4,6mm. A fase móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o volume de injeção em 20  $\mu$ L. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de Índice de Refração (RID-10A) e Arranjo de Fotodiodos (SPD-M20A), programado em comprimento de onda fixo de 215 nm e no modo de varredura de 200 a 400 nm. A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (REUTER, 2015).

#### 4.2.15 Simulação in vitro da Sobrevivência Nas Condições Gastrointestinais

A análise seguiu a metodologia descrita por Nejati et al. (2011). Primeiramente 1 grama de amostra foi colocado em 10 mL de solução salina 0,5 %, ajustando o pH entre 1,4 – 1,9 com solução de HCL 0,5 M, adicionando-se as enzimas pepsina e lipase de modo a atingir na amostra a concentração de 3 g/L e 0,9 mg/L respectivamente, seguindo para incubação por 2 horas a 37 °C e posterior plaqueamento. Na segunda fase o pH da amostra foi ajustado para 4,3 – 5,2 com solução alcalina (150 ml de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> + 14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), adicionando as soluções de bile e pancreatina atingindo as concentrações na amostra de 10 g/L e 1 g/L respectivamente, mantendo-se a 37 °C por 2 horas, seguindo para o plaqueamento. Na terceira e última fase, o pH foi ajustado para 6,7 – 7,5 com a solução alcalina e adicionado novamente bile e pancreatina, mantendo-se a 37 °C por 2 horas, seguindo para o plaqueamento. Os resultados foram expressos em log UFC.g<sup>-1</sup> de amostra.

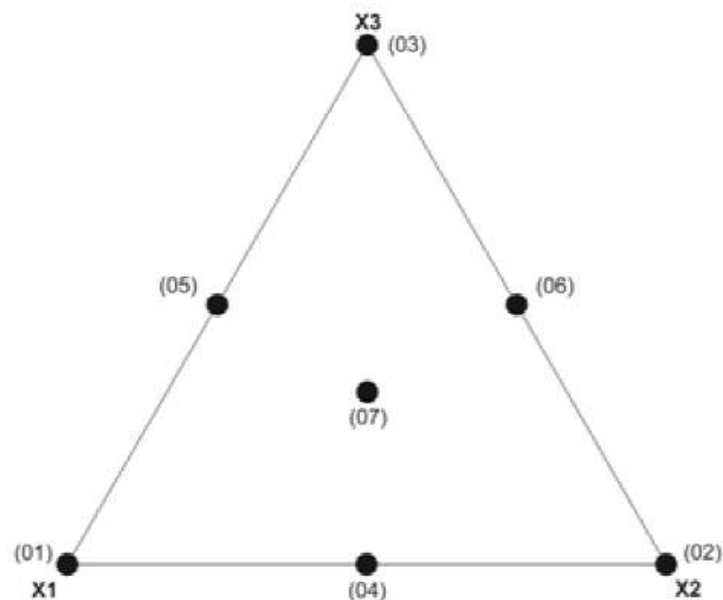
#### 4.2.16 Cor

A avaliação da cor foi realizada utilizando colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65. Os valores de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (componente vermelho-verde) e  $b^*$  (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB (Caldeira et al., 2010).

#### 4.2.17 Planejamento de misturas simplex-centróide

Para a otimização da produção de molho cremoso probiótico de soja foi utilizado o planejamento de misturas simplex-centróide. As combinações utilizadas estão representadas pela figura 5. Os vértices (1, 2, 3) representam os componentes puros, os lados as misturas binárias (4, 5, 6) e o ponto central (7) a mistura dos 3 componentes.

Figura 5. Planejamento de mistura tipo simplex-centróide.



As variáveis estudadas (Tabela 2) foram  $X_1$ : Goma Guar;  $X_2$ : Goma Xantana;  $X_3$ : Amido pré-gelatinizado de mandioca, com contração máxima de

0,3 g.100g<sup>-1</sup> de amostra, tendo como respostas: viscosidade, capacidade de retenção de água e firmeza.

Tabela 2 – Planejamento experimental simplex-centróide para o desenvolvimento de molho cremoso probiótico de soja.

Tratamento	Codificadas*			Descodificadas**		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	1,00	0,00	0,00	0,5	0	0
2	0,00	1,00	0,00	0	0,5	0
3	0,00	0,00	1,00	0	0	0,5
4	0,50	0,50	0,00	0,25	0,25	0
5	0,50	0,00	0,50	0,25	0	0,25
6	0,00	0,50	0,50	0	0,25	0,25
7	0,33	0,33	0,33	0,16	0,16	0,16
8	0,33	0,33	0,33	0,16	0,16	0,16
9	0,33	0,33	0,33	0,16	0,16	0,16

\*x<sub>1</sub>: Goma Guar; x<sub>2</sub>: Goma Xantana; x<sub>3</sub>: Amido pré-gelatinizado de mandioca

\*\* X<sub>1</sub>: g de Goma Guar. 100 g<sup>-1</sup>; X<sub>2</sub>: g de Goma Xantana. 100 g<sup>-1</sup>; X<sub>3</sub>: g de Amido pré-gelatinizado de mandioca 100 g<sup>-1</sup>.

A produção de molho cremoso probiótico de soja seguiu metodologia descrita por Campos et al. (2009), com algumas modificações. Os ingredientes e suas respectivas proporções estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Ingredientes para a formulação de produto

<b>Ingrediente</b>	<b>Proporção (g/Kg)</b>
Extrato de soja + 3 % de Okara fermentado*	865
Óleo de Soja	100
Sal	10
Açúcar	2
Alho em pó	10
Cebola em pó	10
Amido pré-gelatinizado	
Goma Guar	3
Goma Xantana	

\*Fermentado por *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus acidophilus*.

#### 4.2.18 Capacidade de Retenção de Água (CRA).

Para a determinação da capacidade de retenção de água das amostras, seguiu-se a metodologia descrita por Ozer et al. (1998), onde 20 g da amostra foi submetida a centrifugação (HITACHI Hoki Co. Ltd, CR21, Japão) a 13.500(x g) por 30 min a 10 °C. Após esta etapa, o soro liberado foi coletado e pesado. A capacidade de retenção de água foi expressa em % (m/m).

#### 4.2.19 Viscosidade

A viscosidade foi determinada seguindo a metodologia proposta por Baú (2014) com algumas modificações. Utilizando viscosímetro digital *Brookfield*, com *spindle* 4, velocidade de 12 rpm a partir de 300 mL de amostra e mantida à temperatura de refrigeração (5 °C) por 12 h após homogeneização para a realização das leituras.

#### 4.2.20 Firmeza

Para análise de firmeza as formulações foram submetidas ao texturômetro TA-XT2i (*Stable Micro Systems*), utilizando probe cilíndrico de acrílico P 25/L, profundidade de compressão de 20 mm, velocidade de compressão do sensor de 2mm/s, força de *trigger* de 0,05 N. Para a realização dos testes, primeiramente as formulações foram acondicionadas em recipientes de 100 mL após homogeneização, sendo analisadas após 12 h de repouso sob refrigeração (BAÚ, 2014).

#### 4.2.21 Análise Sensorial

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, para posterior realização da análise sensorial (Número do parecer: 754.881, CAAE: 33609014.4.0000.5231).

A avaliação sensorial da melhor formulação de molho cremoso de soja probiótico desenvolvido foi realizada em cabines individuais, com luz branca e as amostras servidas em torradas em quantidades padronizadas e codificadas com números aleatórios. Para todas as amostras foi assegurada a inocuidade, sendo fornecidas apenas após as análises microbiológicas.

Para a avaliação sensorial, foram utilizados 89 avaliadores não treinados (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004), de ambos os sexos, constituídos de alunos, professores e funcionários da UEL, sendo selecionados após a coleta de dados e seu consentimento assegurado pelo termo que se encontra anexado (anexos 2,3). Os avaliadores atribuíram notas para os seguintes parâmetros: cor, sabor, textura, aroma, aparência e aceitação global. Utilizando escala hedônica de 9 pontos.

Por ser um produto probiótico podem ocorrer benefícios associados ao consumo destes microrganismos, como um menor tempo de trânsito intestinal. Entretanto o consumo também pode ocasionar desconfortos abdominais, mesmo que raramente, como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após o consumo do produto.

#### 4.2.22 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação de médias ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o software Statistica 7.0.

## REFERÊNCIAS

ABIR – Associação das Indústrias Brasileiras de Refrigerantes e bebidas não Alcoólicas. **Dados de mercado de 2011**. Consumo de todas as bebidas comerciais. Disponível em: <<http://abir.org.br/2011/10/24/dados-de-mercado-2011/>>. Acesso em 08 jul de 2016.

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, P. 6182-6187, 2002.

AMIN, I.; MUKHRIZAH, O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 778–784, 2006.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2 de 07 Janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional ou de saúde. Acesso em: 20 de Jun de 2014.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International - Volume I and II, 18th Edition, Rev. 1, 2006.

APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Análises físico-químicas de pré-misturas de pães de queijo e produção de pães de queijo com adição de okara. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.1416-1422, 2007.

BAÚ, T. R. Desenvolvimento, caracterização e estabilidade de produto de soja fermentado com cultura de Kefir e adição de fibras. 2012, p.130. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

BENEDETTI, A.C. E. P.; FALCÃO, D. P. Monitoramento da qualidade higiênico sanitária no processamento do leite de soja na Unisoja. **Revista e Ciência de Tecnologia em Alimentos**, v. 23, p. 200-205, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substância bioativas e probióticos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em 27 de Maio de 2013.

BEASLEY, S.; TUORILA, H.; SARIS, P. E. J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 159–162, 2003.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric reducing ability of plasma (PLASMA) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70 -76, 1996.

BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**. FAO agricultural services bulletin Nr 97. Rome: Food and Agriculture Organization of the united Nations. 186 p. 1992.

BLAGDEN, D.; GILLILAND, S.E. Reduction of levels of volatile components associated with the “beany” flavor in soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 186–189, 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 652-659, 2006.

Brand-Williams, W; Cuvelier, M. E; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 28, 25-30, 1995.

CALDEIRA, L. A.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. D.; MAGNAVITA, A.P.S.; SANTOS, T. D. R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência rural**, 40, 2193-2198, 2010.

CAMPOS, D. C. P.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S. C.; FELBERG, I. Molho cremoso à base de extrato de soja: estabilidade, propriedades reológicas, valor nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 916 – 926, 2009.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 515-518, 2002.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Melhoramento genético da soja para a obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 15, p. 330 – 340, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 515-518, 2002.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 35, p. 873 -878, 2009.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.; DEMIATE, I.M. **Amidos modificados**. In: Processamento de amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, p.246-332, 2003.

CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; CIRILLO, M. A.; PINHEIRO, A. C. M. Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 346-353, 2009.

CHEN, H.L.; LU, Y.H.; LIN, J.; KO, L.Y. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. **Nutrition Research**, v.20, p. 1725–1733, 2000.

CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. **Food Chemistry**, v. 154, p. 108 - 116, 2014.

CHEN, S. T.; YANG, H. Y.; HUANG, H. Y.; PENG, S. J.; CHEN, J. R. Effects of various soya protein hydrolysates on lipid profile, blood pressure and renal function in five-sixths nephrectomized rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 9 -22, 2006.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008.

CORREA, C. R.; LI, L.; ALDINI, G.; CARINI, M.; CHEN, O.; CHUN, H. K.; CHO, S. M.; PARK, K. M.; RUSSEL, R. M.; BLUMBERG, J. B.; YEUM, K. J. Composition and Stability of Phytochemicals in five varieties of black soybeans (Glycine max). **Food Chemistry**, p. 1176-1184, 2010.

COTRELL, I.; KANG, K.; KOVACS, P. **Xanthan gum**. In: Handbook of water-soluble gums and resins, 1980.

CRUZ, N.S.; CAPELLAS, D.P.; JARAMILLO, A.J.; TRUJILLO, B.; GUAMIS, V.; FERRAGUT, V. Soymilk treated by ultra high pressure homogenization: acid coagulation properties and characteristics of a soy yogurt product. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.490-496, 2009.

CUBERO, N.; MONFERRER A.; VILLALTA, J. **Aditivos Alimentarios**. Mundi-Prensa Libros, Madrid, (2002).

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 4.ed, 2010.

DEMIATE, M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 388 – 397 , 2011.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945 -954, 2009.

DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. **Semina**, v. 25, p. 15-28, 2004.

Dornas, W.C.; Oliveira, T.T.; Rodrigues-das-Dores, R.G.; Santos, A.F.; Nagem, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 241- 249, 2007.

Donkor, O. N.; Shah, N. P. Produciton of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Food Microbiology and Safety**, v. 73, p. 15 -20, 2008.

Donkor, O. N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N. P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk, v. 87, 21-38, 2007.

DWYER, J. T.; GOLDIN, B. R.; SAUL, N.; GUALTIERI, L.; BARAKAT, S.; ADLERCREUTZ, H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. **Journal of the American Dietetic Association**, v.94, p. 739 – 743, 1994.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Soja. **Soja em números**. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/>>. Acesso em 07 de Jul de 2016.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Soja. **Soja na Alimentação**. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php?pagina=23#1](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23#1)>. Acesso em 07 de Maio de 2016.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias** v. 26, p. 71 – 82, 2005.

ELFAHRI, K.R.; DONKOR, O.N.; VASILJEVIC, T. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.38, p.37-46, 2014.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In **Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em 03 de Junho de 2013.

FICHER, M.; KOFOD, L. V.; SCHOLS, H. A.; PIERSMA, S. R.; GRUPPEN, R.; VORAGEN, A. G. J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates heat and humidity effects. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 552-556, 2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; OMOTO, T.; GOTO, Y. ASAI, I.; NISHINARI, K. Functions of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behavior of corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 15 – 24, 2005.

GIL, A.; BENGMARK, S. Control biológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. **Nutricion Hospitalaria**, v. 21, p. 73 – 86, 2006.

GLIKSMAN, M. **Food hydrocolloids**. CRC Press, v. 1 e 2, 1982.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 1-22, 2006.

GOMA GUAR. Disponível em: <[http://www.gomaguar.com.br/site/?p=noticias\\_ver&id=320](http://www.gomaguar.com.br/site/?p=noticias_ver&id=320)>. Acesso em: 10 de Maio de 2013.

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

GONERA, A.; CORNILLON, P. Gelatinization of Starch/Gum/Sugar Systems Studied by using DSC, NMR, and CSLM. **Starch**, v. 54, p. 508 – 516, 2002.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2669-2673, 2001.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R. H. B.; FERREIRA, S. H. P. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, p.613 -622, 2005.

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

HOWITZ, K. T.; SINCLAIR, D. A. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*, v. 133, p. 387 – 391, 2008.

HOWLETT, J. **Alimentos funcionais: ciência, saúde e alegações**. ILSI Europe concise monograph series. 2008.

Hung, P. V; Maeda, T; Miyatake, K; Morita; N. 2009. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, 42, 185-190.

HYMOWITZ, T. History of the soybean. In: **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática - **SIDRA: Banco de Dados Agregados**: área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto. [Rio de Janeiro, 2016]. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 1018p., 2004.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZELL, D.; DeGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v.37, p. 1112-1123, 2001.

KEENAN, J.M.; GOULSON, M.; SHAMLIYAN, T.; KNUTSON, N.; KOLBERG, L.; CURRY, L. The effects of concentrated barley beta-glucan on blood lipids in a population of hypercholesterolaemic men and women. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 1162–1168, 2007.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; VUKSAN, V.; VIDGEN, E.; PARKER, T.; FAULKNER, D. Soluble fiber intake at a dose approved by the US Food and Drug Administration for a claim of health benefits: Serum lipid risk factors for cardiovascular disease assessed in a randomized controlled crossover trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, p. 834–839, 2002.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216 – 222, 2012.

KEMGANG, T. S.; KAPILA, S.; SHANMUGAM, V. P.; KAPILA, R. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. **Journal of applied Microbiology**, v. 117, p. 303 – 319, 2014.

KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. **Journal of the Science of food and Agriculture**, v.87, p.496-503, 2007.

KIM, C.; YOO, B. Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 120 – 128, 2006.

KUMURA, K.; TANOUE, Y.; TSUKAHARA, M.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4050–4056, 2004.

LACERDA, L. G. Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

LEE, M. J. CHUNG, I. M.; KIM, H.; JUNG, M. Y. HIGH resolution LC-ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products. **Food Chemistry**, v. 176, p. 254 -262, 2015.

LEROY, F.; VUYST, L.D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

LESCANO, C. A. A. Análise da secagem de resíduo de leite de soja “okara” em secadores de leite de jorro e de cilindro rotativo assistido a microondas. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

LIONG, M. T.; SHAH, P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 55 -66, 2005.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. ITP, 1997

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2004.

LIU, K. Food Use of Whole Soybeans. In: JOHNSON, L.; WHITE, P.; GALLOWAY, R. **Soybeans: Chemistry, production, processing and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

LI, B.; QIAO, M.; LU, F. Composition, nutrition, and utilization of okara (soybean residue). **Food Reviews International**, v. 28, p. 231 – 252, 2012.

MANION, B.; CORREDIG, M. Interactions between whey protein isolate and soy protein fractions at oil-water interfaces: effects of heat and concentration of protein in the aqueous phase. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 343 – 349, 2006.

MARAZZA, J. A.; NAZARENO, M. A.; SAVOY DI GIORI, G.; GARRO, M. S. Bioactive action of  $\beta$ -glucosidase enzyme of *Bifidobacterium longum* upon

isoflavone glucosides present in soymilk. **International Journal of Food Science and Technology**, 48, 2480 – 2489, 2013.

MARUYAMA, L. Y; CARDARELLI, H. R; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo petit suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 386-393, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MATHIAS, T. R. S.; ANDRADE, K. C. S.; ROSA, C. L. S.; SILVA, B. A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Science**, v. 16, p. 12 -20, 2013.

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 91, p. 363 - 384, 2014.

MESSINA, M. Soybean isoflavone exposure does not have feminizing effects on men: a critical examination of the clinical evidence. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 2095 – 2104, 2010.

MIDDELBOS, I. S.; FAHEY, G. C. J. Soybean carbohydrates. In: **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

MILAS, M.; RINALDO, M. Conformational Investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. **Carbohydrate Research**, v. 76, p. 189 – 196, 1979.

MORAES, R. M; HAJ-ISA, N.; M. A.; ALMEIDA, T. C. A.; MORETTI, R. H.; Efeito da Desodorização nas características sensoriais de extratos hidrossolúveis de soja obtidos por diferentes processos tecnológicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 46-51, 2006.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y. K. Influência de Hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 403 – 406, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v.1054, 95–111, 2004.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KURISU, Y.; SHIMIZU, H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and Women. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 209 – 213, 1998.

NEJATI, R.; GHEISARI, H.; HOSSEINZADEH, S.; AMIN, H. Viability of encapsulated BIFIDOBACTERIUM LACTIS (BB-12) in symbiotic UF cheese and it's survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 06, p. 197-204.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de Goma Xantana a partir da fermentação de soro de leite: Rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, p. 1937 – 1941, 2008.

NIKAEDO, P.H.L.; AMARAL, F. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 397- 404, 2004.

NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. **Plant Signaling Behavior**, v.3, p. 1016 – 1018, 2008.

OLIVEIRA, A. S. Desenvolvimento de inoculante para fermentação láctica de silagens: utilização de resíduos agroindustriais. Londrina: UEL. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, 1995.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, 2002.

OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 361 – 371, 2009.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production-A Review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 363-371, 1999.

OZER, B. H; BELL, A. E; GRANDISON, A. S; ROBINSON, R. K. Rheological Properties of Concentrated Yogurt (labneh). **Journal of Texture Studies**, v. 29, p. 67-79. 1998.

PAOLILLO, R., CARRATELLI, C. R., SORRENTINO, S., MAZZOLA, N., RIZZO, A. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. **International immunopharmacology**, v. 9, p. 1265-1271, 2009.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P Conversão de Malonil-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 130-135, 2002.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja Brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 156-160, 2001.

PERUSSELO, C. A. Estudo dos parâmetros de processo e modelagem numérica da secagem do resíduo sólido da produção do extrato hidrossolúvel de soja (Okara). PUC. Paraná. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), 2008.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Substâncias bioativas em alimentos funcionais**. São Paulo: Varela, 2005.

PHILLIPS, G.O., WILLIAMS, P.A. **Handbook of Hydrocolloids**. Woodhead Publishing, Cambridge, 2000.

RAPAILLE, A.; VANHEMELRIJCK, J. Modified Starches, in **Thickening and Gelling Agents for Food**, pg. 199 – 229, 1997.

REQUENA, T. PELÁEZ, C. Revisión: actividad antimicrobiana de bacterias lácticas, producción de bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 31, p. 19-44, 1995.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.

ROBINSON, R.K. **Therapeutic properties of fermented milks**. New York: Elsevier, 186p, 1991.

ROJAS, J.A.; ROSELL, C.M.; DE BARBER, C.B. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 27-33, 1998.

ROSA, A. M.; CLAVISO, J.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Alimentos fermentados a base de soja (Glycine Max (Merril) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados as isoflavonas e seus açúcares. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 7, p. 454-462, 2009.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L. M. C.; CABRAL, L. C.; FARIAS, C. A. A.; DOMINGUES, A. M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **Food Control**, v. 14, p. 187 – 192, 2003.

ROSSI, E. A. ROSIER, I; DAMASSO, A.R.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; ABDALA, D.S.P.; TALARICO, V.H.; MINTO, D.F. Determinação de Isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de Soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 93-99, 2004.

ROSTAGNO, M. A.; ARAÚJO, J.M.A.; SANDI, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v.78, p.111-117, 2002.

ROUDSARI, A. H.; TAHBAZ, F.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; ARJMANDI, B.; LARIJANI, B.; KIMIAGAR, S. M. Assessment of soy phytoestrogens' effects on bone turnover indicators in menopausal women with osteopenia in Iran: a before and after clinical Trial. **Nutrition Journal**, 2005.

RUTENBERG, M. W.; SOLAREK, V. Starch derivatives: production and uses. In: **Starch: chemistry and technology**. 2nd ed. Academic Press, 1984. p. 312-388

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; & MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SANCHEZ-GONZALES I, JIMENEZ-ESCRIG A, SAURA-CALIXTO F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). **Food Chemistry**, v.90, p. 133–139, 2005.

SERENO, N.; HILL, S.; MITCHELL, J. Impact of extrusion process on xanthan gum behavior. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1333- 1342, 2007.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, v.134, p.1333-1343, 1998.

SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, p.1219-1227, 2002.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, 2006.

SINGLETON, V.L., ROSSI J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144-158, 1965.

SHAH, P; P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262 - 1277, 2007.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p. 413 – 434, 2010.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Alimentos "Funcionais": Conceitos, contextualização e regulamentação. Ed. Templo, p.246, 2007.

STIPP, E. J. Efeito de aditivos sobre a fermentação láctica desenvolvida por *Lactobacillus acidophilus*. Trabalho de conclusão de curso (TCC), Universidade Estadual de Londrina, 1996.

TENSIRIPONG, T.; PONGSAWATMANIT, R.; IKEDA, S.; NISHINARI, K. Influence of xyloglucan on gelatinization and retrogradation of tapioca starch. **Food hydrocolloids**, v. 19, p. 1054 – 1063, 2005.

TORO-NUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M. C. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilised soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. **Food Chemistry**, v. 167, p. 78 -83, 2015.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 55-62, 2001.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de Bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.29, p. 83-104, 2008.

VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F.; BOTTAZZI, V. Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*: a review. **Annual Microbiology and Enzimology**, v. 43, p. 261-284, 1993.

VILLANUEVA, M.J.; YOKOYAMA, W.H.; HONG, Y.J.; BARTTLEY, G.E.; RUPÉREZ, P. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry**, v. 124, p.72-79, 2010.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, p. 497-505, 1999.

XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in woman. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2307 – 2315, 1995.

ZAGO, M.; FORNASARI, M. E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUAREX, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v.28, p.1033-1040, 2011.

WALKER, W. A. Mechanisms of action of probiotics. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. S87 –S91, 2008.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; YANG, H.Y.; CHOU, C.C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. **Food Microbiology**, v.20, p.333-338, 2003.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V.; CARREON, E. Physicochemical and sensory properties of corn tortillas made from nixtamalized corn flour fortified with spent soymilk residue (okara). **Journal of Food Science**, v. 67, p. 3194-3197, 2002.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, p. 642, 1993.

YAN-CHUN, L.; HUAN-LU, S.; XIN, L.; LIANG, W.; SHUN-TANG, G. Influence of Blanching and Grinding Process with hot water on Beany and non-Beany flavor in Soymilk. **Journal of food science**, v. 76, 2011.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 63, p. 978-986, 2012.

## **8. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos foram redigidos na forma de três artigos científicos conforme apresentados nas próximas páginas. Estes seguiram as normas de publicação dos respectivos periódicos.

## 8.1 Artigo Científico 1

### **Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour**

**Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Garcia, S.**

**Situação:** Publicado - *LWT- Food Science and Technology*

## Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour

Moraes Filho, M. L.<sup>1,2</sup>; Busanello, M.<sup>1</sup>; Garcia, S.<sup>1</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

2. Correspondence: Marsilvio Lima de Moraes Filho, Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brazil. Tel/Fax:+55 043 33714080. E-mail: marsilviolimafilho@gmail.com

keywords: byproduct, DNA oxidation, isoflavones, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*.

### Abstract

The soybean and its derivatives contain many compounds of biological interest. These compounds comprise a food matrix suitable for the incorporation of probiotic microorganisms. This study aimed to establish the optimal conditions of pH and temperature of soymilk containing 3% (w/v) of okara flour for the growth of *Lactobacillus plantarum* BG112 and *Lactobacillus acidophilus* LA3 using a central composite rotational design (CCRD). The optimized conditions were used for the analysis of total phenolic compounds, isoflavone aglycones, antioxidant activity, protection against DNA oxidation, pH, acidity and growth during 72 hours of fermentation. The maximal response is in the central point for *Lactobacillus plantarum* BG112 and *Lactobacillus acidophilus* LA3, with correlation coefficients of approximately 0.85 obtained for each microorganism. The 24 and 48 hour fermentation times for LP BG112 and LA3 showed counts above 9.5 log CFU.g<sup>-1</sup> of sample with averages of 6.23 and 6.15 µmol.g<sup>-1</sup> of total isoflavone aglycones, respectively. The antioxidant activity measured by DPPH● and ABTS +● assays resulted in the average values of 0.288 and 1.14 µmol.mL<sup>-1</sup> of sample (LPBG 112) and 0.260 and 1.08 µmol.mL<sup>-1</sup> of sample (LA3). All fermented samples showed the ability to protect plasmidial DNA against oxidation.

## 1. Introduction

The soybean is a grain originating in Asia and has been consumed for thousands of years (Chen *et al.*, 2012). It is a non-animal source of high-quality protein due to its high content and composition of amino acids (Chen *et al.*, 2012; Ficher *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002). Consumption of soybeans may occur in their whole natural form and/or in its derivatives, which include soymilk, tofu, soy sauce, tempeh (Chen *et al.*, 2012).

Among the different products obtained from soybeans, soymilk can be obtained as a drink from soybeans through the following steps: hydration, maceration, milling and filtration (Moraes *et al.*, 2006; O'Toole, 1999). Soymilk can be consumed naturally or added to other ingredients, serving as a base for making other products such as soy yogurt and tofu (Cruz *et al.*, 2009; O'Toole, 1999). In addition, soymilk is an alternative for consumers who cannot consume milk because of dietary restrictions or who are required to follow specific diets (Bao *et al.*, 2012). The okara is the solid byproduct obtained after the filtering step. This product has a high nutritional quality and is a source of phenolic compounds and fibers (Bowles & Demiate, 2006; O'Toole, 1999; Pinto & Castro, 2008). However, its rate of reuse is still low and is intended almost exclusively for animal feed (Pinto & Castro, 2008).

The consumption of soy and its derivatives promotes health and confers benefits on its consumers such as a reduced risk of cardiovascular diseases, prevention of osteoporosis and inhibition of the proliferation of cancers (Chen *et al.*, 2012; Liu, 1997; Nautiyal *et al.* 2008). These benefits are associated with the presence of compounds such as phytosterols, saponins and isoflavones (Liu, 1997). There are 12 forms of isoflavones found in soy foods, as follows: the  $\beta$ -glycosidic forms with a glucose molecule attached to the benzene ring (daidzin, genistin and glycitin), the malonyl- and acetyl-conjugated forms (acetyl daidzin, acetyl glycitin, acetyl genistin, malonyl daidzin, malonyl genistin and malonyl glycitin) and aglycones (daidzein, genistein and glycitein), which are not linked to a glucose molecule (Kuo *et al.*, 2006; Liu, 1997). The isoflavone forms found in soy products are related to the soybean growing conditions and the process used in the preparation before consumption

(Liu, 1997). The fermentation by different microorganisms is important for the conversion of isoflavones and for product acceptance (Bao *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2006).

Many microorganisms used in fermentation processes are considered probiotic bacteria. They are classified as live microorganisms, the regular intake of which provides benefits to the consumer such as cholesterol reduction, inhibition of pathogenic bacteria and support to the immune system (Bao *et al.*, 2012; Donkor, O. N & Shah, 2008; Lomax & Calder, 2009). The use of probiotic bacteria in fermentation processes using different food matrices is interesting because it provides sensory and chemical changes in the matrices used. The fermented products tend to have a high content of the isoflavone aglycones depending on the capacity of the microorganisms to produce the  $\beta$ -glucosidase enzyme, promoting increased levels of isoflavone aglycones, which, in turn, increases the biological activity (Bao *et al.*, 2012; Liu, 1997; Lee *et al.*, 2005; Donkor, O. N & Shah, 2008).

The strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are included among the genera classified as probiotics. Both are used in the production of fermented products because they are safe for consumption (Gomes & Malcata, 1999; Zago *et al.*, 2011). *Lactobacillus plantarum* is characterized as a heterofermentative lactic acid bacterium, resistant to passage through the gastrointestinal tract and widely used in fermented vegetables (Bao *et al.*, 2012; Zago *et al.*, 2011). Furthermore, *Lactobacillus acidophilus* is considered to be a homofermentative species and is resistant to bile (Gomes & Malcata, 1999). Both microorganisms are considered probiotic bacteria and are widely studied and used in the manufacture of different products. However, despite belonging to the same genus, each species has distinct characteristics that influence its activity during the fermentation process (Gomes & Malcata, 1999; Zago *et al.*, 2011).

The objective of this study was to optimize the parameters of pH and temperature during the fermentation process by *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Lactobacillus plantarum* BG112 in soymilk containing 3% (w/v) okara flour, using a central composite rotational design (CCRD) and bacterial growth as the response function. Under the optimized conditions, the physicochemical

properties were characterized over the course of 72 hours, emphasizing the conversion of isoflavones glycosides to aglycones and their antioxidant activity.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Soybeans**

The soybean cultivars BRS 257 were donated by the company Sementes Paraná Ltda., Mauá da Serra, PR, Brazil from the 2012/2013 harvest (approximate composition [w/w]: 10.58% moisture, 4.54% ash, 38.35% protein, 17.0% lipids and 29.53% carbohydrates). The soybean composition was determined by the authors using the method of AOAC (2006) methods. Carbohydrate content was obtained by difference.

### **2.2 Culture**

The starter cultures of *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Lactobacillus plantarum* BG112 were provided by the company Clerici-Sacco®, Cadorago – Italy. The cultures were activated (0.1% w/v) in sterile soymilk containing 20% glycerol ( $\cong 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) and divided into portions of 10 mL, which were kept frozen at - 23°C until use.

### **2.3 Soymilk, okara flour production and fermentation conditions**

The soymilk was obtained by the method described by Rossi *et al.* (2004) and Ciabotti *et al.* (2009) with some modifications. The grains, in a ratio of 1:6 (w/v) with water, were hydrated for 16 hours at 5°C, followed by grinding for 10 minutes and filtering, separating the soymilk and okara. The okara produced was dried in an air-circulation oven at 50°C for 24 hours, followed by grinding and sieving (20 mesh) to obtain the okara flour. Three percent okara flour (w/v) was added to the soymilk and the pH was adjusted according to the values in the experimental design (CCRD), using a sodium hydroxide solution (5 M) and acetic acid solution 10% (v/v), pasteurizing the samples at  $98 \pm 2^\circ\text{C}$

for 5 minutes in glass flasks. The samples were cooled in ice bath (about 35°C) and added 1% inoculum (v/v). Aerobic conditions were used without agitation. The temperature control was made according to each point of the design using the digital display of the equipment and thermometers placed inside.

## 2.4 Central Composite Rotational Design

The fermentation parameters applied to the CCRD were established by preliminary tests. To evaluate the fermentation parameters with LA3 and LP BG112 in terms of bacterial growth, CCRD was applied with two variables and replicates at the central point. The fermentation time was 24 hours, choose by preliminary tests for this part of the study. The coded independent variables ( $x_1$ ,  $x_2$ ) and uncoded variables ( $X_1 = \text{°C incubation}$ ,  $X_2 = \text{initial pH}$ ) are shown in Table 1.

The growth of lactic acid bacteria was evaluated by the following response function:  $Y_A$  or  $Y_P$  ( $Y_A = \log \text{CFU.g}^{-1}$  of sample for LA3 and  $Y_P = \log \text{CFU.g}^{-1}$  of sample for LP BG112) using the following model equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$$

where  $Y$  is the response function,  $x_1$  and  $x_2$  are the coded variables and the  $\beta$  values are the estimated coefficients of each term of the response surface model.

The response functions ( $Y_A$ ,  $Y_P$ ) were used to perform regression analysis and analyses of variance (ANOVA). Response surface graphs were generated for each response function; all running analysis and response surfaces were performed with Statistica 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, USA). The proposed models were validated by performing new tests in triplicate, and the results were validated compared to the estimated response by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

Table 1. CCRD for fermentation with *Lactobacillus acidophilus* LA3 or *Lactobacillus plantarum* BG112 and response functions  $Y_A$  and  $Y_P$ .

Assays	Coded Variables		Uncoded Variables				Response Functions	
	$X_1$	$X_2$	$X_1$		$X_2$		$Y_A$	$Y_P$
			LA3	LP BG112	LA3	LP BG112		
1	-1,00000	-1,00000	25	31	4	5	8,30	8,90
2	-1,00000	1,00000	25	31	6	7	8,14	9,97
3	1,00000	-1,00000	37	43	4	5	7,83	8,88
4	1,00000	1,00000	37	43	6	7	8,85	9,14
5	-1,41421	0,00000	22,5	28,5	5	6	7,91	8,94
6	1,41421	0,00000	39,5	45,5	5	6	8,42	9,11
7	0,00000	-1,41421	31	37	3,6	4,6	7,14	8,60
8	0,00000	1,41421	31	37	6,4	7,4	9,04	9,46
9	0,00000	0,00000	31	37	5	6	9,11	9,56
10	0,00000	0,00000	31	37	5	6	9,17	9,82
11	0,00000	0,00000	31	37	5	6	9,40	9,72

$X_1$ : ° C of incubation;  $X_2$ : initial pH; LA3 - *Lactobacillus acidophilus* e LP BG112 - *Lactobacillus plantarum*;  $Y_A$  or  $Y_P$ : *Lactobacillus acidophilus* LA3 count or *Lactobacillus plantarum* BG112 count expressed in log CFU. g<sup>-1</sup> of sample.

## 2.5 Counts of probiotics

LA3 and LP BG112 counts were determined following the method described by Vinderola & Reinheimer (1999). MRS agar was used and incubated aerobically at 37°C for 72 hours.

## 2.6 Extraction and quantification of isoflavones

The extracts for the quantification of isoflavones were obtained according to Carrão-Panizzi, Favonni, Kikuchi (2002) and Yoshiara et al. (2012). Freeze-dried samples (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterodeam Harz, Germany) were degreased with hexane. For the extraction, 300 mg of the sample was incubated with 6 mL of extraction solvent, which consisted of water, ethanol and acetone (1:1:1 v/v/v) for 1 hour at room temperature. The samples

were sonicated (Unique Ultrasonic Cleaner USC 1400, Sto. Amaro, Brazil) for 15 min and centrifuged at 8000 x g for 15 min at 4°C, followed by filtering the supernatants through a 0.20 µm membrane (Millex – LH) into UPLC vials.

The chromatographic conditions for the separation and quantification of isoflavone aglycones included the use of the reverse-phase column model Acquity UPLC BEH C18 (Waters, 2.1 mm x 50 mm, particle size of 1.7 µm), UPLC® with the PDA detector adjusted to a wavelength of 260 nm. A binary gradient system was used with an initial phase of 90% water acidified with glacial acetic acid (pH 3.0) and 10 % acetonitrile. After 8 minutes of elution, an eluent with a percent ratio of 0 % water and 100 % acetonitrile was used, returning in 9 minutes to the initial conditions and ending the run after 10 more minutes. The mobile-phase flow rate was 0.70 mL.min<sup>-1</sup> at 35°C. The identification and quantification of isoflavone aglycones was performed by comparison with the curves of the following individual standards: daidzein, glycitein and genistein (Sigma–Aldrich). The results were expressed in µmol.g<sup>-1</sup> on a dry basis after degreasing.

## **2.7 pH and titratable acidity**

pH measurements were made with a digital pH meter (Hanna, HI 223), and acidity measurements were made via titration with a 0.1 M NaOH solution. The results were expressed in g of lactic acid.100 g<sup>-1</sup> of sample (AOAC, 1990).

## **2.8 Total phenolic compounds**

The extracts were obtained by adapting the method described by Satir & Guzel - Seydim (2015). Aliquots of 30 mL of fermented sample were collected. The pH was adjusted to 4.5 using a sodium hydroxide solution (5 M) or acetic acid solution (10% v/v), followed by centrifugation at 5000 x g for 10 min at 5°C. The supernatants were collected, filtered through a 0.45 µm filter and kept at -23°C until use.

For quantification of the total phenolic compounds, the method described by Singleton & Rossi (1965) was used with some modifications including the use of the Folin-Ciocalteu reagent (10%). After incubation for 1

hour at room temperature, the samples were measured on a UV-vis spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK) at 760 nm. The quantification was performed using a standard curve of gallic acid (0.1–0.5 mM). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE).mL<sup>-1</sup> of sample.

## 2.9 Antioxidant activity

The determination of the scavenging activity for DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was performed according to Brand-Williams *et al.* (1995). The absorbance was read at 517 nm in a UV-vis spectrophotometer (model Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK). The quantification of the extracts was performed using a standard curve of Trolox (100–1000 mM, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), and the results were expressed in Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) as  $\mu\text{mol Trolox.mL}^{-1}$  of sample.

The antioxidant capability of the extracts with respect to the ABTS +• free radical (2,2-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid], Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was determined using the method described by Sanchez-Gonzales *et al.* (2005). The absorbance was read at 730 nm in a UV-vis spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK). The quantification was based on a standard curve of Trolox (100–2000 mM), and the results were expressed in TEAC as  $\mu\text{mol Trolox.mL}^{-1}$  of sample.

## 2.10 Protective ability against DNA oxidation

The ability of the extracts to protect against the induction of DNA scission by Fenton's reagent was carried out using a small plasmid DNA (ThermoFisher scientific, 2686 bp), following the method described by Marrazza *et al.* (2013) with some modifications. A total of 10  $\mu\text{L}$  of each of the phenolic compounds' extracts and 2.0  $\mu\text{L}$  of the plasmid DNA were added to 10  $\mu\text{L}$  of Fenton's reagent (100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM acetic acid and 1.6 mM FeCl<sub>3</sub>). The reaction mixture was allowed to stand at 30°C for 1 hour. The plasmidial DNA

samples, treated and untreated with Fenton's reagent, were used as the positive control (+ C) and negative control (- C), respectively. After the reaction, the samples were analyzed by agarose gel electrophoresis (1% w/v), followed by separation at 65 V – 20 mA. After electrophoresis, the gel was exposed under UV light.

### **2.11 Statistical analysis**

All analyses were performed in triplicate. The analysis of variance (ANOVA) was conducted using Statistica version 7.0 software.

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Effect of temperature and pH on the growth of *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Lactobacillus plantarum* BG112 in soymilk with okara flour.**

From the results of the CCRD shown in Table 1, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and regression analysis to establish the effects of the variables  $X_1$  (°C) and  $X_2$  (initial pH) on the counts of probiotic microorganisms. The results of the ANOVA are presented in Table 2.

Table 2. ANOVA for growth of *Lactobacillus acidophilus* LA3 or *Lactobacillus plantarum* BG112 in soymilk with okara flour.

	Source of variation	SS	DF	MS	F	p value	R <sup>2</sup>
Y <sub>A</sub>	X <sub>1</sub>	0,115	1	0,115	1,070	0,3483	0,89
	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1,370	1	1,370	12,703	0,0161*	-
	X <sub>2</sub>	1,572	1	1,572	14,573	0,012*	-
	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1,587	1	1,587	14,710	0,012*	-
	X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,348	1	0,348	3,225	0,132	-
	Error	0,539	5	0,107			
	Total	4,864	10				
Y <sub>P</sub>	X <sub>1</sub>	0,046	1	0,046	0,890	0,388	0,86
	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,470	1	0,470	9,030	0,029*	-
	X <sub>2</sub>	0,810	1	0,810	15,543	0,010*	-
	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,462	1	0,462	8,874	0,030*	-
	X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,164	1	0,164	3,145	0,136	-
	Error	0,260	5	0,052			
	Total	2,002	10				

Y<sub>A</sub> or Y<sub>P</sub>: *Lactobacillus acidophilus* LA3 or *Lactobacillus plantarum* BG112 counts express in log CFU. g<sup>-1</sup> of sample ( $p \leq 0.05$ ).

\* significant ( $p \leq 0.05$ ).

For both microorganisms, the quadratic effects of two variables (X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub>) were significant ( $p < 0.05$ ). The optimum response for the growth of each microorganism was achieved in the experimental region used. The proposed models resulted in an R<sup>2</sup> (coefficient of determination) above 85%, which were considered to be good values for predictive purposes, indicating that 89 and 86%, respectively, for LA3 and LP BG112 of the experimental results adequately matched the proposed model.

The linear effect of temperature was not significant and was removed from the proposed model. However, the interaction [temperature x initial pH ( $X_1X_2$ )] was retained in the model, considering the high contribution of this interaction for both models, although not significant. The proposed models (Eq. 1,2), have no significant lack of fit with a final  $R^2$  of 86 and 84% for LA3 and LP BG122, respectively. This indicates that the experimental results showed good agreement with the proposed model, so the models can be used for predictive purposes. Thus, the proposed models (Eq. (1,2)) can be described as follows:

$$\text{(Eq. 1) } Y_A: \log \text{CFU.g}^{-1} = 9,22 - 0,49 x_1^2 + 0,44 x_2 - 0,53 x_2^2 + 0,29 x_1.x_2 \quad (R^2: \mathbf{0,86})$$

$$\text{(Eq. 2) } Y_P: \log \text{CFU.g}^{-1} = 9,70 - 0,28 x_1^2 + 0,31 x_2 - 0,28 x_2^2 - 0,20 x_1.x_2 \quad (R^2: \mathbf{0,84})$$

After the response surface analysis (Figure 1 AB), the proposed models were validated by performing new assays in triplicate. The results obtained were compared with the estimated response ( $Y_A$  or  $Y_P$ ) under central point conditions by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

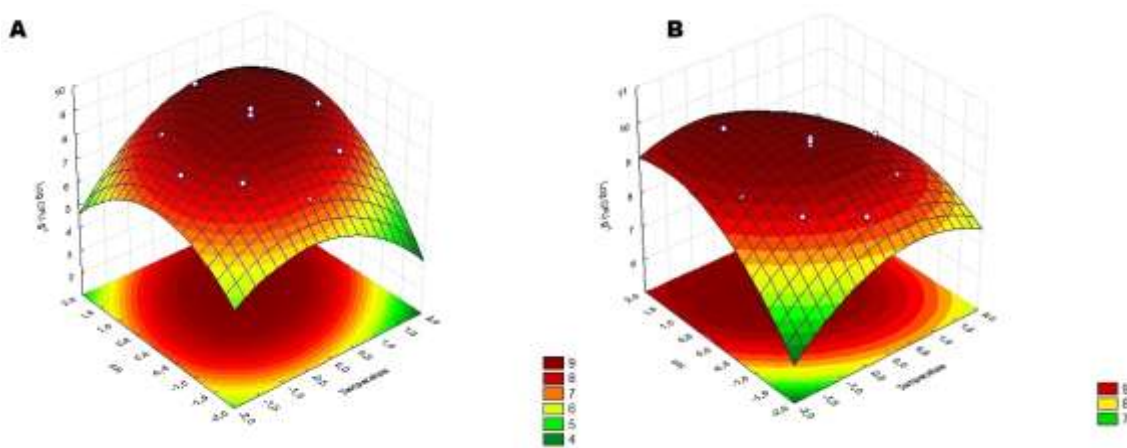


Fig. 1. Response surface: (A) *Lactobacillus acidophilus* LA3:  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  (B) *Lactobacillus plantarum* BG112:  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ .

Analyzing the response surface (Fig. 1 AB), a region was observed in which the growth is greater than  $9 \log \text{CFU.g}^{-1}$ . These values are observed when the conditions were used for the central points for both microorganisms. These results can be explained by the mesophilic characteristics of the microorganisms used because there was a decrease in growth when temperatures and pH values were used in the levels (+1 and -1, respectively).

The authors Zacharof, Lovitt and Ratanapongleka (2009), while optimizing the growth conditions of different strains of *Lactobacillus* spp., reported that at maximum growth for *Lactobacillus plantarum* at a pH of 6.5, a reduction in counts occurred when pH values below or above that condition were used. Similar results were found in this work.

Meena *et al.* (2014), while studying the optimal conditions for the growth of *Lactobacillus acidophilus*, obtained a maximal response condition at 35°C and pH 6.0 with variables studied separately. At the end of the optimization, they found a temperature of 37.7°C and a pH of 6.08 to be optimum conditions. In both cases, the values observed by the authors are in the experimental region used in this work; however, there are differences in the maximum response region. According to Pereira Maciel and Rodriguez (2011), the growth of microorganisms depends on various factors, such as the initial pH and temperature used, in addition to the substrate used and the strain employed.

### **3.2 Growth, pH and titratable acidity**

The conditions for the central points for both microorganisms were used to analyze the probiotic bacteria counts, pH and titratable acidity during a period of 72 hours of fermentation at intervals of 8 hours with LP BG112 (initial pH: 6.0 at 37°C) and LA3 (initial pH: 5.0 at 31°C) using soymilk with okara flour as the substrate. The data are shown in Figure 2 and 3.

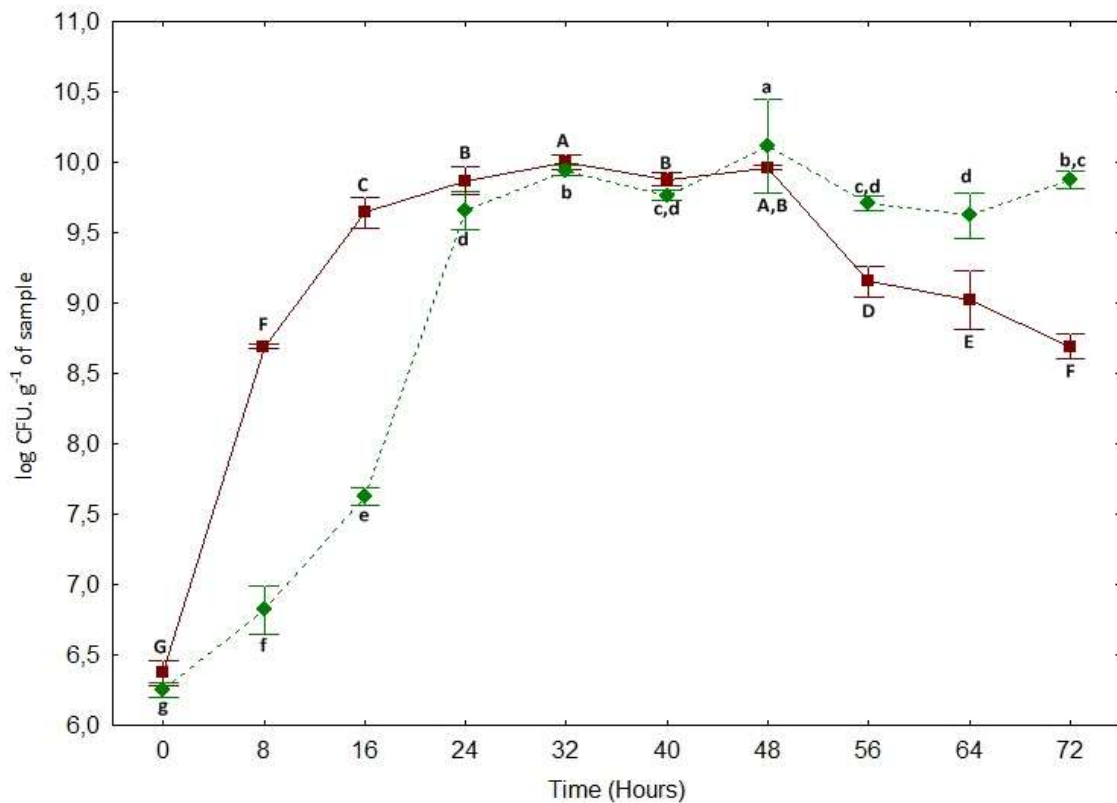


Fig. 2. Growth of *Lactobacillus acidophilus* LA3 (---) and *Lactobacillus plantarum* BG122 (—) in soymilk with okara flour during 72 hours. Different lowercase (LA3) and uppercase (LP BG122) letters show a significant difference ( $p < 0.05$ ).

The LP BG112 growth reached counts above 9 log CFU.g<sup>-1</sup> with a fermentation time of 16 hours while LA3 reached the same counts with a fermentation time of only 24 hours. The longer time required for the growth of LA3 is probably due to the different metabolic characteristics of each strain and adaptation to the fermentation medium. *Lactobacillus plantarum* is found naturally in plant sources. Bringel et al (2005) have isolated 14 strains of *Lactobacillus plantarum* in plant sources. Furthermore, Kusnadi & Afriyan (2012) to study the growth of these strains in skim milk and taro flour, reported the difference in growth rate between the strains, relating the metabolic characteristics of each. The maximum growth for LPBG 112 and LA3 occurred in 32 and 48 hours of fermentation, respectively, reaching 10.00 log CFU.g<sup>-1</sup> and 10.11 log CFU.g<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ). At 16 hours for the LP BG112 and 24 hours for the LA3, the counts were already above 9.5 log CFU.g<sup>-1</sup>.

The okara flour has constituents, such as stachyose and raffinose, that can promote the growth of different microorganisms, reinforcing the importance

of using this source of nutrients in feed. In a study by Mridula & Sharma (2015) to develop non-dairy drinks by combining vegetables, cereals and soymilk, they found that the growth of lactic acid bacteria was favored both when soymilk was used and when barley was incorporated in the substrate. This provided an increase in growth probiotic, associating the prebiotic effects with some of the constituents of the barley.

Donkor & Shah (2008) studied the conversion of isoflavones and growth in soymilk during 48 hours of fermentation at 37°C for different lactic acid bacteria and reported a maximum growth at 36 hours for *Lactobacillus acidophilus* L10 with a reduction in growth occurring after 48 hours of fermentation.

The decrease and stabilization in pH values and the increase and stabilization in titratable acidity occurred at approximately 48 hours for LPBG 112 with mean values of approximately pH 4.04 and an acidity of 1.17 g lactic acid.100 g<sup>-1</sup>. For LA3 at 48 hours of fermentation, the decrease in pH and increased acidity produced a final pH of 3.98 and 1.22 g lactic acid.100 g<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ). The data are shown in Figure 3.

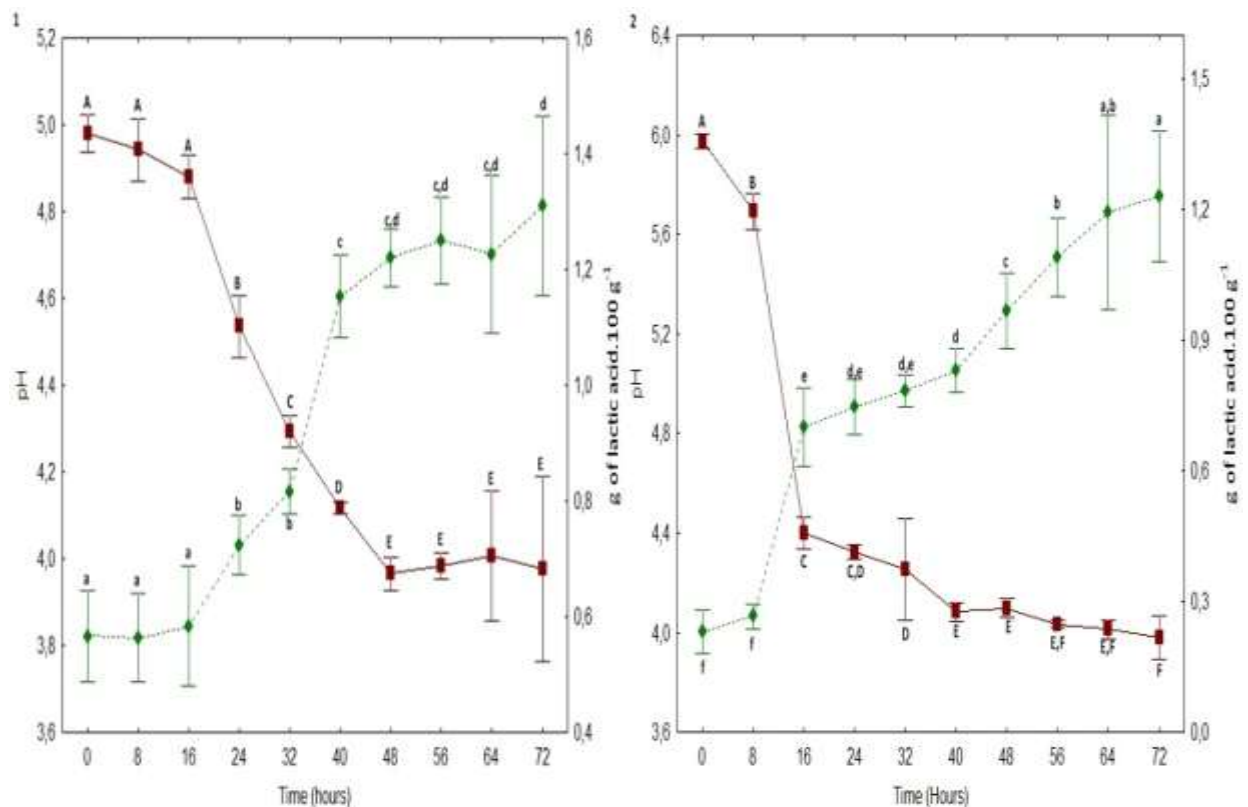


Fig. 3. pH (—) and titratable acidity (---) to LA3 (1) and LP BG112 (2) in soymilk with okara flour during 72 hours. Different lowercase and uppercase letters show a significant difference ( $p < 0.05$ ).

Besides, Donkor & Shah (2008) reported the decreasing pH and increasing acidity occurred progressively during the 48 hours of fermentation, similar to the results observed in this study. Sumarna (2010) reports that in their study of the hydrolysis of isoflavones with different lactic acid bacteria at 41°C for 30 hours, the *Lactobacillus plantarum* strains presented a maximum growth at 24 hours of fermentation, and pH stabilization occurred after this point. However, the maximum average count for *Lactobacillus plantarum* was approximately 8.6 log CFU.mL<sup>-1</sup>, which is below the counts found in this study, in the region of the maximum response.

### 3.3 Total phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity

The total phenolic compounds present in the fermented samples after 72 hours are shown in Figure 4. Both microorganisms, LP BG112 and LA3, have a similar behavior during the fermentation process and present a significant reduction ( $p < 0.05$ ) at approximately 24 and 32 hours of fermentation, respectively, with a final average of 0.248 and 0.254 mg EAG.mL<sup>-1</sup> of sample.

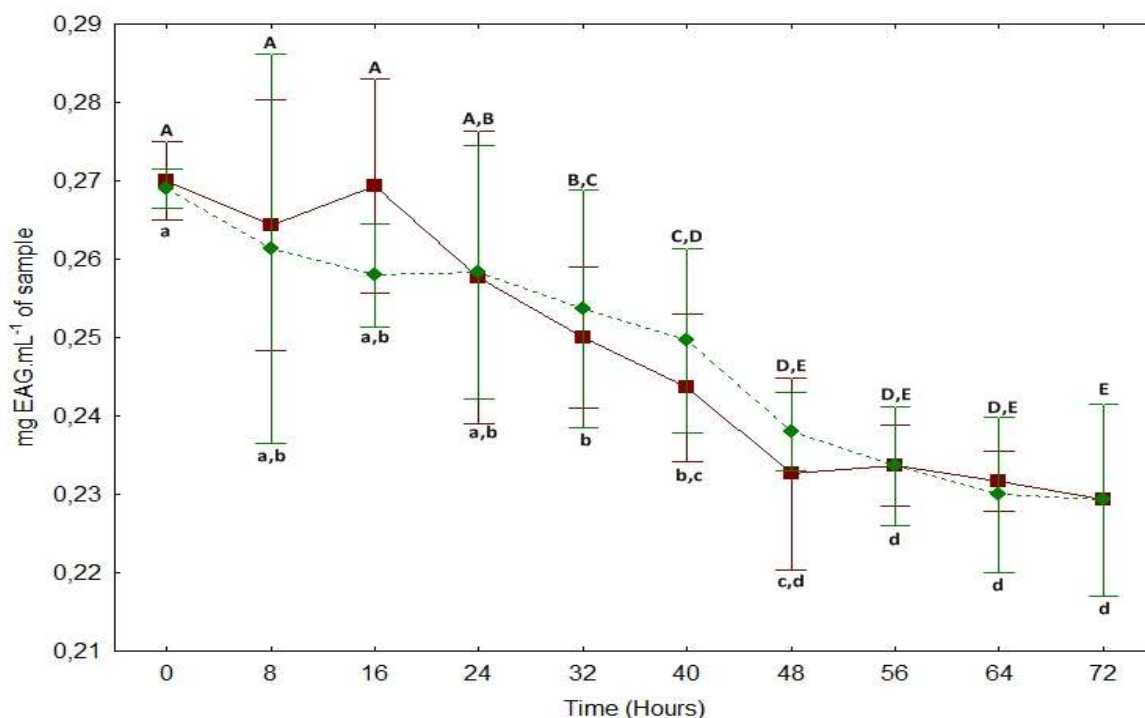


Fig. 4. Total phenolic compounds in soymilk with okara flour after LP BG112 (—) and LA3 (- - -) fermentation, expressed as mg GAE.mL<sup>-1</sup> of sample. Different lowercase (LA3) and uppercase (LPBG112) letters show a significant difference ( $p < 0.05$ ).

According to Mujic *et al.* (2011) the content of phenolic compounds may promote antioxidant activity, which is in accordance with Malenčić *et al.* (2008) and Dajanta *et al.* (2012), who found increased antioxidant capacity in the presence of higher levels of phenolic compounds.

The fermentation process causes sensory and physicochemical changes in food matrices. In this work, the total phenolic content varied little between the initial and final levels at 72 hours of fermentation; however, at the same time, there was an increased antioxidant activity as measured by the DPPH• and ABTS +• tests (Figure 5). A significant contribution to this effect was attributed to the conversion of isoflavones.

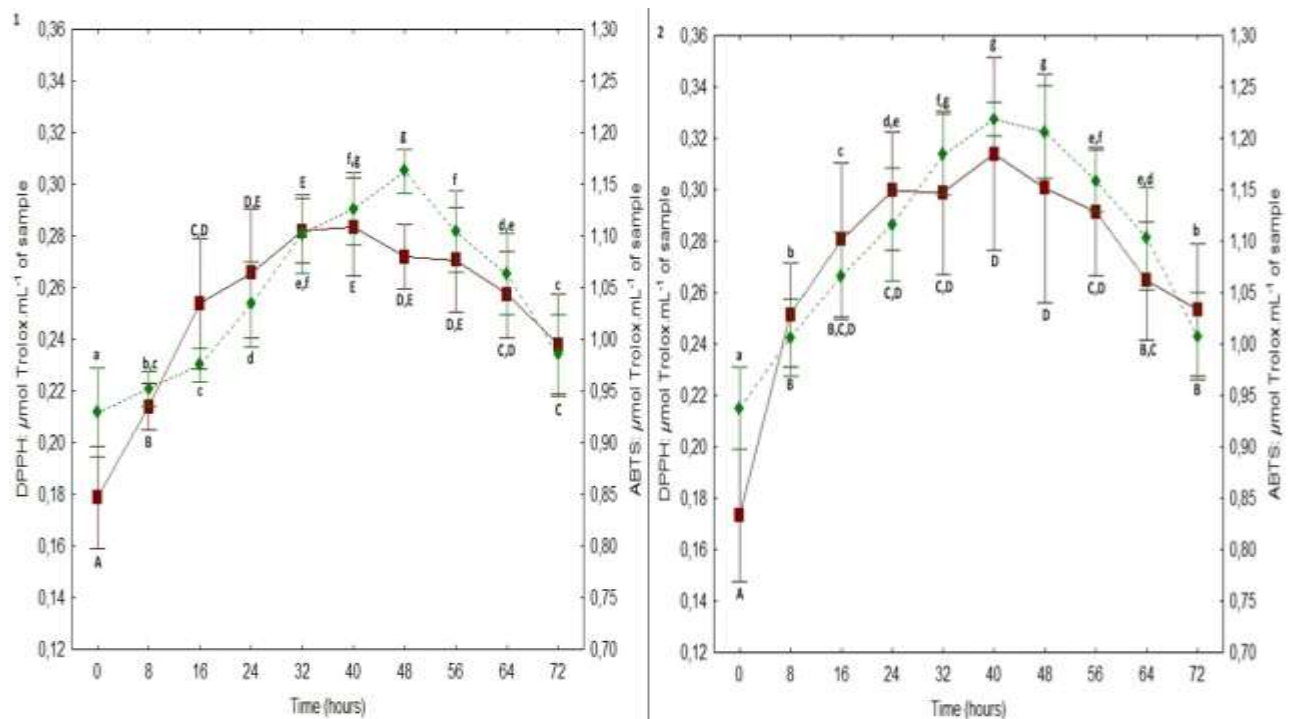


Fig. 5. Antioxidant activity: DPPH• (—) and ABTS +• (- - -) tests during LA3 (1) and LP BG112 (2) fermentation of soymilk with okara flour. Results expressed as  $\mu\text{mol Trolox equivalent}\cdot\text{mL}^{-1}$  of sample. Different lowercase and uppercase letters show a significant difference ( $p < 0.05$ ).

According to Fig. 5, the sample fermented by LP BG112 showed an increased antioxidant activity between 16 and 32 hours of fermentation and an average maximum activity approximately 0.30 and 1.20  $\mu\text{mol Trolox equivalent}\cdot\text{mL}^{-1}$  of sample according to the DPPH• and ABTS +• tests, respectively. These were increases of 72 and 28% in their antioxidant capacities, respectively, compared to their initial activities. There is a significant reduction at 56 hours of fermentation with the ABTS +• test and at 64 hours

with the DPPH• test. The LA3 showed a significant increase in the antioxidant capacity at 24 and 40 hours of fermentation and an average maximum activity of approximately 0.27 and 1.14  $\mu\text{mol Trolox equivalent.mL}^{-1}$  of sample for DPPH• and ABTS +•, respectively. These were increases of 54 and 23% in their antioxidant capacities, respectively. After that, a significant reduction at 56 hours of fermentation for ABTS +• and 64 hours for DPPH• occurred. During the fermentation process, the levels of phenolic compounds (Figure 4) in the samples with LP BG112 and LA3 has a significantly decrease. This reduction in the levels of phenolic compounds may have contributed to the reduction of antioxidant activity at longer fermentation times.

The higher levels of isoflavone aglycones commonly cause a higher antioxidant capacity due to the availability of a greater amount of hydroxyl groups that can donate hydrogen atoms or electrons, thus stabilizing free radicals through resonance (Arora, Nair & Strasburg, 1998; Lee et al, 2005; Naczk & Shahidi, 2004). Furthermore, the aglycone fractions have a higher capacity for gastrointestinal absorption (Walsh et al., 2009; Zubik & Meydani 2003). Figure 6 shows the aglycone isoflavones data during the 72 hours of fermentation for each microorganism.

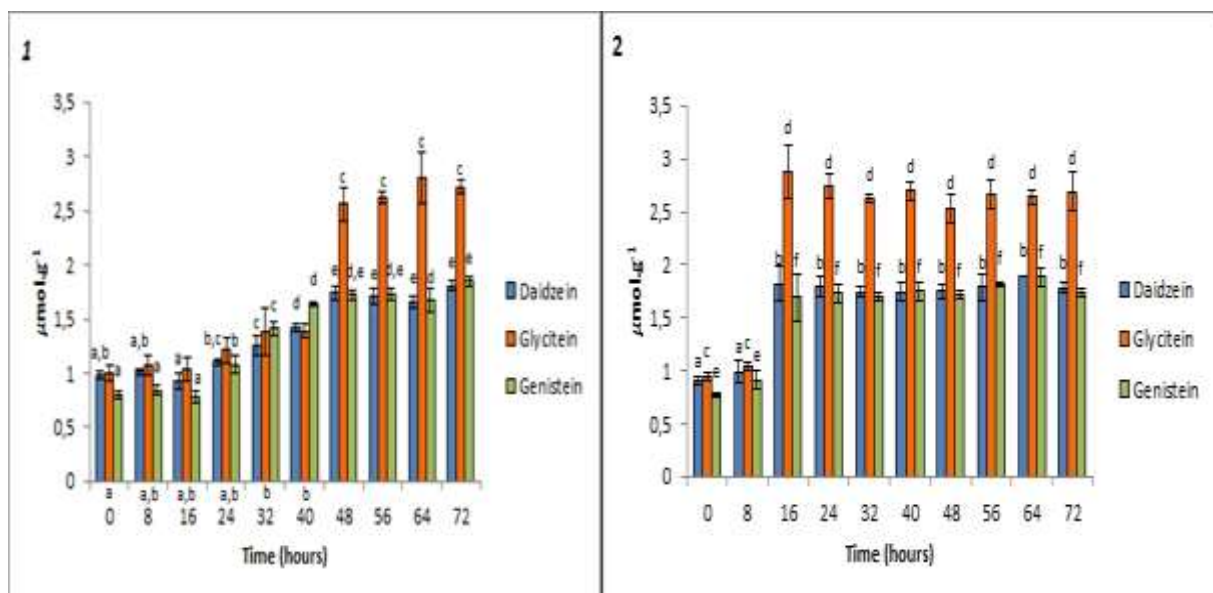


Fig. 6. Isoflavone aglycones in soymilk with okara flour during 72 hours fermentation by LA3 (1) and LP BG112 (2) expressed as  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  on a degreased dry basis. Same letter are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

Zao & Shah (2014) observed the influence of fermentation by lactic acid bacteria on the physicochemical properties of soymilk and reported

increases in antioxidant activity and the levels of isoflavone aglycones caused by the fermentation process.

The increase in each fraction after 16 hours of fermentation by LP BG112 and after 48 hours of LA3 fermentation amounted to final averages of 6.23 and 6.15  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  on a degreased dry basis (ddb) of total isoflavone aglycones, respectively. The linear correlation analysis showed a positive and high linear correlation between the concentration of isoflavone aglycones and the growth of probiotic bacteria ( $R = 0.85$  for LP BG112 and  $R = 0.77$  for LA3). There is an increase in the conversion of isoflavones with the growth of bacteria. Donkor & Shah (2008) reported a maximum conversion of isoflavones after 36 hours of fermentation with *Lactobacillus acidophilus* at 37°C. Tang *et al.* (2007) studied different strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* during the fermentation of soymilk enriched with calcium and reported a significant increase in the levels of isoflavone aglycones at 24 hours of fermentation for both microorganisms, with differences existing between the strains in their conversion capacity. According to Cho *et al.* (2012), the fermentation by *Lactobacillus plantarum* after 48 hours at 37°C in Samsu-eum, an herb used in Korean medicine, helped to increase the isoflavone aglycone content.

Daily intake of isoflavone aglycones can benefit consumers due to their relative estrogenic potential (glycitein > genistein > daidzein) (Steinberg *et al.*, 2011). According to Uesugi *et al.* (2001), the intake of glycitein in mice without ovaries was more effective in reducing bone loss and hyperlipidemia.

### **3.4 Protective ability against DNA oxidation**

The capacity of the fermented soymilks to inhibit the oxidation of DNA promoted by Fenton's reagent was measured over 72 hours of fermentation (Figure 7). The results showed that all the samples had the ability to inhibit oxidative reactions by inhibiting free radicals, an important property because compounds with antioxidant activity ingested during eating play a critical role in the maintenance of the health of an individual by helping the endogenous antioxidants (Lampe, 1999).

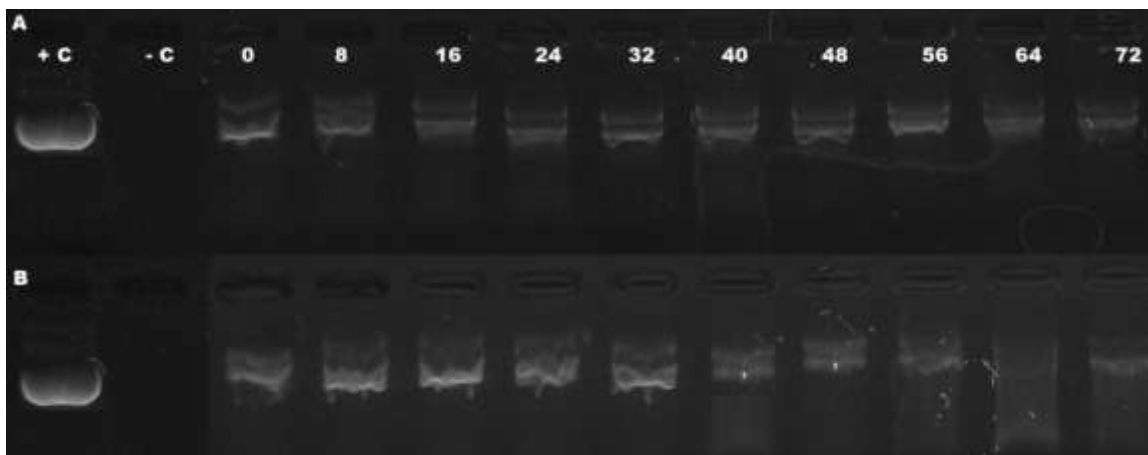


Fig. 7. Protective ability against DNA oxidation. A: LP BG112; B: LA3; +C: positive control (plasmid DNA); -C: negative control (plasmid DNA + Fenton's reagent); 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72: time in hours.

A reduction in the ability to protect against DNA oxidation is observed with an increase in the fermentation time and is more visible for the LA3 (Figure 7B) after 40 hours of fermentation. For LP BG112, the signal intensities of the DNA bands remained more stable throughout the process. This decrease in the signal intensity likely reflects a degradation of the compounds with antioxidant capacity (Figure 4) favoring oxidation of DNA and resulting in a decrease in signal intensity when subjected to UV light. However, all samples were satisfactory compared to the controls (+C and -C) because all the samples sent signal intensity, demonstrating the presence of DNA bands (+C), while the second control containing DNA + Fenton's reagent (-C) shows no signal intensity. This is probably due to complete oxidation and breaking of the DNA into very small fragments, making it impossible to separate and view these compounds through the agarose matrix.

In a study by Marazza *et al.* (2013), the authors quantified the percentage of inhibition of the oxidation of DNA by isoflavone extracts obtained from fermented soymilk with *Bifidobacterium longum*, reporting the progressive increase of protection against DNA oxidation during 24 hours of fermentation. Lee *et al.* (2002) studying the properties of cactus extracts with different solvents, reported an association between the content of phenolic compounds in the extracts and their ability to inhibit DNA oxidation. The extracts with higher concentrations of phenolic compounds were more effective. In this study, this analysis was treated qualitatively because no quantification of the inhibition

ability of the samples was made. However, as noted, the signal intensity emitted can be attributed to the ability of the sample to inhibit the oxidation of DNA. In this case, it is related to the concentration of phenolic compounds because there was a reduction in the content of phenolic compounds over 72 hours of fermentation. This decreased the antioxidant capacity over the fermentation time and was reflected by the reduced intensity of the signal in the electrophoresis analysis.

#### **4. Conclusion**

The maximum response conditions for the growth of each microorganism are in the central points (LP BG112: pH: 6.0 at 37°C; LA3: pH: 5.0 at 31°C) in soymilk containing 3 % of okara flour. The proposed model presented a coefficient of determination of above 0.80 with no significant lack of fit, so the model can be used for predictive purposes. A positive linear correlation between the growth of the microorganism and the conversion of isoflavones established these conditions for LP BG112 at 24 hours of fermentation and for LA3 at 48 hours of fermentation. At these times, the probiotic numbers are over  $9.5 \log \text{CFU.g}^{-1}$  of sample, and the samples contain high levels of total isoflavone aglycones. This is also the region with the highest antioxidant activity. It is considered suitable for LPBG 112 and LA3, respectively, the fermentation time about 24 and 48 hours.

#### **Acknowledgment**

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Araucária (FA - Paraná), Brazil for financial support in the form of scholarship for M.L.M.-F.

## References

- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International - Volume I and II, 18th Edition, Rev. 1.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). (1990). Official methods of analysis. 15. ed. Arlington.
- Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2, 133-141.
- Bao, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Liu, Y.; Wang, S.; Dong, X.; Su, F.; Yao, G.; Sun, T.; Zhang, H. (2012). In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk. *Annals of Microbiology*, 62, 1311-1320.
- Bowles, S.; Demiate, I. M. (2006). Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 652-659.
- Brand-Williams, W; Cuvelier, M. E; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 28, 25-30.
- Bringel, F.; Castioni, A.; Olukoya, Felis, G. E. Torriani, S.; Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. argentoratensis subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1629–1634.
- Carrão-Panizzi, M. C.; Favoni, S. P. G.; Kikuchi, A. (2002). Extraction time for isoflavone determination. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 515-518.
- Chen, K. I., Erh, M. H., Su, N. W., Liu, W. H., Chou, C. C., Cheng, K. C. (2012). Soyfoods and soybean products: From traditional use to modern applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 9–22.
- Cho, C-W., Jeong, H-C., Hong, H-D., Kim, Y-C., Choi, S. Y., Kim, K., Ma, J. Y., Lee, Y. C. (2012). Bioconversion of Isoflavones during the Fermentation of Samsu-Eum with *Lactobacillus* Strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 1062-1067.
- Ciabotti, S.; Barcelos, M. F. P.; Cirillo, M. A.; Pinheiro, A. C. M. (2009). Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela

adição de soro de leite ao extrato de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 346-353.

Cruz, N.S.; Capellas, D.P.; Jaramillo, A.J.; Trujillo, B.; Guamis, V.; Ferragut, V. (2009). Soymilk treated by ultra high pressure homogenization: acid coagulation properties and characteristics of a soy yogurt product. *Food Hydrocolloids*, 23, 490-496.

Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A. (2012). Nutritional and physicochemical qualities of Thua Nao (Thai Traditional Fermented Soybean). *Chiang Mai Journal of Science*, 39, 562-574.

Donkor, O. N. & Shah, N. P. (2008). Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Food Microbiology and Safety*, 73, 15-20.

Ficher, M.; Kofod, L. V.; Schols, H. A.; Piersma, S. R.; Gruppen, R.; Voragen, A. G. J. (2001). Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *Journal of Food Science*, 40, 552-556.

Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Food Science & Technology*, 10, 139-157.

Jackson, C. J. C.; Dini, J. P.; Rupasinghe, H. P. V.; Faulkner, H.; Poysa, V.; Buzell, D.; DeGRANDIS, S. (2002). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37, 1112-1123.

Kuo, L. C., Cheng, W. Y., Wu, R. Y., Huang, C. J., Lee, K.T. (2006). Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis natto*. *Applied microbiology and biotechnology*, 73, 314–320.

Kusnadi, J.; Afriyan, T. (2012). The Growth of Probiotic Bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* in Skim Milk and Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott Var. Boring) flour Composite Medium. International Conference on Environmental and Biological Sciences.

Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70.

Lee, J.-C., Kim, H.-R., Kim, J., & Jang, Y.-S. (2002). Antioxidant property of and Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6490 - 6496.

- Lee, C. H; Yang, L; Xu, L. Yeung, S. Y. V; Huang, Y; Chen, Z. Y. (2005). Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chemistry*, 90, 735-741.
- Liu, K. (1997). Soybeans: Chemistry, technology and utilisation. New York: Chapman & Hall.
- Lomax, A. R. & Calder, P. C. (2009). Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1428-1518.
- Malenčić, D., Maksimović, Z., Popović, M., Miladinović, J. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*, 99, 6688–6691.
- Marazza, J. A., Nazareno, M. A., Savoy de Giori, G., Garro, M. S. (2013). Bioactive action of  $\beta$ -glucosidase enzyme of *Bifidobacterium longum* upon isoflavone glucosides present in soymilk. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2480 – 2489.
- Meena, G. S., Kumar, N., Majumdar, G. C., Banerjee, R., Meena, P. K., Yadav, V. (2014). Growth Characteristics Modeling of *Lactobacillus acidophilus* Using RSM and ANN. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 57, 15-22.
- Moraes, R. M., Haj-Isa, N., M. A.; Almeida, T. C. A., Moretti, R. H.(2006). Efeito da Desodorização nas características sensoriais de extratos hidrossolúveis de soja obtidos por diferentes processos tecnológicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 46-51.
- Mridula, D. & Sharma, M. (2015). Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. *LWT Food Science and Technology*, 62, 482 – 487.
- Mujić, I., Šertović, E., Jokić, S., Sarić, Z., Alibabić, V., Vidović, V., Živković, J. (2011). Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3, 16-20.
- Nacz M, Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95–111.
- Nautiyal, C.S., Govindarajan, R., Lavania, M., Pushpangadan, P. (2008). Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4474–4481.

- O'Toole, D. K. (1999). Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production-A Review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 363-371.
- Pereira, A.L. F., Maciel, T. C., Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44, 1276-1283.
- Pinto, D. D. J; Castro, P. S. (2008). Estudo preliminar da secagem do okara (resíduo do extrato aquoso de soja) para inativação dos fatores antinutricionais e conservação. *Brazilian Journal of Food Technology*, 125-131.
- Rossi, E. A.; Rosier, I.; Damasso, A.R.; Carlos, I.Z.; Vendramini, R.C.; Abdala, D.S.P.; Talarico, V.H.; Minto, D.F. (2004). Determinação de Isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de Soja. *Alimentos e Nutrição*, 15, 93-99.
- Sanches-Gonzales, I; Jiménez-Escrig, A; Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). *Food Chemistry*, 90, 133-139.
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2015). Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT e Food Science and Technology*, 63, 852 - 858.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Steinberg, F. M.; Murray, M. J.; Lewis, R. D.; Cramer, M. A.; Amato, P.; Young, R. L.; Barnes, S.; Konzelmann, k. L.; Fischer, J. G.; Ellis, K. J.; Shypailo, R. J.; Fraley, J. K.; Smith, E. O. Wong, W. W. (2011). Clinical outcomes of a 2-y soy isoflavones supplementation in menopausal woman. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 356-367.
- Sumarna (2010). Hydrolysis of bioactive isoflavone in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase producing lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6, 30-40.
- Tang, A. L., Shah, N. P., Wilcox, G., Walker, K. Z., Stojanovska, L. (2007). Fermentation of Calcium-Fortified Soymilk with *Lactobacillus*: Effects on Calcium Solubility, Isoflavone Conversion, and Production of Organic Acids. *Journal of Food Safety*, 72, 431 – 436.
- Uesugi, T.; Toda, T.; Tsuji, K.; Ishida, H. (2001). Comparative study on reduction of bones loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats

by soy isoflavones, daidzein, genistein and glycitein. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 368-372.

Vinderola, C.G.; Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9, 497-505.

Walsh, K. R.; Haak, S. J.; Fastinger, N. D.; Bohn, T.; Tian, Q.; Mahan, D. C.; Schwartz, S. J.; Failla, M. (2009). Gastrointestinal absorption and metabolism of soy isoflavonoids in ileal-cannulated swine. *Molecular Nutrition Food Research*, 53, 277-286.

Yoshiara, L. Y.; Madeira, T. B.; Delaroza, F.; Silva, J. B.; Ida, E. I. (2012). Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 978-986.

Zacharof, M.P. Lovitt, R. W., Ratanapongleka, K. (2009). Optimization of Growth Conditions for Intensive Propagation, Growth Development and Lactic Acid Production of Selected Strains of Lactobacilli. *Engineering Our Future: Are We up to the Challenge?* Burswood Entertainment Complex, 1830-1839.

Zago, M.; Fornasari, M. E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suarez, V.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.

Zao, D.; Shah, N. P. (2014). Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT Food Science and Technology*, 58, 454 – 462.

Zubik, L.; Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *American Society for Clinical Nutrition*, 77, 1459-1465.

## 8.2 Artigo Científico 2

**Extrato de soja com farinha de okara fermentado por *Lactobacillus*:  
Delineamento simplex-centróide aplicado na elaboração molho cremoso  
de soja probiótico.**

**Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Prudêncio, S. H.; Garcia, S.**

**Periódico:** *Food Chemistry*

**Extrato de soja com farinha de okara fermentado por *Lactobacillus*:  
Delineamento simplex-centróide aplicado na elaboração molho cremoso  
de soja probiótico.**

**Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Prudêncio, S. H.; Garcia, S.**

palavras-chave: ACE, amido pré-gelatinizado, goma guar, goma xantana, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*.

**Resumo**

A soja e seus derivados fornecem compostos de interesse biológico servindo como base para a elaboração de diversos produtos como molhos. O uso de gomas e amidos é amplamente difundido na indústria de alimentos, proporcionando produtos com maior estabilidade e características adequadas ao processamento. O objetivo deste trabalho visou empregar extrato de soja contendo 3% de farinha de okara fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3 na elaboração de molho cremoso de soja probiótico estudando os efeitos da adição de três componentes gelificantes ( $X_1$ : goma guar,  $X_2$ : goma xantana,  $X_3$ : amido pré-gelatinizado de mandioca) por meio do planejamento de misturas simplex-centróide, tendo como variáveis respostas: capacidade de retenção de água ( $y_1$ ), viscosidade ( $y_2$ ) e firmeza ( $y_3$ ), além de verificar o efeito da fermentação do extrato de soja com farinha de okara na capacidade de inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE) e produção de ácidos láctico e acético, além da caracterização final das matérias primas e do molho otimizado. Com a fermentação por *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3 houve aumento na atividade de inibição de ACE, atingindo atividades de inibição superiores a 50%. Com a fermentação dos extratos de soja contendo 3% farinha de okara ocorreu o acúmulo de ácido láctico e acético para ambos os microrganismos, com valores finais aproximados de  $12 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente de ácido láctico e acético para o LP BG112. O produto fermentado por LA3 alcançou valores finais de  $4,7 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  para o ácido láctico e acético respectivamente. Os molhos não diferiram quanto a composição química, existindo diferença apenas quando comparados aos molhos controles, que apresentavam diferenças na composição pela ausência de óleo ou gomas na composição. Após a otimização por meio de planejamento de misturas simplex-centróide a mistura binária de goma guar e goma xantana foi escolhida para a elaboração do molho cremoso de soja probiótico em função das respostas CRA, viscosidade e firmeza.

## 1. Introdução

A soja e seus derivados são amplamente consumidos e fornecem nutrientes em quantidade e qualidade para os consumidores, tornando este alimento uma alternativa para pessoas que buscam uma vida mais saudável ou que apresentam restrições alimentares (Liu, 1997; Wang, Yu, Chou, 2006).

Fonte de isoflavonas, proteínas de qualidade, saponinas e outros compostos, seu consumo promove benefícios à saúde como prevenção de câncer e doenças coronárias, diminuição dos efeitos da osteoporose, redução dos níveis de LDL. A soja é amplamente utilizada na elaboração de produtos como derivados fermentados, uma vez que sua composição favorece a incorporação e desenvolvimento de microrganismos, além de que o processo fermentativo promove mudanças sensoriais e nutricionais interessantes ao produto (Liu, 1997; Setchell, Brown, Lydeking-Olsen, 2002; Jiménez-Martinez, Hernández-Sanchez, Dávila-Ortiz, 2003, Wang, Yu, Chou, 2006, Donkor & Shah, 2008 ).

Outro fator importante relacionado a fermentação por bactérias ácido lácticas em extrato de soja está relacionado à conversão de isoflavonas e aumento nos níveis de isoflavonas agliconas pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase, além de contribuir sensorialmente pela produção de ácido láctico (Liu, 1997; Otieno, Ashton, Shah, 2005; Donkor & Shah, 2008). Dentre os microrganismos utilizados em processos fermentativos encontram-se os denominados probióticos, os quais são classificados como capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo quando consumidos de forma regular e em concentração adequada (BRASIL, 2002).

O uso de polissacarídeos é amplamente difundido, promove melhorias nas características funcionais e auxilia na estabilidade de produtos alimentícios durante o armazenamento (BeMiller & Huber, 2010). Dentre os polissacarídeos, temos o amido nativo, caracterizado como um polissacarídeo que apresenta baixa solubilidade a frio. Este apresenta propriedades de viscosidade apenas em condições adequadas de umidade, aquecimento e agitação, o que promove a hidratação do grânulo formado pelas frações de amilose e amilopectina até a ruptura, o que ocasiona a perda da birrefringência e aumento da viscosidade

(Li et al. 2004; Mishra & Malhotra, 2009; BeMiller & Huber, 2010). Os hidrocolóides (gomas) entretanto são comumente associados a amidos em diversos produtos alimentícios. O uso combinado visa o aumento da estabilidade e melhoria das propriedades funcionais, como o aumento da viscosidade durante a gelatinização do amido (Alloncle, Llamas, Doubliar, 1989).

O amido pré-gelatinizado é o amido que após o cozimento passa por um processo de secagem, obtendo-se um amido com propriedades distintas ao amido nativo, como maior solubilidade a frio (BeMiller & Huber, 2010, Rojas, Uribe, Zuluaga, 2012). A goma xantana é caracterizada como um polissacarídeo produzido em um processo fermentativo pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Muito utilizado em sinergismo com a goma guar, possui solubilidade a frio produzindo soluções altamente viscosas em baixas concentrações, sendo utilizadas em molhos com ou sem óleo (BeMiller & Huber, 2010). A goma guar é obtida pela moagem do endosperma de sementes que produz soluções de alta viscosidade (BeMiller & Huber, 2010).

O planejamento de misturas viabiliza a obtenção de formulações com um número exato de experimentos podendo-se escolher a melhor condição para determinada resposta mediante variações na formulação de componentes específicos (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2003; Navarrete-Bolaños et al., 2003; Coscione, Andrade, May, 2005).

O objetivo deste trabalho visou empregar extrato de soja contendo 3% de farinha de *okara* fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 na elaboração de molho cremoso de soja probiótico estudando os efeitos da adição de três componentes gelificantes ( $X_1$ : goma guar,  $X_2$ : goma xantana,  $X_3$ : amido pré-gelatinizado de mandioca) por meio do planejamento de misturas simplex-centróide, tendo como variáveis respostas: capacidade de retenção de água ( $y_1$ ), viscosidade ( $y_2$ ) e firmeza ( $y_3$ ), além de verificar o efeito da fermentação do extrato de soja com farinha de *okara* na capacidade de inibição *in vitro* da enzima conversora da angiotensina (ACE) e produção de ácidos láctico e acético, sendo realizada a caracterização final das matérias primas e dos molhos otimizados.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Soja e Cultura**

Foram utilizados grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultivar BRS 257 (livre de lipoxigenase), safra 2012/2013 (Sementes Paraná Ltda., Mauá da Serra-PR). As culturas starter liofilizadas de *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3 foram fornecidas pela empresa Clericci-Sacco®, Cadorago – Itália. O preparo do inóculo seguiu o descrito por Moraes Filho, Busanello e Garcia (2016).

### **2.2 Extrato de soja, farinha de okara e Fermentação.**

O extrato de soja, farinha de okara e as condições de fermentação para cada microrganismo seguiu o descrito por Moraes Filho, Busanello, Garcia (2016).

### **2.3 Composição Química**

Foi determinado o teor de proteínas, lipídios, cinzas, umidade em grãos de soja, farinha de okara, extrato aquoso de soja, extrato aquoso de soja contendo 3% de farinha de okara e nos molhos otimizados (AOAC, 2006). Carboidratos foram obtidos por diferença. Para comparação, molhos controles para cada microrganismo foram elaborados.

### **2.4 Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE)**

A atividade inibitória de ACE foi realizada de acordo com a metodologia de Donkor et al. (2007) e Elfahri et al. (2014). A extração consistiu na adição de 20g da amostra em 5 mL de ácido tricloroacético TCA 0,75% sendo submetida a centrifugação 4000 (x g) a 4° C por 30 minutos, ajustando o pH do sobrenadante para 8,3. Adicionou-se 20 µL do sobrenadante a 200 µL de HHL – hipuril-histidil-cistina (Sigma) dissolvido em tampão borato de sódio pH 8,5. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL da solução ACE (Sigma), seguindo

para incubação a 37 °C por 30 min. O término da reação foi realizado com a adição de 250 µL de ácido clorídrico (HCL) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 1,7 mL de acetato de etila. A camada de acetato de etila foi evaporada e o resíduo contendo ácido hipúrico foi redissolvido em 1 mL de água deionizada, seguindo para leitura a 228 nm em espectrofotômetro, utilizando água como branco. A inibição dada em porcentagem foi obtida por meio do cálculo a seguir:

$$\text{Atividade inibitória sobre ACE (\%)} = [1 - (C-D)/(A-B)] \times 100$$

Onde A: absorvância de ACE e tampão; B: absorvância do tampão; C: absorvância ACE + amostra + tampão; D: absorvância amostra e tampão.

## 2.5 Ácidos orgânicos

Os extratos foram obtidos segundo Donkor et al. (2007), pela mistura de 3 mL de amostra a 50 µL de ácido nítrico 15,5 mol.L<sup>-1</sup> e com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol.L<sup>-1</sup>), sendo centrifugadas a 14.000 (x g) por 30 min (Centrífuga 5804R – Alemanha). O sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante 0,20 µm (Millipore Corporation, MA, EUA).

A quantificação de ácido láctico e ácido acético foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, Japão), constituído por Bomba de alta pressão LC- 20AT, Injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de Refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica Shiseido CapCell Pak 5µ C18 MG 250 x 4,6mm. A fase móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o volume de injeção em 20 µL. A detecção foi realizada utilizando arranjo de Fotodiodos (SPD-M20A), no modo de varredura de 200 a 400 nm. A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (REUTER, 2015).

## 2.6 Delinamento Experimental

Para a otimização da formulação de molho cremoso de soja probiótico foi utilizado o planejamento simplex-centróide para três componentes gelificantes diferentes ( $X_1$ : goma guar,  $X_2$ : goma xantana,  $X_3$ : amido pré-gelatinizado de mandioca) e três repetições no ponto central. As combinações utilizadas estão representadas pela Tabela 1. As variáveis respostas avaliadas foram a capacidade de retenção de água (CRA) ( $y_1$ ), viscosidade ( $y_2$ ) e firmeza ( $y_3$ ), além das respectivas respostas para cada microrganismo.

Tabela 1 – Planejamento simplex-centróide para o desenvolvimento de molho cremoso de soja probiótico. Variáveis codificadas, decodificadas e variáveis respostas.

Tratamento	Codificadas*			Descodificadas**			Variáveis respostas LP BG112***			Variáveis respostas LA3***		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	1,00	0,00	0,00	0,3	0	0	56,58 ± 3,53	1732 ± 24,0	0,2085 ± 0,001	43,95 ± 3,03	970 ± 18,2	0,1787 ± 0,002
2	0,00	1,00	0,00	0	0,3	0	95,79 ± 0,56	1706 ± 7,0	0,2414 ± 0,004	55,66 ± 0,86	1980 ± 11,5	0,2106 ± 0,004
3	0,00	0,00	1,00	0	0	0,3	51,56 ± 3,20	1652 ± 21,0	0,2021 ± 0,003	30,88 ± 3,56	780 ± 16,2	0,1835 ± 0,002
4	0,50	0,50	0,00	0,15	0,15	0	84,16 ± 1,78	1706 ± 26,0	0,2308 ± 0,004	54,51 ± 1,70	1852 ± 18,7	0,1883 ± 0,004
5	0,50	0,00	0,50	0,15	0	0,15	57,88 ± 0,81	1762 ± 82,0	0,2180 ± 0,000	41,24 ± 1,15	1893 ± 82,0	0,1840 ± 0,003
6	0,00	0,50	0,50	0	0,15	0,15	49,36 ± 7,15	1243 ± 22,0	0,2117 ± 0,002	30,27 ± 1,28	890 ± 48,1	0,1861 ± 0,003
7	0,33	0,33	0,33	0,10	0,10	0,10	64,08 ± 2,56	1723 ± 25,0	0,2244 ± 0,002	50,61 ± 2,04	1796 ± 27,8	0,1946 ± 0,001
8	0,33	0,33	0,33	0,10	0,10	0,10	63,28 ± 3,67	1709 ± 14,0	0,2221 ± 0,006	51,23 ± 2,45	1772 ± 32,8	0,1932 ± 0,005
9	0,33	0,33	0,33	0,10	0,10	0,10	64,29 ± 1,28	1734 ± 16,0	0,2234 ± 0,001	50,38 ± 1,05	1759 ± 10,2	0,1969 ± 0,003

\*X<sub>1</sub>: Goma guar; x<sub>2</sub>: Goma Xantana; x<sub>3</sub>: Amido pré-gelatinizado de mandioca

\*\* X<sub>1</sub>: g de Goma Guar. 100 g<sup>-1</sup>; X<sub>2</sub>: g de Goma Xantana. 100 g<sup>-1</sup>; X<sub>3</sub>: g de Amido pré-gelatinizado. 100 g<sup>-1</sup>.

\*\*\* respostas para Y1: CRA (%); Y2: Viscosidade (centipoise); Y3: Firmeza (N) para *Lactobacillus plantarum* BG 112 (LP BG112) e *Lactobacillus acidophilus* LA3 (LA3).

Tratamento 1 a 3: componentes puros; 4 a 6: misturas binárias; 7 a 9: mistura terciária.

A produção de molho cremoso de soja probiótico seguiu metodologia descrita por Campos et al. (2009), com algumas modificações. A proporção dos ingredientes utilizados encontram-se na Tabela 2. Os molhos foram obtidos após a homogeneização dos ingredientes em processador de alimentos, utilizando a velocidade máxima durante 2 minutos.

Tabela 2. Ingredientes para a formulação de produto

<b>Ingrediente</b>	<b>Proporção (g/Kg)</b>
Extrato de soja + 3 % de Okara fermentado*	865
Óleo de Soja	100
Sal	10
Açúcar	2
Alho em pó	10
Cebola em pó	10
Amido pré-gelatinizado	
Goma Guar	3
Goma Xantana	

\*Fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3

O ajuste dos modelos aos dados experimentais foi verificado pela análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) por meio do programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc, 2004). As funções respostas estudadas (viscosidade, capacidade de retenção de água e firmeza) nas formulações foram otimizadas a partir dos gráficos gerados da superfície de resposta.

## **2.7 Capacidade de Retenção de Água, Viscosidade e Firmeza**

A capacidade de retenção de água das amostras foi determinada adaptando a metodologia descrita por Ozer et al. (1998), onde 20 g da amostra foram submetidas a centrifugação a 10000 (x g) por 30 min a 10 °C. Após esta etapa, o soro liberado foi coletado e pesado. A capacidade de retenção de água foi expressa em % (m/m).

A viscosidade foi determinada adaptando metodologia proposta por Baú (2014), utilizando viscosímetro digital Brookfield, com spindle 4, velocidade de 12 rpm a partir de 300 mL de amostra acondicionada em béquer e mantida à temperatura de refrigeração por 12 h após homogeneização.

Para análise de firmeza as formulações foram submetidas ao texturômetro TA-XT2i (Stable Micro Systems), utilizando probe cilíndrico de acrílico P 25/L, profundidade de compressão de 20 mm, velocidade de compressão do sensor de 2mm/s, força de trigger de 0,05 N. Para a realização dos testes, primeiramente as formulações foram acondicionadas em recipientes de 100 mL após homogeneização, sendo analisadas após 12 h de repouso sob refrigeração (BAÚ, 2014).

## **2.8 Análise estatística**

As análises foram realizadas em triplicata. A otimização da formulação e os coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) foram determinados por meio de software Statistica 7.0 e teste de Tukey, para comparação de médias no nível de 5% de significância. Os dados referentes a composição química foram submetidos ao teste t.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) e ácidos orgânicos

O extrato de soja contendo 3% de farinha de okara fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 durante 72 horas de fermentação foram submetidos à análise para verificação da capacidade de inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE), produção de ácido láctico e acético. Os dados para o *Lactobacillus plantarum* BG112 encontram-se na Figura 1 e para o *Lactobacillus acidophilus* LA3 na Figura 2.

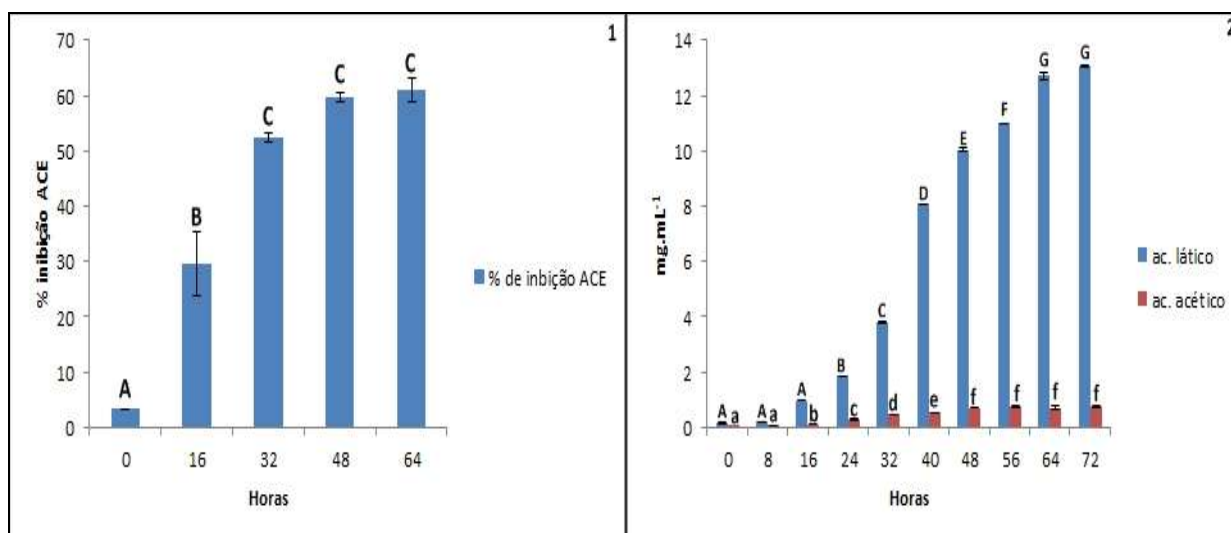


Figura 1. (1) Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE); (2) Ácidos orgânicos em extrato de soja contendo farinha de okara fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112.

Durante o processo fermentativo houve o aumento significativo na capacidade de inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE). Este aumento ocorreu de forma significativa até 32 horas de fermentação para o LP BG112, estabilizando-se a partir deste ponto. Já a fermentação do extrato de soja contendo farinha de okara por *Lactobacillus acidophilus* LA3 (Figura 2) promoveu também o aumento progressivo na capacidade de inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE) até 48 horas de fermentação. A capacidade de inibição de ACE está relacionada à atividade anti-hipertensiva no organismo uma vez que a

angiotensina é responsável pela produção da angiotensina II que é um poderoso vasoconstritor.

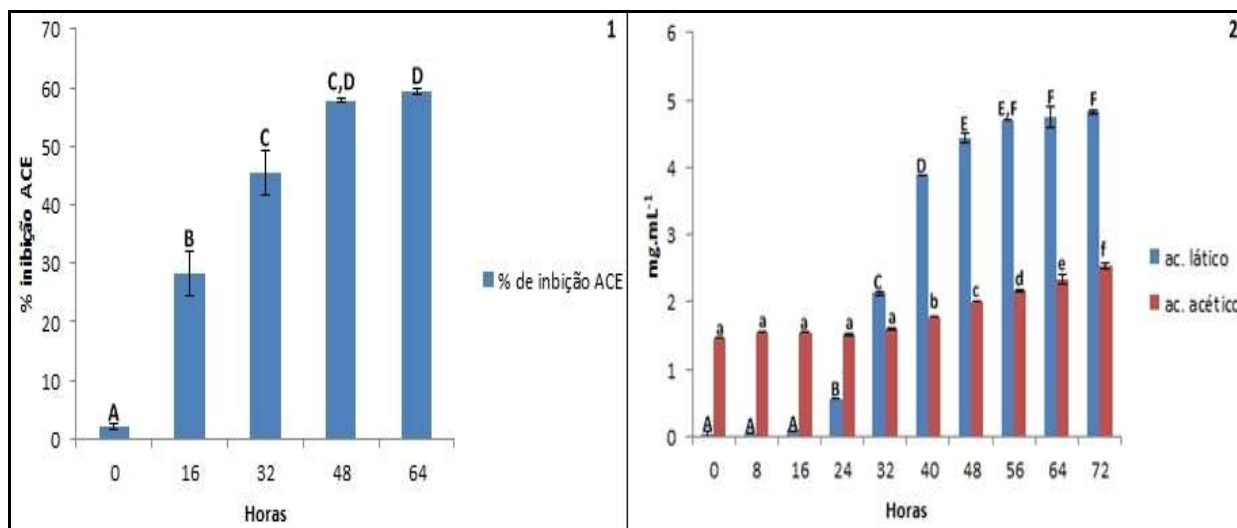


Figura 2. (1) Inibição in vitro da enzima conversora da angiotensina (ACE); (2) Ácidos orgânicos em extrato de soja contendo farinha de okara fermentado por *Lactobacillus acidophilus* LA3.

Em trabalho realizado por Shu et al. (2015), os autores relataram comportamento similar ao fermentarem leite de cabra com *Lactobacillus plantarum* LP69 ocorrendo aumento progressivo durante as 36 horas de fermentação, com maior intensidade nas primeiras 14 horas de fermentação, associando o aumento da capacidade inibitória com o crescimento celular do microrganismo uma vez que este encontra-se na fase logarítmica, apresentando alta atividade proteolítica e hidrólise de proteínas. Apostolidis et al. (2007), ao estudarem a fermentação de leite e extrato de soja por *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus* reportaram que para ambos os microrganismos estudados, a fermentação promoveu o aumento na capacidade de inibição de ACE tanto em leite quanto em extrato de soja.

Ewe et al. (2011) ao estudarem a capacidade de inibição de ACE e conversão de isoflavonas por *Lactobacillus acidophilus* relatam aumento na capacidade de inibição conforme ocorre a fermentação. Ainda segundo os autores, a ingestão de alimentos que apresentam a capacidade de contribuir com o controle da hipertensão é importante no auxílio ao controle deste fator de risco. Neste trabalho houve o aumento até 32 horas de fermentação para o LP BG112 e 48 horas para o LA3, atingindo uma capacidade de inibição de ACE acima de 50%. A diminuição na taxa

de aumento a partir das 32 e 48 horas de fermentação para cada microrganismo ocorre em virtude da acidificação do meio que inibe as enzimas proteases e peptidases produzidas pelo microrganismo.

Alguns compostos identificados em molho de soja com capacidade de inibir ACE são a nicotianamina e Ser-trp (serina-triptofano). Segundo Shimakage, Shinbo e Yamada (2012) ao tratarem natto e extrato de soja com proteases verificaram o aumento da inibição de ACE por peptídeos derivados deste tratamento. Segundo os autores, o extrato de soja tratado com protease comercial apresentou uma atividade 36 vezes mais elevada que o extrato não tratado com a enzima. O extrato de soja contendo 3% de farinha de okara apresentou uma atividade inicial de aproximadamente 4% de inibição, alcançando após 32 horas de fermentação uma capacidade de aproximadamente 53% de inibição um aumento de 13 vezes na inibição de ACE para o LP BG112. Para o LA3 em seu tempo inicial houve uma taxa de inibição de aproximadamente 2%, alcançando após 48 horas de fermentação uma capacidade de aproximadamente 58% de inibição.

Ao longo das 72 horas de fermentação houve o aumento na produção de ácido láctico e acético a partir da fermentação de açúcares como oligossacarídeos presentes na matéria prima. O aumento na concentração de ácido láctico e acético ocorreu respectivamente até 64 e 48 horas de fermentação para o LP BG112 (Figura 1) atingindo uma concentração final superior a  $12 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ácido láctico e  $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$  para o ácido acético. Para o LA3 o aumento na concentração de ácido láctico ocorreu até 56 horas de fermentação com uma concentração final de aproximadamente  $4,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Em relação ao ácido acético a concentração inicial estava em torno de  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  com aumento progressivo até 72 horas de fermentação, com uma concentração final de aproximadamente  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ou seja, ao longo das 72 horas de fermentação houve o aumento de aproximadamente  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ácido acético. A maior concentração inicial de ácido acético nas amostras fermentadas por LA3 se deve ao ajuste do pH inicial do meio que era realizado pela adição de solução de ácido acético.

O extrato de soja e farinha de okara apresentam oligossacarídeos rafinose e estaquiose, além de sacarose, que são utilizados como fonte de energia por microrganismos (Matsuyama, et al., 1992; Chen, et al. 2010). Matsuyama et al. (1992), ao estudarem a fermentação por *Bifidobacterium* em extrato de soja

observaram que preferencialmente ocorre o consumo dos oligossacarídeos e ao cessar esta fonte de energia, a sacarose passa a ser utilizada como fonte de energia, ocorrendo o aumento progressivo da acidez e redução do pH.

Já Elghali et al. (2014) ao estudarem as variações durante a fermentação de extrato de soja por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, relataram o consumo contínuo desses açúcares durante as 48 horas de fermentação para o *Lactobacillus plantarum*, existindo o aumento progressivo na concentração de ácido acético e láctico durante esse período, com uma concentração final de ácido láctico de aproximadamente 3 vezes maior que a de ácido acético.

Tomás et al. (2003) relatam a concentração final de ácido láctico de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em diferentes meios de crescimento para *Lactobacillus acidophilus* após 24 horas de fermentação, similar ao observado neste trabalho. Segundo dados de Charalampopoulos, Pandiella, Webb (2002), ao caracterizarem o crescimento de potenciais probióticos em substratos compostos de cereais, relatam o aumento nos níveis de ácido láctico e acético ao longo da fermentação.

### **3.2 Otimização da formulação de molho cremoso de soja**

Foram realizados nove ensaios aplicando o planejamento experimental de misturas simplex-centróide para cada microrganismo, obtendo-se os valores médios das respectivas funções respostas (Tabela 1) para  $y_1$  (CRA),  $y_2$  (Viscosidade) e  $y_3$  (Firmeza) com seus respectivos coeficientes de regressão e análise de variância dos modelos matemáticos (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficientes de regressão e análise de variância dos modelos matemáticos ajustados às variáveis resposta para *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3.

Coeficientes	Variáveis Resposta		
	Y1*	Y2*	Y3*
<b>LP BG112</b>			
Linear			
B <sub>1</sub>	56,40**	1727**	0,2111**
B <sub>2</sub>	95,61**	1701**	0,2404**
B <sub>3</sub>	51,38**	1652**	0,1983*
Quadrático			
B <sub>12</sub>	35,30**	-	-
B <sub>13</sub>	18,64**	289**	0,0554**
B <sub>23</sub>	-93,85**	-1735**	-
Cúbico			
B <sub>123</sub>	-	5102**	-
R <sup>2</sup>	0,998	0,997	0,903
<b>LA3</b>			
Linear			
B <sub>1</sub>	43,95**	970**	0,1777**
B <sub>2</sub>	55,66**	1980**	0,2082**
B <sub>3</sub>	30,88**	780**	0,1848**
Quadrático			
B <sub>12</sub>	18,83**	1508**	-
B <sub>13</sub>	15,30**	4072**	-
B <sub>23</sub>	-52,00**	-1960**	-0,0418
Cúbico			
B <sub>123</sub>	249,21**	3515**	0,2503**
R <sup>2</sup>	0,995	0,999	0,938

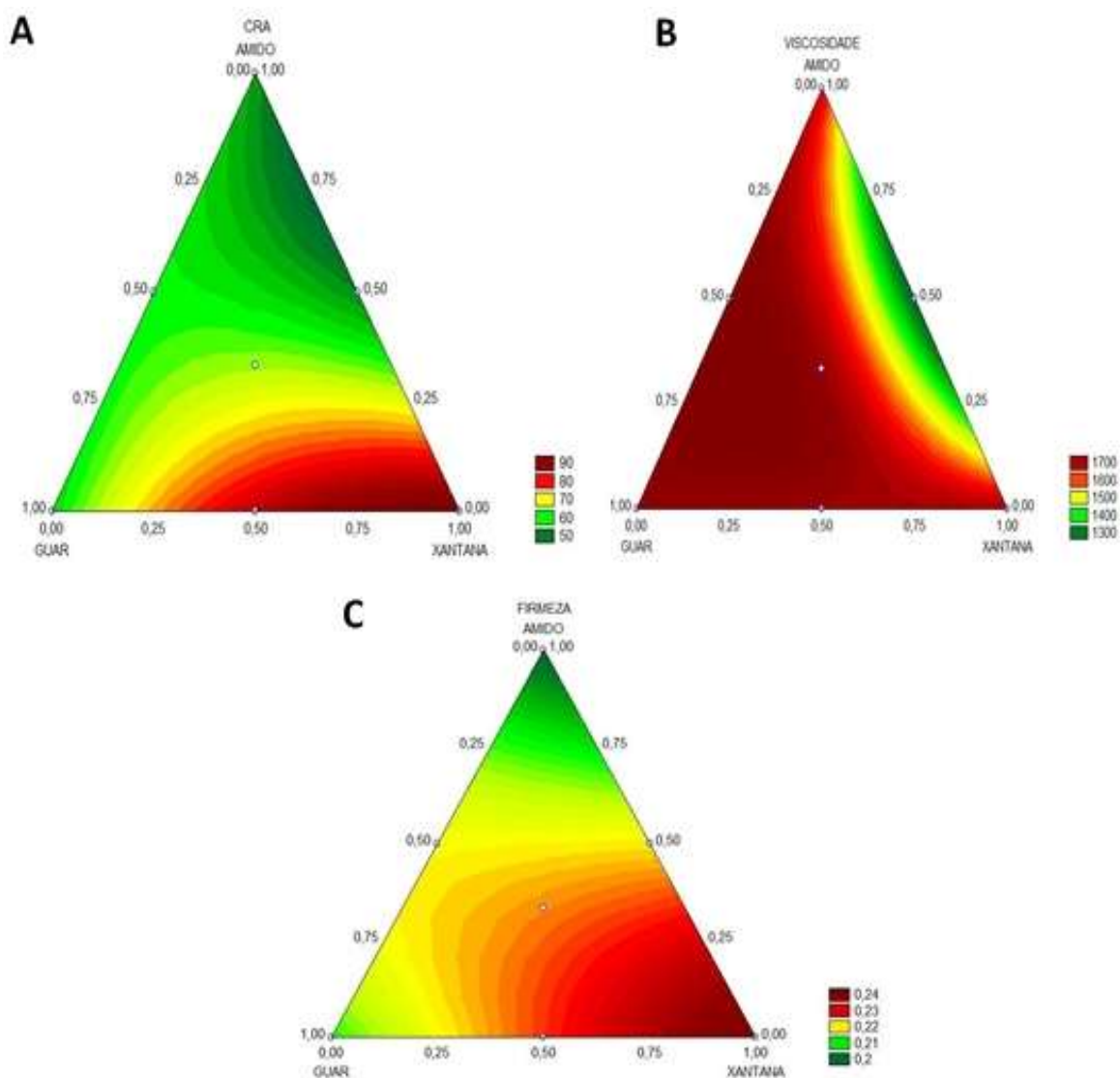
\* y<sub>1</sub>= CRA (%), y<sub>2</sub>= Viscosidade (centipoise), y<sub>3</sub>= Firmeza (N)

\*\*Significativo ao nível de 5%

Através do planejamento de mistura simplex-centróide para o LP BG112 usando modelo cúbico especial foram obtidos um coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) respectivamente para as variáveis respostas CRA, viscosidade e firmeza de 0,99, 0,99, 0,90 não apresentando falta de ajuste significativa. Conforme a Figura 3 (A, B, C) pode-se observar os efeitos da adição de goma guar, goma xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca na formulação dos molhos para CRA, viscosidade e firmeza. Para o LA3 a falta de ajuste também não foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) com coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,99, 0,99 e 0,94 respectivamente para CRA, viscosidade e firmeza, apresentando na Figura 4 (A, B, C) os efeitos da adição das gomas nas respostas analisadas.

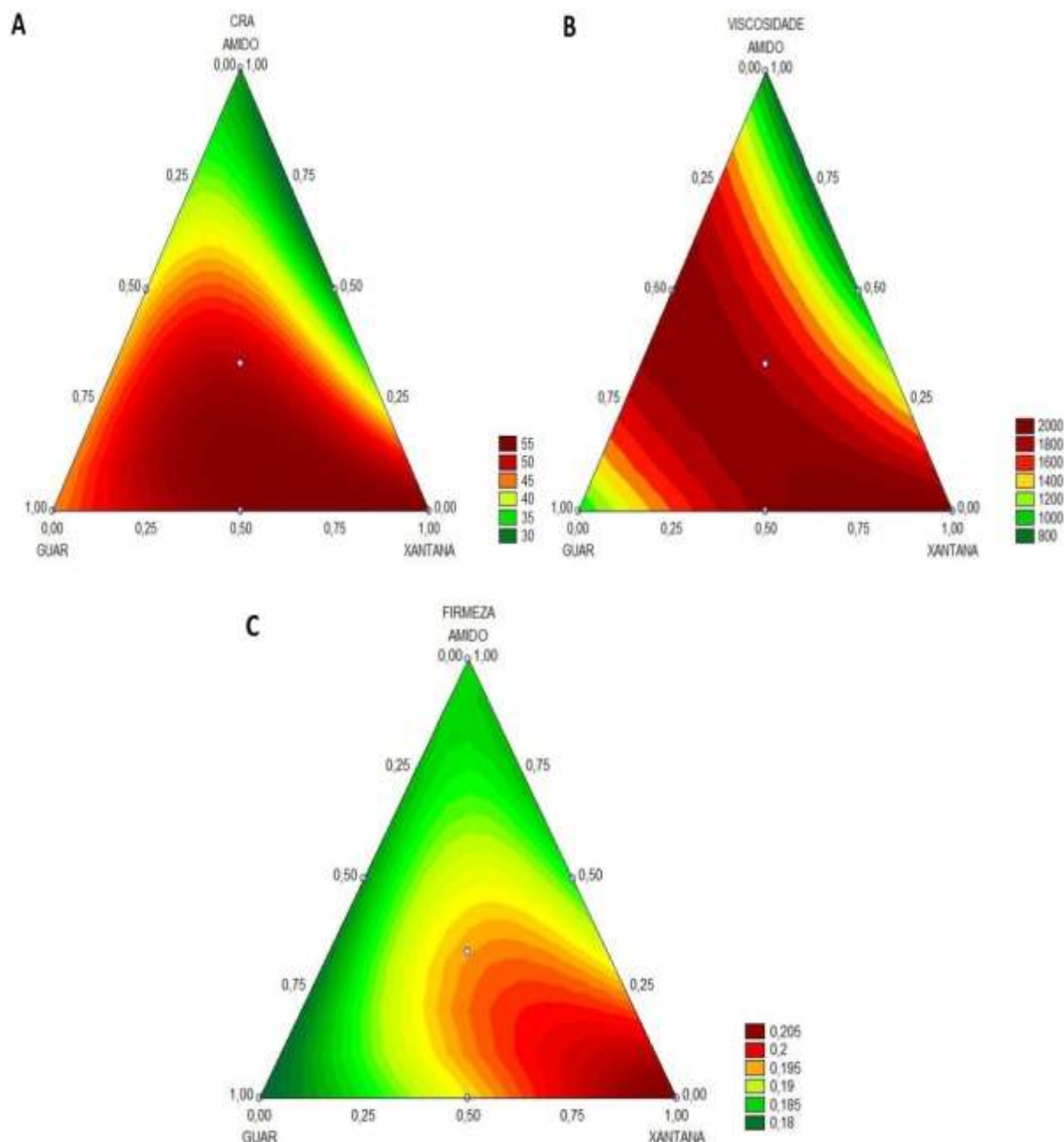
Os coeficientes da equação para LP BG112 e LA3 segundo a CRA (y<sub>1</sub>) apontam que os termos lineares apresentam elevada contribuição da goma xantana (X<sub>2</sub>), seguido da goma guar (X<sub>1</sub>) e amido pré-gelatinizado de mandioca

(X<sub>3</sub>). Pelas superfícies de respostas (Figura 3A) para o LP BG112 nota-se uma tendência de aumento na CRA conforme acréscimo no teor de goma xantana e mistura binária de goma guar e goma xantana.



**Figura 3** – Superfície de resposta para  $y_1$ = CRA (%) (A),  $y_2$ = Viscosidade (centipoise) (B),  $y_3$  = Firmeza (N) (C) para misturas contendo goma guar, xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca em molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112.

O LA3 apresentou comportamento similar aos resultados obtidos para o LP BG112 (Figura 3A), aumentando a CRA pelo uso de goma xantana pura ou mistura binária de goma guar e goma xantana (Figura 4A). Para ambos os microrganismos, segundo os dados da Tabela 1 os ensaios das formulações dos ensaios 2 (goma xantana) e 4 (mistura binária de goma guar e xantana) apresentaram as maiores CRA (Tabela 1).



**Figura 4** – Superfície de resposta para  $y_1$ = CRA (%) (A),  $y_2$ = Viscosidade (centipoise) (B),  $y_3$  = Firmeza (N) (C) para misturas contendo goma guar, xantana e amido pré-gelatinizado de mandioca em molho cremoso de soja com *Lactobacillus acidophilus* LA3.

Para a viscosidade ( $y_2$ ) segundo os termos lineares a goma guar pura proporcionou os maiores resultados para o LP BG112. Conforme a superfície de resposta (Figura 3B) a viscosidade apresentou uma máxima resposta quando empregada a mistura binária de goma guar e xantana ou goma guar e amido pré-gelatinizado, além do uso puro de goma guar. Para o LA3 segundo os termos lineares, a goma xantana pura proporcionou os maiores resultados para viscosidade, seguido da goma guar. Conforme a superfície de resposta (Figura 4B) a viscosidade apresentou uma máxima resposta quando empregada a mistura binária de goma guar e xantana, goma guar e amido pré-gelatinizado ou goma xantana pura.

Ao se utilizar apenas a goma xantana ocorre o aumento na firmeza ( $y_3$ ) do molho conforme dados presentes na superfície de resposta (Figura 3 C) para o LP BG112 e LA3 (Figura 4 C). Segundo dados da Tabela 1, os ensaios 2 e 4 (Tabela 1) contendo apenas goma xantana ou mistura binária de goma guar e xantana apresentaram os maiores valores para viscosidade e firmeza para o LP BG112 e LA3.

Segundo Sofjan e Hartel (2004) a goma xantana e goma guar em meio aquoso se dispersam rapidamente, favorecendo a ligação com a água e hidratação em água fria. Segundos os dados da Tabela 1 e Figuras 2 e 3 essas propriedades ficam evidentes, uma vez que os maiores valores encontrados para as variáveis respostas sempre apresentam a presença de uma dessas gomas, sejam puras ou em combinações.

Além disso, o extrato de soja contendo farinha de okara apresenta sólidos totais que contribuem com as propriedades funcionais do molho como melhoria da CRA e viscosidade, uma vez que o aumento na concentração de polímeros como proteínas contribuem com o aumento da viscosidade (Damodaran & Parkin, 2010). O uso de gomas e amidos associados às características intrínsecas da matriz utilizada auxiliaram na estabilidade do produto, pois a acidificação e outros fatores podem favorecer a coagulação e sinérese excessiva no produto, o que contribuiria com a baixa aceitação e aspectos de inadequação para o consumo.

Teles e Flores (2007) ao estudarem a influência da adição de espessantes e leite em pó nas propriedades reológicas de iogurte desnatado

reportaram que a máxima viscosidade foi alcançada na formulação que continha leite em pó, gelatina, goma xantana e goma guar, associando o maior teor de sólidos como proteínas e presença de gomas à esse aumento proporcionado na viscosidade. Magenis et al. (2006) relatam a relação entre teores de proteínas em iogurtes e sinérese, associando menores concentrações ao aumento na perda de água. Já Sodini, Montella & Tong (2005) ao estudarem as propriedades físicas de iogurtes fortificados com concentrados proteicos comerciais verificaram a variação em suas propriedades como firmeza e viscosidade quando utilizado concentrados proteicos que apresentavam maiores teores de nitrogênio não proteico e maiores valores de desnaturação proteica.

O uso de gomas promove modificações nas propriedades funcionais das matrizes em que são incorporadas pela formação de gel ou interação direta com a água (Bahrami et al. 2013). Segundo os autores a máxima CRA foi obtida em presença de 0,1% de goma xantana e 0,3% de beta-glucana. Adicionalmente, o máximo valor de firmeza foi obtido em presença de goma xantana e beta-glucanas. O aumento nos teores de goma guar promoveu a redução da rigidez da amostra. Observando a superfície de resposta, verifica-se que há uma redução da firmeza ao se introduzir outras gomas em conjunto com a goma xantana, comportamento semelhante ao descrito pelos autores (Figura 2C e 3C).

A mistura binária contendo goma xantana e goma guar foi escolhida como mais adequada para a elaboração do **molho cremoso de soja probiótico** contendo *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 em decorrência das respostas e comportamento obtidos serem mais adequados a molho, uma vez que o uso da goma xantana pura contribuiu para uma consistência elástica, que poderia interferir na aceitação do molho de forma negativa.

### **3.3 Composição Química**

Os valores da composição química das amostras encontram-se na Tabela 4. A farinha de okara apresentou somente o teor de carboidratos

superior ao grão, tendo os demais constituintes valores significativamente menores. Segundo Lin e Lai (2006), em média a soja preta apresenta a composição de 9,3% de umidade, 14,5% de lipídeos, 5,45% cinzas e 41,50% proteínas. Já Bowles & Demiate (2006) encontraram os valores médios de 4,7 % de cinzas, 37% de proteínas, 21% de lipídeos e 37% de carboidratos em base seca. Em ambos os trabalhos os valores encontrados foram similares à composição da soja utilizada neste trabalho.

Tabela 4. Composição Química: Soja BRS 257, farinha de okara, extrato de soja, extrato de soja contendo 3% de farinha de okara e molho cremoso de soja probiótico em base úmida.

Composição Centesimal					
Amostra	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídeos	Carboidratos
<b>Grão BRS 257</b>	10,58 <sup>a</sup> ± 0,02	4,54 <sup>a</sup> ± 0,01	38,35 <sup>a</sup> ± 0,13	14,00 <sup>a</sup> ± 0,13	32,51 <sup>b</sup> ± 0,09
<b>FO*</b>	6,23 <sup>b</sup> ± 0,08	4,13 <sup>b</sup> ± 0,01	36,87 <sup>b</sup> ± 0,34	8,84 <sup>b</sup> ± 0,31	43,91 <sup>a</sup> ± 0,57
<b>ES**</b>	93,46 <sup>c</sup> ± 0,05	0,38 <sup>d</sup> ± 0,00	4,61 <sup>d</sup> ± 0,22	1,24 <sup>d</sup> ± 0,05	0,42 <sup>d</sup> ± 0,05
<b>ES + 3% FO***</b>	89,88 <sup>d</sup> ± 0,07	0,57 <sup>c</sup> ± 0,01	6,36 <sup>c</sup> ± 0,20	1,60 <sup>c</sup> ± 0,04	1,57 <sup>c</sup> ± 0,22
<b>Molho LP BG112****</b>	78,47 <sup>e</sup> ± 0,06	1,62 <sup>e</sup> ± 0,02	3,5 <sup>e</sup> ± 0,02	11,48 <sup>e</sup> ± 0,19	5,16 <sup>e</sup> ± 0,22
<b>Molho LA3*****</b>	78,47 <sup>e</sup> ± 0,42	1,63 <sup>e</sup> ± 0,05	3,38 <sup>e</sup> ± 0,11	11,56 <sup>e</sup> ± 0,07	4,95 <sup>e</sup> ± 0,37

(Grão BRS 257 e FO); (ES e ES + 3% FO) e (Molho LP BG112 e Molho LA3): Médias ± Desvio seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente no teste "T" ao nível de 5% de significância.

\*Farinha de okara; \*\* Extrato de soja; \*\*\*Extrato de soja + 3 % de farinha de okara.\*\*\*\**Lactobacillus plantarum* BG112; \*\*\*\*\**Lactobacillus acidophilus* LA3.

O acréscimo de farinha de okara ao extrato de soja promoveu o aumento significativo nos teores de sólidos totais.

Produtos como maioneses e molhos apresentam em sua composição elevados teores lipídicos, sendo caracterizados como emulsões do tipo óleo/água. O uso de gomas, amidos, gelatina, dentre outros compostos proporcionaram a redução dos teores de lipídeos em diversos produtos, auxiliando na manutenção de suas características (Paraskevopoulou et al. 2003; Damodaran & Parkin, 2010). A adição de óleo elevou a concentração de lipídeos no produto como esperado e observado nos valores apresentados pelos extratos de soja com e sem adição de farinha de okara, entretanto os

valores observados nos molhos para lipídeos são inferiores a marcas comerciais e valores encontrados na literatura, com uma redução de aproximadamente 50% a molhos comerciais para salada.

Segundo Morales-Aizpurúa & Tenuta-Filho (2005), ao caracterizarem marcas de maionese comerciais verificaram que todas as amostras apresentavam valores acima de 70% de lipídeos, valores muito acima aos encontrados neste trabalho para os respectivos molhos desenvolvidos. Campos et al. (2009) ao desenvolverem molho cremoso a base de extrato de soja (com diferentes teores de lipídeos), obtiveram para a formulação com menor adição de óleo a adição mínima de 30% de óleo na formulação, valor 3 vezes maior a concentração utilizada neste trabalho. Segundo Dickinson & Stainsby (1982) e Dickinson (2003), molhos para salada variam o teor de lipídeos entre 20 – 65%, tendo a obrigatoriedade da adição de hidrocolóides quando se reduz o teor lipídico em função do aumento da instabilidade das emulsões obtidas.

#### **4. Conclusão**

A fermentação do extrato de soja contendo 3% de farinha de okara por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 promoveu a acidificação do meio pela produção de ácido láctico e acético e aumentou a capacidade de inibição de ACE em decorrência de provável hidrólise de proteínas e produção de peptídeos bioativos, alcançando valores superiores a 50% em sua capacidade de inibição. A mistura binária de goma guar e goma xantana foi escolhida para elaboração do molho cremoso de soja probiótico mediante o comportamento obtido no delineamento de misturas simplex-centróide. Os molhos produzidos apresentaram uma redução no teor de lipídeos em relação a marcas comerciais de molhos para saladas e dados da literatura.

#### **Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Araucária (FA - Paraná), Brasil pela bolsa concedida ao aluno M.L.M.-F.

## Referências

- Alloncle, M; Lefebvre, J; Llamas, G; Doubliers, J. L. (1989). A Rheological Characterization of Cereal Starch-Galactomannan mixtures. *Cereal Chemistry*, 66, 90-93.
- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International - Volume I and II, 18th Edition, Rev. 1.
- Apostolidis, E; Kwon, Y; Ghaedian, R; Shetty, K. (2007). Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food Biotechnology*, 21, 217-236.
- Barros Neto, B; Scarminio, I.S; Bruns, R.E. (2003). Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora Unicamp, 2ªed.
- Baú, T. R; Garcia, S; Ida, E. I. (2014). Evaluation of a Functional Soy Product with Addition of Soy Fiber and Fermented With Probiotic Kefir Culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 402 – 409.
- Bahrami, M; Ahmadi, D; Alizadeh, M; Hosseini, F. (2013). Physicochemical and Sensorial Properties of Probiotic Yogurt as Affected by Additions of Different Types of Hydrocolloids. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33, 363 -368.
- Bowles, S; Demiate, I. M. (2006). Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 652-659.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 2 de 07 Janeiro de 2002.
- BeMiller, J. N; Huber, K. C. (2010). Carboidratos. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editors. *Química de Alimentos*. 4th ed. RS, Brazil: Porto Alegre. pp. 75–129.
- Campos, D. C. P; Antoniassi, R; Deliza, R; Freitas, S. C; Felberg, I. (2009). Molho cremoso à base de extrato de soja: estabilidade, propriedades reológicas, valor nutricional e aceitabilidade do consumidor. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 916 – 926.
- Charalampopoulos, D; Pandiella, S. S; Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 851–859.
- Chen, H; Li-Jun, L; Jian-Jun, Z; Bo, X; Rui, L. (2010). Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effect on ATPase activities in

hyperlipidemic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 229-231.

Ciabotti, S; Barcelos, M. F. P; Cirillo, M. A; Pinheiro, A. C. M. (2009). Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 346-353.

Coscione, A.R; Andrade, J.C; May, G.M. (2005). O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. *Química Nova*, 28, 1116-1122.

Damodaran,S; Parkin, K.L; Fennema, O.R. (2010). *Química de alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 4.ed.

Dickinson, E.; Stainsby, G. 1982. *Colloids in foods*. London: Elsevier Applied Science.

Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.

Donkor, O. N; Henriksson, A; Vasiljevic, T; Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, INRA Editions, 87, 21-38.

Donkor, O. N. & Shah, N. P. (2008). Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Food Microbiology and Safety*, 73, 15-20.

Elfahri, K.R; Donkor, O.N; Vasiljevic, T. (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38, 37-46.

Elghali, S; Mustafa, S; Amid, M; Manap, M. Y. A; Ismail, A; Abas, F. (2014). Variations on soymilk components during fermentation by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12, 1 – 5.

Ewe, J.A; Wan-Abdullah, W-N; Alias, A. K; Bhat, R; Liong, M-T. (2011). ACE inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *British Food Journal*, 9, 1127 -1146.

Li, J. H; Vasanthan, T; Hoover, R; Rossnagel, B. G. (2004). Starch from hull-less barley: IV. Morphological and structural changes in waxy, normal and high-amylose starch granules during heating. *Food Research International*, 37, 417–428.

Lin, P.Y; Lai, H. M. (2006). Bioactive Compounds in Legumes and Their Germinated Products. *Journal of Food Science*, 54, 3807–3814.

Liu, K. (1997). *Soybeans: Chemistry, technology and utilization*. New York: Chapman & Hall.

Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. (2003). Production of a yogurt-like product from *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 515–522.

Matsuyama, J; Hirata, H; Yamagishi, T; Hayashi, K; Hirano, Y; Kuwata, K; Kiyosawa, I; Nagasawa, T. (1992). Fermentation Profiles and Utilization of Sugars of bifidobacteria in Soymilk. *Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39, 887 – 893.

Magenis, R.B; Prudêncio, E.S; Amboni,R.D.M.C; Cerqueira Jr. N.G; Oliveira,R.V.B; Soldi,V; Benedet, H. D. (2006). Compositional and physical properties of yogurt manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 560-568.

Moraes Filho, M. L; Busanello, M; Garcia, S. (2016). Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 456 – 464.

Morales-Aizpurua, I. C., Tenuta-Filho, A. (2005). Colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em maionese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 495-499.

Mishra, A; Malhotra, A. V. (2009). Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 8528 – 8536.

Navarrete-Bolanos, J. C; Jimenez-Islas, H; Botello-Alvares, E; Rico-Martinez, R. (2003). Mixed Culture Optimization for Marigold Flower Ensilage via Experimental Design and Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2206.

Otieno, D.O; Ashton, J. F; Shah, N. P. (2005). Stability of b-glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus spp.* In fermented soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science*, 29, 236–241.

Ozer, B. H; Bell, A. E; Grandison, A. S; Robinson, R. K. (1998). Rheological Properties of Concentrated Yogurt (labneh). *Journal of Texture Studies*, 29, 67-79.

Paraskevopoulou, A; Athanasiadis, I; Blekas, G; Koutinas, A. A; Kanellaki, M; Kiosseoglou, V. (2003). Influence of polysaccharide addition on stability of a cheese whey kefir-milk mixture. *Food Hydrocolloids*, 2003, 615–620.

Rojas, J; Uribe, Y; Zuluaga, A. (2012). Powder and compaction characteristics of pregelatinized starches. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 513-517.

Rossi, E. A; Rosier, I; Damasso, A.R; Carlos, I.Z; Vendramini, R.C; Abdala, D.S.P; Talarico, V.H; Minto, D.F. (2004). Determinação de Isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de Soja. *Alimentos e Nutrição*, 15, 93-99.

Setchell, K.D.R; Brown, N.M; Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132, 3577–3584.

Shimakage, A; Shinbo, M; Yamada, S. 2012. ACE inhibitory substances derived from soy foods. *Journal of Biological Macromolecules*, 12, 72 – 80.

Shu, G; Yang, H; Chen, H; Zhang, Q; Tian, Y. (2015). Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ace inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum LP69*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14, 107 – 116.

Sodini, I; Montella, J; Tong, P. S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 853–859.

Sofjan, R.P; Hartel, R.W.(2004). Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. *International Dairy*, 14, 255-262.

Tomás, M. S. J; Ocan, V. S; Wiese, B; Nader-Macias, M. E.(2003). Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 1117–1124.

Teles, C. D; Flores, S. H. (2007). Influência da adição de espessantes e leite em pó nas características reológicas do iogurte desnatado. *Boletim do CEPPA*, 25, 247-256.

Wang, Y.C; Yu, R. C; Chou, C.C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 18, 128–135.

### 8.3 Artigo Científico 3

**Molho cremoso de soja fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3: Caracterização, estabilidade ao armazenamento e aceitação sensorial.**

**Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Garcia, S.**

**Periódico:** *Journal of Food Science and Technology*

**Molho cremoso de soja fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3: Caracterização, estabilidade ao armazenamento e aceitação sensorial.**

**Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Garcia, S.**

palavras-chave: antioxidante, funcional, gastrointestinal, probiótico.

**Resumo**

A soja e seus derivados estão presentes em nossa alimentação nas mais variadas formas, fornecendo aos consumidores muitos compostos de interesse biológico. Este trabalho visou caracterizar molho cremoso de soja probiótico contendo *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3. A estabilidade ao longo de 30 dias a 5 °C foi determinada pela contagem de LP BG112 e LA3, sobrevivência durante simulação de condições gastrointestinais, cor, viscosidade, capacidade de retenção de água (CRA), fenólicos totais, atividade antioxidante nos testes de DPPH•, ABTS+• e FRAP• e aceitação sensorial. As contagens de *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 permaneceram acima de 8 log UCF.g<sup>-1</sup> após 30 dias de armazenamento, apresentando após a simulação em condições gastrointestinais redução de aproximadamente 3 log UFC.g<sup>-1</sup> de amostra para cada microrganismo, ressaltando que a contagem final permaneceu acima de 6 log UCF.g<sup>-1</sup> de amostra. Não houve diferença significativa para a viscosidade e CRA ao longo do armazenamento. A atividade antioxidante para os testes de DPPH•, ABTS+• e FRAP• de um modo geral não apresentou diferença significativa após 30 dias de armazenamento a 5 °C. No teste de aceitação cada molho atingiu uma nota global próxima a 7,0 correspondendo na escala utilizada ao gostei moderadamente, sendo considerada satisfatória a aceitação por tratar-se de um produto a base de soja, portanto não houve diferença entre as linhagens quanto a aceitação do produto.

## 1. Introdução

Considerada como uma excelente fonte proteica de origem vegetal, a soja é amplamente consumida e fornece nutrientes em quantidade e qualidade aos consumidores, sendo alvo de inúmeras pesquisas pela associação do seu consumo com benefícios à saúde do consumidor (Liu, 1997; Liu, 2004; Chan et al., 2007). Apresenta compostos de interesse como isoflavonas, proteínas de qualidade, dentre outros compostos. Sua ingestão é associada com prevenção de doenças como câncer, osteoporose, doenças coronárias, redução nos níveis do colesterol LDL, dentre outras (Liu, 1997; Setchell et al. 2002).

Nas últimas décadas com o avanço na biotecnologia, novos produtos fermentados a base de soja tem sido desenvolvidos, dentre os quais podemos citar os fermentados com bactérias ácido lácticas que abrange a classe de bactérias definidas como probióticas. Estes microrganismos são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo quando consumidos de forma regular e em concentração adequada (FAO, 2006). Além disso, o processo fermentativo está associado a mudanças sensoriais e nutricionais na matriz alimentar como a conversão de isoflavonas pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase e aumento nos níveis de ácido láctico, promovendo mudanças sensoriais (Donkor & Shah, 2008; Cho et al. 2012; Kim et al. 2014; Roopashri, Varadaraj, 2014; Mukherjee et al. 2015).

Com a maior preocupação por uma alimentação saudável por parte da população e avanços em pesquisas que mostram a influência dos alimentos na saúde do indivíduo, existe uma crescente demanda por alimentos que propiciem benefícios ao consumidor, uma vez que pelas características da vida moderna houve um aumento expressivo no número de indivíduos com sobrepeso ou obesidade (Tardido, Falcão, 2006; Santos et al. 2013).

Polissacarídeos apresentam elevado uso em diversas áreas como farmacêutica e alimentícia. Suas funções em alimentos visam melhorar propriedades funcionais, refletindo sobre a estabilidade ao longo do armazenamento, propiciando a manutenção das características dos produtos (Dea, 1989; Lapasin, Pricl, 1995).

Os hidrocolóides, também denominados de gomas, são carboidratos ou proteínas utilizados em diferentes setores industriais, que apresentam propriedades como espessante ou gelificante. As fontes de obtenção variam, podendo ser obtidos de fonte vegetal, animal ou microbiana (Tooping, 1993).

Existem diferentes hidrocolóides e comumente são utilizados em sinergismo como, por exemplo, a goma xantana e goma guar. Caracterizada como um polissacarídeo produzido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*, a goma xantana é empregada em diversos produtos alimentícios, higiene pessoal, cosméticos, etc. Dentre suas características, destacam-se a elevada solubilidade a frio com produção de soluções altamente viscosas em baixas concentrações (Rosalam, England, 2006; BeMiller, Huber, 2010).

A goma guar é obtida pela moagem do endosperma de sementes por métodos mecânicos como torrefação, clivagem e raspagem por atrito. Resumidamente é constituída por galactomananas consistindo de uma cadeia linear principal de  $\beta$ -D-manopiranosil e ramificações de uma unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosil. A goma guar tem se destacado como suplemento de fibra solúvel, sendo relatada sua eficácia na redução de hiperglicemia e colesterol (Slavin, Greenberg, 2003; Kays et al. 2006; BeMiller, Huber, 2010). Yonekura et al. (2013) relatam o auxílio na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em presença de gomas durante condições de simulação gastrointestinal e estabilidade ao armazenamento, o que é uma característica importante em produtos contendo probióticos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar molho de soja probiótico contendo *Lactobacillus plantarum* BG112 (LP BG112) ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 (LA3) durante 30 dias de armazenamento a 5 °C para contagem de bactérias lácticas totais, sobrevivência *in vitro* nas condições gastrointestinais, viscosidade, capacidade de retenção e água (CRA) , fenólicos totais, atividade antioxidante e aceitação sensorial.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Soja e Cultura**

Foram utilizados grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultivar BRS 257 (livre de lipoxigenase), safra 2012/2013 (Sementes Paraná Ltda., Mauá da Serra-PR). As culturas starter liofilizadas de *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3 foram fornecidas pela empresa Clericci-Sacco®, Cadorago – Itália. O preparo do inóculo seguiu o descrito por Moraes Filho, Busanello e Garcia (2016).

### **2.2 Extrato de soja, farinha de okara e Fermentação.**

O extrato de soja, farinha de okara e as condições de fermentação para cada microrganismo seguiu o descrito por Moraes Filho, Busanello, Garcia (2016).

### **2.3 Elaboração dos molhos cremosos probióticos.**

A proporção dos ingredientes utilizados na elaboração dos respectivos molhos encontra-se na Tabela 1. A produção de molho cremoso de soja probiótico seguiu metodologia descrita por Campos et al. (2009), com algumas modificações. Os molhos foram obtidos após a homogeneização dos ingredientes em processador de alimentos, utilizando a velocidade máxima durante 2 minutos. A concentração de gomas empregadas foi estabelecida previamente em trabalho realizado pelos autores, conforme dados não publicados. Para elaboração do molho utilizou-se extrato de soja contendo farinha de okara previamente fermentado por LP BG112 ou LA3. Em média os molhos apresentaram para composição aproximadamente 78,5% de umidade, 1,6% de cinzas, 3,5% de proteínas, 11,5% de lipídeos e 5,0% de carboidratos.

Tabela 1. Ingredientes para a formulação de produto

<b>Ingrediente</b>	<b>Proporção (g/Kg)</b>
Extrato de soja + 3 % de Okara fermentado*	865
Óleo de Soja	100
Sal	10
Açúcar	2
Alho em pó	10
Cebola em pó	10
Goma Guar	1,5
Goma Xantana	1,5

\*Fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3.

### 2.3.1 Controles

Para comparação, foram produzidos molhos controles sem adição de óleo ou goma para cara microrganismo empregado neste trabalho. O C1 consistiu de molho produzido sem adição de óleo ajustando o volume de extrato de soja fermentado para 965 g/Kg. C2 consistiu nos molhos produzidos sem adição de gomas, ajustando o volume de extrato de soja fermentado para 869 g/Kg respectivamente. Nessas duas formulações os demais ingredientes permaneceram constantes, totalizando 100%.

### 2.4 CRA e Viscosidade

A capacidade de retenção de água das amostras foi determinada adaptando a metodologia descrita por Ozer et al. (1998), onde 20 g da amostra foram submetidas a centrifugação a 10000 (x g) por 30 min a 10 °C. Após esta

etapa, o soro liberado foi coletado e pesado. A capacidade de retenção de água foi expressa em % (m/m).

A viscosidade foi determinada adaptando metodologia proposta por Baú (2014), utilizando viscosímetro digital Brookfield, com spindle 4, velocidade de 12 rpm a partir de 300 mL de amostra acondicionada em béquer e mantida à temperatura de refrigeração por 12 h após homogeneização.

## **2.5 Contagem de Bactérias Lácticas Totais**

A contagem de bactérias lácticas totais foi realizada em meio MRS (*Man, Rogosa e Sharpe*, HiMEDIA laboratories, Mumbai, Índia), sendo plaqueadas em profundidade e incubadas em aerobiose a 37°C por 72 h (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

## **2.6 Simulação *in vitro* da sobrevivência das bactérias lácticas (LP BG112 ou LA3) em condições gastrointestinais**

A análise seguiu a metodologia descrita por Nejati et al. (2011) com algumas modificações. Primeiramente 1 grama de amostra foi colocado em 10 mL de solução salina (5 g/L), ajustando o pH entre 1,4 – 1,9 com solução de HCL 0,5 M. Adicionou-se as enzimas pepsina e lipase de modo a atingir na amostra a concentração de 3 g/L e 0,9 mg/L respectivamente. Levou-se para incubação por 2 horas a 37 °C com posterior determinação das células viáveis por contagem em placas. Na segunda fase o pH da amostra foi ajustado para 4,3 – 5,2 com solução alcalina (150 ml de NaOH 1 M + 14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, logo após adicionou-se as soluções de bile e pancreatina atingindo as concentrações de 10 g/L e 1 g/L respectivamente na amostra, mantendo-se a 37 °C por 2 horas, seguindo para o plaqueamento. Na terceira e última fase, o pH foi ajustado para 6,7 – 7,5 com a solução alcalina e adicionado novamente bile e pancreatina, mantendo-se a 37 °C por 2 horas, seguindo para o plaqueamento. Os resultados foram expressos em log UFC.g<sup>-1</sup> de amostra.

## 2.7 Cor

A avaliação da cor foi realizada utilizando colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65. Os valores de L\*(luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB (Caldeira et al., 2010).

## 2.8 Compostos Fenólicos Totais

Os extratos foram obtidos adaptando metodologia descrita por Adom e Liu (2002) e Hung et al. (2009). Os extratos permaneceram a -22 °C até o uso. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais utilizou-se a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações, utilizando 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 10 %, 0,5 mL dos extratos das amostras e 2,0 mL de carbonato de sódio 75 g/L, permanecendo em repouso por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo para leitura em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom®, Cambridge, UK) a 760 nm. A quantificação foi realizada por meio de curva padrão com ácido gálico (0,1 – 0,5 mM) e o resultado expresso em mg equivalente de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de amostra.

## 2.9 Atividade Antioxidante

A capacidade de sequestrar DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995) com leitura em espectrofotômetro a 517 nm, com curva padrão de Trolox, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox.g<sup>-1</sup> de amostra.

A capacidade de sequestrar o cátion radical livre ABTS<sup>+</sup>. (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi realizada utilizando a metodologia descrita por Sanches-Gonzales et al. (2005), com leitura em espectrofotômetro UV-visível, a 730 nm,

com base na curva padrão de Trolox, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{g}^{-1}$  de amostra.

O poder de redução do ferro foi realizado de acordo com Benzie, Strain (1996), com algumas modificações. Para a avaliação da capacidade antioxidante uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio acrescentados 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (2,5 mL de uma solução TPTZ 10 mM em HCl 40 mM, 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM e 25 mL de tampão de acetato 0,3 mM pH 3,6). Após a homogeneização em agitador de tubos, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e a leitura da absorbância realizada a 595 nm. Soluções com diferentes concentrações de Trolox foram utilizadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  Trolox. $\text{g}^{-1}$  de amostra.

## **2.10 Análise Sensorial**

A análise sensorial consistiu em um teste de aceitação (Instituto Adolfo Lutz, 2008) utilizando escala hedônica de 9 pontos contou com a participação 89 julgadores, dos quais 29 eram homens e 60 mulheres com idades variando entre 20 e 50 anos. Dentre os julgadores 96,6% afirmaram gostar/consumir produtos fermentados e 66,2% gostam/consomem produtos de soja. 30,33% afirmaram consumir de forma moderada ou frequente produtos fermentados de soja e 31,4% consomem ocasionalmente molhos para saladas.

O produto foi avaliado em relação aos atributos cor, sabor, aroma, textura, aparência e aceitação global, utilizando escala hedônica de 9 pontos. Todos os participantes foram devidamente esclarecidos quanto a análise e eventuais desconfortos ocasionados pelo consumo do produto. O projeto obteve aprovação do Comitê de ética em pesquisa (Numero do parecer: 754.881, CAAE: 33609014.4.0000.5231). Durante a análise foram coletados os termos de consentimento livre para a participação, além de ficha para levantamento do perfil dos provadores. As amostras foram mantidas sob refrigeração e servidas aleatorizadas utilizando torradas sem sal como veículos para os molhos.

## 2.12 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias no nível de 5% de significância.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Sobrevivência ao armazenamento e simulação *in vitro* em condições gastrointestinais para *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3.

Durante os 30 dias de armazenamento houve redução significativa nas contagens de *Lactobacillus plantarum* BG 112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3, entretanto ressalta-se que a contagens para os molhos contendo LP BG112 ou LA3 após 30 dias permaneceram acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> de amostra (Tabela 2). As contagens iniciais dos microrganismos presentes no molho e de seus respectivos controles (C1 e C2) não diferiram estatisticamente. Em todos os molhos a partir de 15 dias de armazenamento houve uma redução significativa em relação às contagens iniciais.

Tabela 2. Contagem de células viáveis em molho cremoso de soja fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 e sobrevivência a simulação *in vitro* nas condições gastrointestinais durante 30 dias de armazenamento.

Molhos	log UFC.g <sup>-1</sup>	Fase 1	Fase 2	Fase 3
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG112				
LP 1	9,72 <sup>A</sup> ± 0,04 <sup>a</sup>	7,97 <sup>A</sup> ± 0,02 <sup>b</sup>	6,78 <sup>A</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>	6,74 <sup>A</sup> ± 0,04 <sup>c</sup>
LP 15	8,84 <sup>B</sup> ± 0,02 <sup>a</sup>	7,91 <sup>A</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,71 <sup>A</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>	6,66 <sup>A</sup> ± 0,04 <sup>c</sup>
LP 30	8,53 <sup>B</sup> ± 0,08 <sup>a</sup>	7,42 <sup>B,D</sup> ± 0,06 <sup>b</sup>	6,37 <sup>B</sup> ± 0,00 <sup>c</sup>	6,11 <sup>B,C</sup> ± 0,06 <sup>c</sup>
C1 1	9,59 <sup>A</sup> ± 0,06 <sup>a</sup>	7,52 <sup>B,D</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,33 <sup>B,C</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,27 <sup>B</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>
C1 15	8,71 <sup>B</sup> ± 0,11 <sup>a</sup>	7,31 <sup>C,D</sup> ± 0,05 <sup>b</sup>	6,19 <sup>C,D,E</sup> ± 0,01 <sup>c</sup>	6,19 <sup>B,C</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>
C1 30	8,48 <sup>B</sup> ± 0,12 <sup>a</sup>	7,29 <sup>C,D</sup> ± 0,01 <sup>b</sup>	6,13 <sup>D,E</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,03 <sup>C</sup> ± 0,01 <sup>c</sup>
C2 1	9,51 <sup>A</sup> ± 0,09 <sup>a</sup>	7,57 <sup>B</sup> ± 0,07 <sup>b</sup>	6,29 <sup>B,C,D</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,18 <sup>B,C</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>
C2 15	9,20 <sup>B</sup> ± 0,15 <sup>a</sup>	7,53 <sup>B,C,D</sup> ± 0,06 <sup>b</sup>	6,25 <sup>B,C,D,E</sup> ± 0,04 <sup>c</sup>	6,09 <sup>B,C</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>
C2 30	8,83 <sup>B</sup> ± 0,03 <sup>a</sup>	7,35 <sup>C</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,23 <sup>E</sup> ± 0,02 <sup>c</sup>	6,10 <sup>B,C</sup> ± 0,06 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3				
LA 1	9,39 <sup>A</sup> ± 0,04 <sup>a</sup>	7,68 <sup>A</sup> ± 0,02 <sup>b</sup>	6,73 <sup>A</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>	6,45 <sup>A</sup> ± 0,04 <sup>d</sup>
LA 15	8,92 <sup>B</sup> ± 0,02 <sup>a</sup>	7,57 <sup>A,B</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,61 <sup>A,B</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>	6,31 <sup>B,C</sup> ± 0,04 <sup>d</sup>
LA 30	8,54 <sup>D</sup> ± 0,08 <sup>a</sup>	7,09 <sup>D</sup> ± 0,06 <sup>b</sup>	6,17 <sup>D,E</sup> ± 0,00 <sup>c</sup>	5,97 <sup>E</sup> ± 0,06 <sup>d</sup>
C1 1	9,41 <sup>A</sup> ± 0,06 <sup>a</sup>	7,55 <sup>A,B</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,51 <sup>A,B,C</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,39 <sup>A,B</sup> ± 0,03 <sup>d</sup>

C1 15	8,80 <sup>B,C</sup> ± 0,11 <sup>a</sup>	7,49 <sup>A,B</sup> ± 0,05 <sup>b</sup>	6,36 <sup>B,C,D,E</sup> ± 0,01 <sup>c</sup>	6,29 <sup>B,C</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>
C1 30	8,55 <sup>C,D</sup> ± 0,12 <sup>a</sup>	7,18 <sup>C,D</sup> ± 0,01 <sup>b</sup>	6,20 <sup>D,E</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,14 <sup>D</sup> ± 0,01 <sup>c</sup>
C2 1	9,42 <sup>A</sup> ± 0,09 <sup>a</sup>	7,56 <sup>A,B</sup> ± 0,07 <sup>b</sup>	6,45 <sup>A,B,C,D</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>	6,45 <sup>A</sup> ± 0,03 <sup>c</sup>
C2 15	8,90 <sup>B</sup> ± 0,15 <sup>a</sup>	7,39 <sup>B,C</sup> ± 0,06 <sup>b</sup>	6,31 <sup>C,D,E</sup> ± 0,04 <sup>c</sup>	6,33 <sup>A,B,C</sup> ± 0,05 <sup>c</sup>
C2 30	8,56 <sup>C,D</sup> ± 0,03 <sup>a</sup>	7,24 <sup>C,D</sup> ± 0,03 <sup>b</sup>	6,14 <sup>E</sup> ± 0,02 <sup>c</sup>	6,23 <sup>C,D</sup> ± 0,06 <sup>c</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si no nível de 5% de significância.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si no nível de 5% de significância.

C1: Sem óleo, C2: Sem gomas. 1, 15 e 30: dias de armazenamento a 4°C. Fase 1: pH: 1,4 – 1,9 + pepsina e lipase por 2 horas, incubadas a 37 ° C. Fase 2: pH: 4,3 – 5,2 + bile e pancreatina por 2 horas 37 ° C. Fase 3: pH: 6,7 – 7,5 + bile e pancreatina incubadas a 37 ° C.

Em relação à resistência nas condições gastrointestinais, houve redução significativa durante as diferentes fases da simulação para todas as amostras analisadas. Como exemplo, o molho cremoso de soja probiótico com LP BG112 em seu primeiro dia apresentou contagem de 9,72 log.UFC.g<sup>-1</sup> ocorrendo redução para 7,97 log.UFC.g<sup>-1</sup> na fase 1 da simulação (fase gástrica). Posteriormente nas fases 2 e 3 (fase intestinal) a contagem final foi de aproximadamente 6,76 log.UFC.g<sup>-1</sup>. Apesar desta redução de 3 log.UFC.g<sup>-1</sup> ao longo da simulação verifica-se que as contagens finais apresentaram-se, acima de 6 log.UFC.g<sup>-1</sup>. Comportamento similar foi apresentado pelo molho elaborado com *Lactobacillus acidophilus* LA3.

Pode-se inferir que as contagens de microrganismos foram altas ao longo do armazenamento e mediante as condições gastrointestinais devido a formulação do molho cremoso de soja ter como componentes óleo de soja, gomas, além dos próprios componentes fornecidos pelo extrato de soja que atuam como protetores dos microrganismos. Isso fica evidente ao observar as contagens da simulação dos molhos, que apresentam adição de óleo e de gomas na formulação. Suas contagens foram superiores aos molhos controles (C1 e C2) que apresentavam apenas gomas ou óleo na formulação, tendo contagens significativamente inferiores ao longo da simulação (Tabela 2).

Segundo Bove et al. (2013), a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* em condições gastrointestinais sofre influência direta da matriz carreadora. Segundo os autores, ao realizarem testes de simulação em condições gastrointestinais utilizando amostras de leite, MRS ou Beta-glucana contendo o microrganismo, observaram uma maior sobrevivência do microrganismo durante a passagem pelas condições gastrointestinais em comparação ao

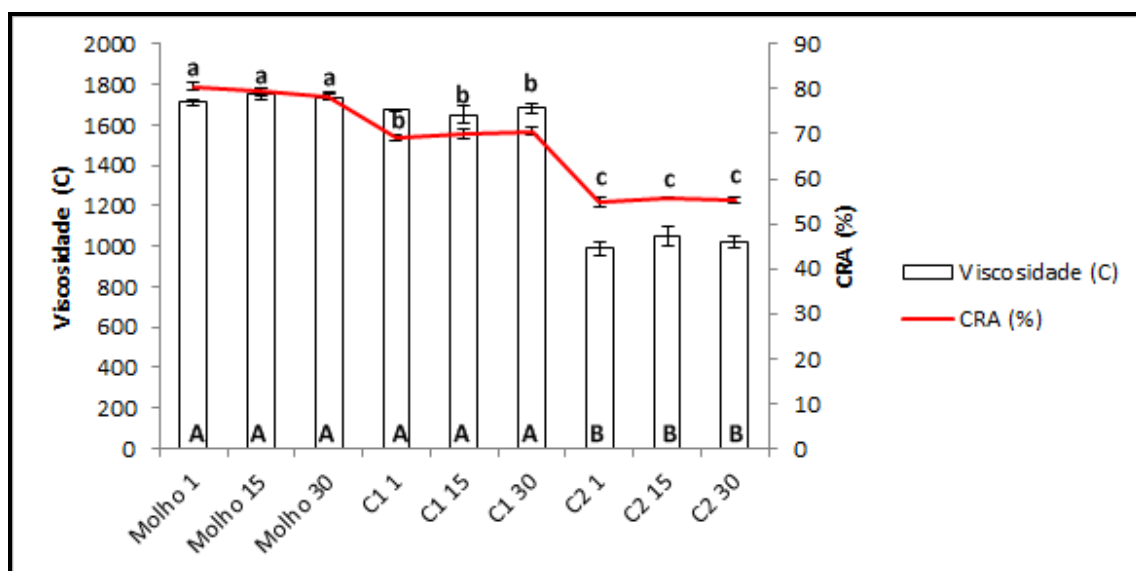
controle negativo que consistia apenas de solução salina, uma vez que matrizes mais complexas e ricas nutricionalmente auxiliam a sobrevivência.

Fareez et al. (2015) ao trabalharem com encapsulação de *Lactobacillus plantarum* com gomas, verificaram uma maior sobrevivência em capsulas contendo alginato, goma xantana e quitosana. Segundo Argin, Kofinas e Lo (2014) a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* em extrusão com goma xantana e quitosana aumentou a sobrevivência em condições gástricas. Em trabalho realizado por Valenzuela et al. (2008), o *Lactobacillus plantarum* 2.9 foi eficaz na inibição de bactérias causadoras de intoxicação alimentar como *Bacillus cereus* e enteropatógenos *E. coli* e *S. enterica* pela produção de compostos antimicrobianos, além de outros fatores como acidificação do meio, demonstrando a importância de se manter contagens altas no produto ao longo do armazenamento, além de favorecer os consumidores ao ingerirem microrganismos probióticos.

Buriti et al. (2010) ao estudarem a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em mousse simbiótico de goiaba reportam contagens iniciais aproximadas acima de  $7,5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  de amostra alcançando após 28 dias contagens próximas a  $5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ . Contagens estas inferiores às obtidas no molho cremoso de soja probiótico tanto no primeiro quanto no último dia de armazenamento. *Lactobacillus acidophilus* em mousse de goiaba quando submetidos a simulação in vitro, nas condições gastrointestinais, teve redução significativa de aproximadamente 3 ciclos log em relação às contagens iniciais ao longo da simulação, comportamento similar ao observado neste trabalho. Segundo Bedani et al. (2013) ao estudarem a influência da adição de inulina e okara em produto de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* La-5, reportaram que para todos os produtos elaborados contagens iniciais obtidas encontravam-se acima de  $8,5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  de amostra. Ainda segundo os autores, ao submeterem a cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 em meio MRS nas condições gastrointestinais verificaram a redução de  $5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ . Já os produtos elaborados apresentaram uma maior taxa de sobrevivência com uma faixa média entre  $5 - 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  ocorrendo a diminuição na sobrevivência ao longo dos 28 dias de armazenamento.

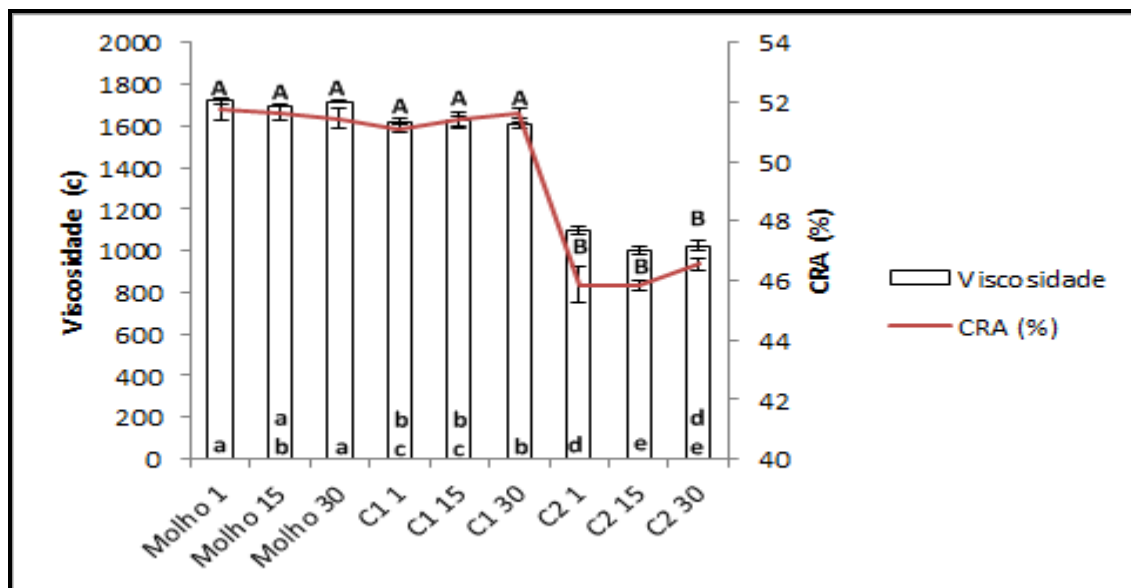
### 3.2 Cor, Viscosidade e CRA

Ao longo do armazenamento as amostras apresentaram estabilidade em relação a viscosidade e CRA, não havendo diferença significativa na mesma amostra durante os 30 dias de armazenamento (Figura 1 e 2). O molho cremoso de soja probiótico produzido com LP BG112 (Figura 1) apresentou os maiores valores de viscosidade e CRA, seguido de seus respectivos controles. As diferenças observadas são em decorrência de diferenças em suas respectivas formulações. O controle 2 que não possuía gomas na formulação apresentou os menores valores de viscosidade e CRA.



**Figura 1** – molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112: viscosidade (centipoise) e CRA (%) durante 30 dias de armazenamento a 5° C. Letras maiúsculas, minúsculas iguais não diferem entre si no nível de 5% de significância.

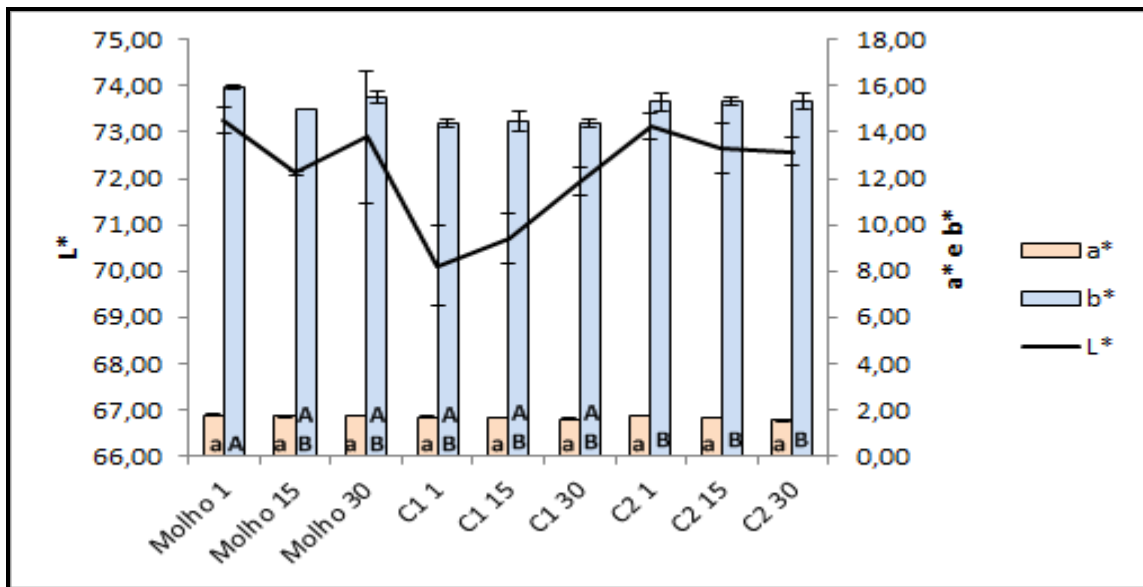
Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) polímeros solúveis auxiliam na viscosidade sendo este aumento proporcional à concentração. Além disso, proteínas auxiliam na CRA e que associadas aos hidrocolóides adicionados ao molho cremoso de soja probiótico favoreceram a estabilidade do produto ao longo do armazenamento. Os molhos produzidos com LA3 (Figura 2) apresentarem comportamento similar aos dados obtidos para o LP BG112, apresentando também estabilidade durante o armazenamento para viscosidade e CRA.



**Figura 2** – molho cremoso de soja com *Lactobacillus acidophilus* LA3: viscosidade (centipoise) e CRA (%) durante 30 dias de armazenamento a 5° C. Letras maiúsculas, minúsculas iguais não diferem entre si no nível de 5% de significância.

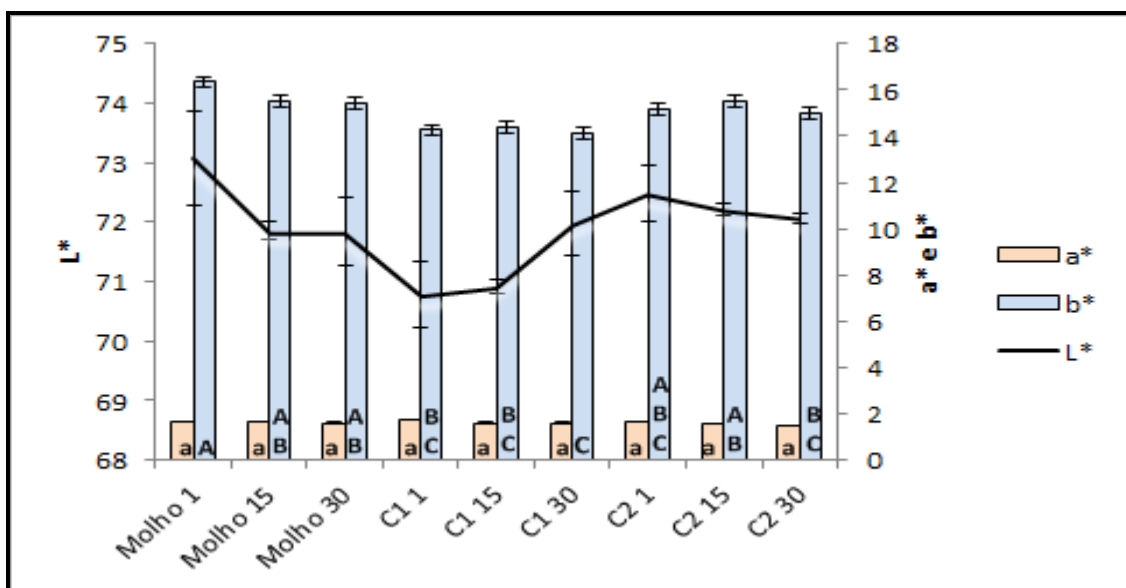
Al-Wahaibi et al. (2015) informam que a viscosidade é dependente de diferentes fatores tais como teor de água, temperatura e taxa de cisalhamento. O produto permaneceu sob refrigeração ao longo de 30 dias, não existindo variações em relação as condições de estocagem, o que pode ter favorecido a conservação de suas propriedades inalteradas. As amostras de molho cremoso de soja apresentaram uma CRA acima de 70% para o LP BG112 (Figura 1) e 50% para o LA3 (Figura 2). O controle 1 (molho elaborado com gomas e sem óleo em sua formulação) apresentou comportamento similar aos seus respectivos molhos com LP BG112 ou LA3. O Controle 2 que apresentava apenas óleo na formulação demonstrou a menor CRA e viscosidade dentre as amostras, entretanto com a mesma estabilidade apresentada pelas outras amostras. Silva et al. (2012) ao estudarem a adição de extrato de soja em pó nas características de iogurte de leite de cabra, verificaram que o aumento dos sólidos totais elevaram a viscosidade e diminuiram a sinérese. A junção de gomas e óleo na elaboração do produto, associados às características da matéria prima (fonte de proteínas, carboidratos, lipídeos) podem favorecer essas propriedades.

Na Figura 3 observa-se que durante o armazenamento não houve diferença significativa para a luminosidade ( $L^*$ ) entre as amostras contendo o LP BG112, apresentado valores acima de 70, concluindo assim que as amostras apresentam-se como amostras mais claras.



**Figura 3** – molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112:  $L^*$ (luminosidade),  $a^*$  (componente vermelho-verde) e  $b^*$  (componente amarelo-azul). Durante 30 dias a 5 °C. Letras maiúsculas e minúsculas iguais não diferem entre si no nível de 5% de significância.

Valores e comportamento semelhantes para os molhos contendo LA3 foram observados e encontram-se na Figura 4.



**Figura 4** – molho cremoso de soja com *Lactobacillus acidophilus* LA3: L\*(luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) Letras maiúsculas e minúsculas iguais não diferem entre si no nível de 5% de significância.

Não houve diferença significativa para o parâmetro a\* (vermelho-verde), com predominância da tonalidade vermelha para ambos os molhos (Figura 3 e 4). Pelo parâmetro b\* (amarelo-azul) as amostras apresentam predominância da tonalidade amarela. Somente a amostra de molho cremoso de soja contendo LP BG112 em seu primeiro dia de armazenamento diferiu das amostras do C2 (sem adição de gomas), apesar de significativa, os valores observados foram muito próximos, atribuindo essa diferença a variações que a própria análise confere, ressaltando-se que dificilmente diferenças poderiam ser percebidas por consumidores não treinados.

### 3.3 Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante.

A soja e farinha de okara são fontes de compostos fenólicos que atuam como antioxidantes, inibindo reações de oxidação. Na tabela 3 encontram-se os resultados para fenólicos totais e para os testes de atividade antioxidante DPPH•, ABTS+• e FRAP•.

Tabela 3. Fenólicos Totais e atividade antioxidante (DPPH•, ABTS+• e FRAP•) com 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 5° C para molho cremoso de soja com *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus acidophilus* LA3 (base seca).

Amostras	Fenólicos Totais mg EAG.100g <sup>-1</sup>	DPPH• µmol Trolox.g <sup>-1</sup>	ABTS+• µmol Trolox.g <sup>-1</sup>	FRAP• µmol Trolox.g <sup>-1</sup>
<b><i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112</b>				
Molho 1	154,54 ± 2,73 <sup>A</sup>	5,05 ± 0,45 <sup>A</sup>	9,54 ± 0,15 <sup>A</sup>	10,44 ± 0,19 <sup>C</sup>
Molho 15	155,54 ± 12,22 <sup>A</sup>	4,54 ± 0,28 <sup>A</sup>	9,64 ± 0,15 <sup>A</sup>	9,98 ± 0,04 <sup>C,D</sup>
Molho 30	141,16 ± 4,44 <sup>A,B</sup>	4,95 ± 0,17 <sup>A</sup>	9,68 ± 0,01 <sup>A</sup>	9,78 ± 0,01 <sup>D</sup>
C1 1	158,67 ± 2,50 <sup>A</sup>	5,30 ± 0,12 <sup>A</sup>	9,99 ± 0,06 <sup>A</sup>	12,16 ± 0,15 <sup>A</sup>
C1 15	158,67 ± 5,27 <sup>A</sup>	5,25 ± 0,20 <sup>A</sup>	10,04 ± 0,05 <sup>A</sup>	11,71 ± 0,01 <sup>A,B</sup>
C1 30	160,06 ± 3,33 <sup>A</sup>	5,49 ± 0,16 <sup>A</sup>	10,01 ± 0,15 <sup>A</sup>	11,37 ± 0,15 <sup>B</sup>
C2 1	138,10 ± 3,05 <sup>A,B</sup>	5,12 ± 0,10 <sup>A</sup>	9,63 ± 0,03 <sup>A</sup>	10,17 ± 0,15 <sup>C,D</sup>
C2 15	136,16 ± 2,22 <sup>A,B</sup>	5,02 ± 0,10 <sup>A</sup>	9,58 ± 0,18 <sup>A</sup>	9,89 ± 0,07 <sup>C,D</sup>
C2 30	125,04 ± 3,33 <sup>B</sup>	5,12 ± 0,05 <sup>A</sup>	9,53 ± 0,03 <sup>A</sup>	9,58 ± 0,19 <sup>D</sup>
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3</b>				
Molho 1	151,00 ± 0,35 <sup>A,B</sup>	5,22 ± 0,10 <sup>A</sup>	9,39 ± 0,01 <sup>A</sup>	10,24 ± 0,04 <sup>A</sup>
Molho 15	145,26 ± 0,72 <sup>C</sup>	4,80 ± 0,04 <sup>A,B</sup>	9,27 ± 0,06 <sup>A</sup>	10,06 ± 0,37 <sup>A</sup>
Molho 30	138,06 ± 0,50 <sup>F</sup>	4,40 ± 0,20 <sup>B</sup>	9,27 ± 0,23 <sup>A</sup>	10,01 ± 0,12 <sup>A</sup>

C1 1	153,56 ± 0,10 <sup>A</sup>	5,15 ± 0,29 <sup>A,B</sup>	9,50 ± 0,05 <sup>A</sup>	10,27 ± 0,04 <sup>A</sup>
C1 15	148,43 ± 0,06 <sup>B</sup>	4,92 ± 0,06 <sup>A,B</sup>	9,42 ± 0,10 <sup>A</sup>	9,96 ± 0,07 <sup>A</sup>
C1 30	141,39 ± 0,05 <sup>D,E</sup>	4,73 ± 0,05 <sup>A,B</sup>	9,34 ± 0,06 <sup>A</sup>	9,95 ± 0,08 <sup>A</sup>
C2 1	148,43 ± 0,07 <sup>B</sup>	4,97 ± 0,07 <sup>A,B</sup>	9,33 ± 0,00 <sup>A</sup>	10,18 ± 0,10 <sup>A</sup>
C2 15	142,94 ± 0,00 <sup>C,D</sup>	4,91 ± 0,00 <sup>A,B</sup>	9,32 ± 0,05 <sup>A</sup>	10,02 ± 0,24 <sup>A</sup>
C2 30	138,06 ± 0,16 <sup>E,F</sup>	4,84 ± 0,16 <sup>A,B</sup>	9,41 ± 0,07 <sup>A</sup>	10,11 ± 0,23 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si no nível de 5% de significância.

C1: Molho sem adição de óleo, C2: Molho sem adição de goma. 1, 15,e 30: dias de armazenamento.

Em relação aos fenólicos totais, para o LP BG112 não houve diferença significativa entre as amostras, apesar de apresentarem redução nos teores de compostos fenólicos ao longo do armazenamento provavelmente em virtude a presença de agentes oxidativos como oxigênio que resultaram na degradação destes compostos. Em média o molho cremoso de soja probiótico (LP BG112) apresentou aproximadamente 150 mg.100g<sup>-1</sup> de fenólicos totais em base seca e seus respectivos controles C1 e C2 os valores de 159 e 133 mg.100g<sup>-1</sup>.

Para o molho contendo LA3, ao longo do armazenamento houve diferença significativa entre as amostras, existindo uma redução nos teores de compostos. Os teores iniciais para fenólicos totais (LA3) encontram-se próximos a 150 mg EAG.g<sup>-1</sup> em base seca. Após 30 dias de armazenamento, todas as amostras apresentaram uma redução aproximadamente de 13, 12 e 10 mg EAG.g<sup>-1</sup> para molho cremoso de soja probiótico, C1 e C2 respectivamente.

Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante nos testes de DPPH, ABTS e FRAP. Ao longo do armazenamento houve redução na atividade antioxidante em todos os testes empregados, sendo significativo somente para o teste de DPPH, para os demais houve a redução, entretanto não foi significativa. Provavelmente essa diminuição nos valores observados ocorra pela diminuição nos teores de compostos fenólicos.

Em trabalho realizado por Bolanho e Beléia (2011) os autores encontraram para extrato de soja em pó comercial aproximadamente 219 mg.100g<sup>-1</sup> de fenólicos totais, valores superiores aos observados neste trabalho para os molhos produzidos. Essa diferença deve-se às formulações dos molhos, uma vez que a adição de ingredientes contribuiu para a diluição destes compostos nas amostras.

Em relação aos testes de atividade antioxidante de DPPH• e ABTS+•, não houve diferença significativa entre as amostras durante os 30 dias de armazenamento para o LP BG112, tendo para o DPPH• uma atividade de aproximadamente 5,09  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  e para o ABTS um valor aproximado de 9,74  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ . Para o teste FRAP•, as amostras do C1 apresentaram maior atividade quelante, com uma atividade inicial de 12,16  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ , ocorrendo uma redução significativa ao longo do armazenamento. Como o C1 não apresentava a adição de óleo na composição, proporcionalmente apresentava maior teor de extrato de soja o que pode ter contribuído com essa maior atividade no teste FRAP•(Tabela 3).

Bolanho e Beléia (2011) encontraram para extratos de soja em pó comercial valores de aproximadamente 3,9  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  para DPPH•, 8,2  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  para ABTS+• e 7,2  $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  para FRAP•, valores inferiores aos encontrados neste trabalho. Diferença que provavelmente está relacionada ao processo de fermentação que os extratos de soja utilizados neste trabalho sofreram antes de sua utilização para produção dos molhos. Park et al. (2015) ao estudarem molho de soja fermentado, observaram o aumento significativo ao longo dos dias de fermentação para os testes FRAP• e de DPPH•. Já Duenas et al. (2012) ao estudarem compostos bioativos da soja avaliando as modificações promovidas por diferentes fermentações, reportam que o processo de fermentação eleva os teores de compostos fenólicos, além de promover aumento nos teores de isoflavonas agliconas, que possuem maior capacidade antioxidante.

O produto elaborado foi originado a partir de extrato de soja contendo farinha de okara e fermentado por diferentes microrganismos, o que favoreceu a atividade antioxidante. Moraes Filho, Busanello, Garcia (2016) ao estudaram a fermentação de extrato de soja contendo farinha de okara por diferentes *Lactobacillus* observaram que o processo de fermentação com *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus acidophilus* elevou os teores de isoflavonas agliconas refletindo positivamente nas atividades antioxidantes *in vitro* pelos testes DPPH• e ABTS+•. Lee et al. (2013) ao estudarem soja mantida sob diferentes condições, relatam modificações nos teores de compostos fenólicos e atividade , reportando que a utilização de condições mais severas de

torrefação ocasionaram em um aumento nos níveis de isoflavonas agliconas elevando as atividades nos testes de DPPH•, ABTS+• e FRAP•.

### 3.4 Aceitação sensorial

Na Tabela 4, encontram-se as notas médias para cada parâmetro sensorial analisado em molho cremoso de soja probiótico com LP BG112. Os parâmetros cor e aparência obtiveram respectivamente médias de 7,24 e 7,25, sendo os parâmetros com a maior aceitação no produto.

Tabela 4. Aceitação sensorial de molho cremoso de soja probiótico com *Lactobacillus plantarum* BG112.

<b>Atributo</b>	<b>Média</b>
<b>Cor</b>	<b>7,24</b>
<b>Sabor</b>	<b>6,62</b>
<b>Textura</b>	<b>7,13</b>
<b>Aroma</b>	<b>6,85</b>
<b>Aparência</b>	<b>7,25</b>
<b>Aceitação global</b>	<b>6,97</b>

As médias para os molhos com LA3 encontram-se na Tabela 5. Para este microrganismo, somente os parâmetros sabor e aroma obtiveram respectivamente médias de 7,20 e 7,04, sendo os parâmetros com a maior aceitação no produto.

Tabela 5. Aceitação sensorial de molho cremoso de soja probiótico com *Lactobacillus acidophilus* LA3.

<b>Atributo</b>	<b>Média</b>
<b>Cor</b>	<b>6,94</b>
<b>Sabor</b>	<b>7,20</b>
<b>Textura</b>	<b>6,34</b>
<b>Aroma</b>	<b>7,04</b>

<b>Aparência</b>	<b>6,87</b>
<b>Aceitação global</b>	<b>6,94</b>

Segundo a Tabela 4, a menor nota alcançada para o molho com LP BG112 foi o parâmetro sabor com uma média final de 6,62. Ressalta-se que os parâmetros sabor e aroma obtiveram médias entre 6,5 que corresponde ao gostei ligeiramente na escala. Os demais parâmetros encontram-se próximos a nota 7 correspondendo ao gostei moderadamente. Para o LA3 (Tabela 5), a menor nota alcançada foi para o parâmetro textura com uma média final de 6,34. Os parâmetros cor, textura, aparência e aceitação global obtiveram notas médias superiores a 6,0 que correspondem ao gostei ligeiramente na escala. A aceitação global ficou próxima à nota 7,0, o que para um produto a base de soja pode ser considerado como uma boa aceitação.

Em trabalho realizado por Baú, Garcia e Ida (2014), os autores avaliaram um produto funcional de soja fermentado por kefir adicionado de fibras. Segundo os autores o produto apresentou notas variando entre 6,3 a 6,9 para os parâmetros cor, aroma, textura, sabor e aceitação global, sendo as notas para sabor e aroma similares ao molho cremoso de soja probiótico elaborado. Para os demais parâmetros, as notas foram superiores às observadas pelos autores. Bedani et al. (2014) em estudo com iogurtes de soja contendo farinha de okara obtiveram médias de aceitação variando de 4,4 a 5,8, valores bem inferiores comparados às notas de aceitação deste trabalho.

Wu et al.(2005), ao avaliarem a aceitação de iogurte de soja por estudantes. obtiveram que a aceitação do iogurte de soja foi de 4,6. Granato, Masson, Freitas (2010) ao estudarem uma sobremesa a base de soja obtiveram uma aceitação de aproximadamente 5,5 e os parâmetros de cor e sabor médios estavam na região 5,0 da escala. Comparando a aceitação dos produtos desenvolvidos pelos outros autores com os molhos elaborados neste trabalho, observa-se que apesar de serem produtos com o uso de soja, os molhos cremosos de soja probióticos apresentaram aceitação superior aos demais produtos, demonstrando um potencial consumo na alimentação humana.

#### 4. Conclusão

Os molhos cremosos de soja fermentados com probióticos (LP BG112 ou LA3) após os 30 dias de armazenamento sob refrigeração apresentaram contagens superiores a  $8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  para *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus acidophilus* LA3. Após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, ambos os molhos apresentaram sobrevivência dos microrganismos, com contagens finais superiores a  $6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ . Os molhos são fontes de compostos fenólicos, apresentando capacidade antioxidante nos testes de DPPH•, ABTS+• e FRAP•. Não ocorreram modificações em relação a viscosidade e CRA durante o armazenamento. A aceitação global para ambos os produtos encontra-se com médias próximas à nota 7,0, correspondendo pela escala utilizada ao gostei moderadamente, sendo considerada satisfatória para um produto de soja.

#### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Araucária (FA - Paraná), Brasil pela bolsa concedida ao aluno M.L.M.-F.

## Referências

- Adom, K. K., Liu, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
- Argin, S., Kofinas, P., Lo, Y. M. 2014. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan and chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 40, 138-144.
- Baú, T. R., Garcia, S., Ida, E. I. 2014. Evaluation of a Functional Soy Product with Addition of Soy Fiber and Fermented With Probiotic Kefir Culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 402 – 409.
- Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., Saad, S. M. I. 2014. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 436 - 443.
- Bedani, R., Rossi, E. A., Saad, S. M. I. 2013. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34, 382 - 389.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. 1996. The Ferric reducing ability of plasma (PLASMA) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70 - 76.
- BeMiller, J. N., Huber, K. C. 2010. Carboidratos. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editors. *Química de Alimentos*. 4th ed. RS, Brazil: Porto Alegre. pp. 75–129.
- Bolanho, B.C., Beléia, A. P. 2011. Bioactivity compounds and antioxidant potential of soy products. *Alimentos e Nutrição*, 22, 539-546.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., Fiocco, D. 2013. *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, 168, 351 – 359.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 28, 25-30.
- Buriti, F. C. A., Castro., I. A., Saad, S. M. I. 2010. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 121–129.

Caldeira, L. A., Ferrão, S. P. B., Fernandes, S. A. D., Magnavita, A.P.S., Santos, T. D. R. 2010. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência rural*, 40, 2193-2198.

Campos, D. C. P., Antoniassi, R., Deliza, R.; Freitas, S. C., Felberg, I. 2009. Molho cremoso à base de extrato de soja: estabilidade, propriedades reológicas, valor nutricional e aceitabilidade do consumidor. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 916 – 926.

Chan, Y. H., Lau, k-k., Yiu, K-H., Li, S-W., Chan, H-T., Tam, S., Shu, X-O., Lau, C-P., Tse, H-F. 2007. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 938 – 945.

Cho, C-W., Jeong, H-C., Hong, H-D., Kim, Y-C., Choi, S. Y., Kim, K., Ma, J. Y., Lee, Y. C. 2012. Bioconversion of Isoflavones during the Fermentation of Samsou-Eum with *Lactobacillus* Strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 1062-1067.

Ciabotti, S., Barcelos, M. F. P., Cirillo, M. A., Pinheiro, A. C. M. 2009. Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 346-353.

Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. 2010. *Química de alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 4.ed.

Dea, I. C. M. 1989. Industrial polysaccharides. *Pure and Applied Chemistry*, 61, 1315 – 1322.

Donkor, O. N., Shah, N. P. Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Food Microbiology and Safety*, v. 73, p. 15 - 20, 2008.

Duenas, M., Hernandez, T., Robredo, S. Lamparki, G., Estrella, I., Munoz, R. 2012. Bioactive Phenolic Compounds of Soybean (*Glycine max* cv. Merit): Modifications by Different Microbiological Fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62, 241 – 250.

FAO/WHO. 2006. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*.

Fareez, I. M., Lim, S. M., Mishra, R. K., Ramasamy, K. 2015. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus*

*plantarum* LAB12. International Journal of Biological Macromolecules, 72, 1419–1428.

Granato, D., Masson, M. L., Freitas, R. J. S. 2010. Stability studies and shelf life estimation of a soy-based dessert. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 30, 797-807.

Hung, P. V., Maeda, T., Miyatake, K., Morita, N. 2009. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. Food Research International, 42, 185-190.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed (1ª ed. digital). São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, p. 1020.

Kim, J-S., Lee, J-H., Kim, S., Surh, J., Jang, K-H. 2014. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3928 in fermentation of Korean soybean paste (Doenjang). Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 57, 237 – 243.

Lapasin, R., Prici, S. 1995. Industrial applications of polysaccharides. In: Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications, Springer US.

Liu, K. Soybeans: chemistry, technology and utilization. ITP, 1997.

Liu, K. Soybeans as functional foods and ingredients. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2004.

Moraes Filho, M. L., Busanello, M., Garcia, S. 2016. Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. LWT - Food Science and Technology, 74, 456 – 464.

Mukherjee, R., Chakraborty, R., Dutta, A. 2015. Role of Fermentation in Improving Nutritional Quality of Soybean Meal — A Review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.

Nejati, R.; Gheisari, H.; Hosseinzadeh, S.; Amin, H. 2011. Viability of encapsulated *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* (BB-12) in symbiotic UF cheese and it's survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 06, 197-204.

Roopashri, A. N., Varadaraj, M. C. 2014. Hydrolysis of flatulence causing oligosaccharides by  $\alpha$ -d-galactosidase of a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 5422 in selected legume flours and elaboration of probiotic attributes in soy-based fermented product. European Food Research and Technology, 239, 99 – 115.

Rosalam, S.; England, R. 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 197-207.

Rossi, E. A., Rosier, I., Damasso, A.R., Carlos, I.Z., Vendramini, R.C., Abdala, D.S.P., Talarico, V.H., Minto, D.F. 2004. Determinação de Isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de Soja. *Alimentos e Nutrição*, 15, 93-99.

Sanches-Gonzales, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). *Food Chemistry*, 90, 133-139.

Santos R.D., Gagliardi A.C.M., Xavier H.T., Magnoni C.D., Cassani R., Lottenberg A.M. et al. 2013. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arquivos Brasileiro de Cardiologista*. 100,1 – 40.

Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E. 2002. The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132, 3577–3584.

Silva, D. C. G., Abreu, L. R., Assumpção, G. M. P. 2012. Addition of water-soluble soy extract and probiotic culture, viscosity, water retention capacity and syneresis characteristics of goat milk yogurt. *Ciência Rural*, 42, 545 – 550.

Slavin, J. L., Greenberg, N. A. 2003. Partially hydrolyzed guar gum. *Clinical Nutrition uses*, 19, 549 – 552.

Tooping, D. L. 1993. Physiological Aspects of Food Hydrocolloids. In: *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions*.

Tordido, A. P., Falcão, M. C. 2006. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Revista Brasileira Nutricional Clínica*, 21, 117 – 124.

Valenzuela, A. S., Ruiz, G. D., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Cañamero, M. M., Ortega, E., Gálvez, A. 2008. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from bem saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*, 19, 842 -848.

Vinderola, C.G.; Reinheimer J. A. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9, 497-505.

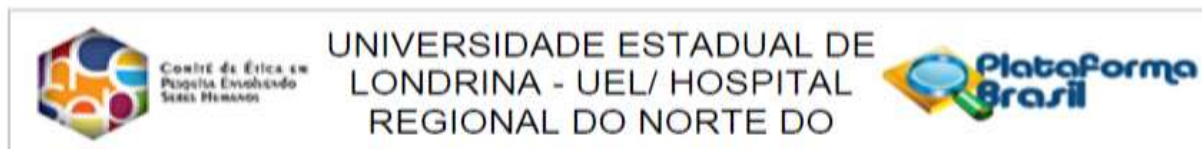
Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C. Fisk, I. 2013. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6, 205 -214.

Wu, Y-F., Molaison, E. F., Pope, J. F., Reagan, S. 2005. Attitudes and acceptability of soy-based yogurt by college students. *Nutrition & Food Science*, 35, 253 – 257.

## **Conclusão Geral**

Estabelecer as condições de fermentação na matriz formada por extrato de soja e farinha de okara foi importante para o que os microrganismos empregados no processo alcançassem contagens elevadas, produzindo assim uma matriz com alta contagem de probióticos, elevado teor de isoflavonas agliconas e atividade antioxidante. Sua aplicação na elaboração de molho cremoso de soja probiótico foi viável, apresentando boa estabilidade durante o armazenamento, característica importante, pois promove a uniformidade de suas características ao longo do armazenamento. Ao longo de seu armazenamento, sua estabilidade foi comprovada mediante testes de sobrevivência em condições gastrointestinais e outros compostos com atividades biológicas, favorecendo a alegação de que seu consumo pode proporcionar efeitos benéficos para a saúde dos consumidores.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Probióticos em sistema extrato de soja-farinha de okara.

**Pesquisador:** Sandra Garcia

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33699014.4.0000.5231

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 754.881

**Data da Relatoria:** 15/08/2014

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para os provadores do produto probiótico a partir de extrato de soja no teste de aceitação.**

**“ELABORAÇÃO DE MOLHO CREMOSO PROBIÓTICO DE SOJA”**

Prezado(a) Senhor(a):

GOSTARÍAMOS DE CONVIDÁ-LO A PARTICIPAR DA PESQUISA **“ELABORAÇÃO DE MOLHO CREMOSO PROBIÓTICO DE SOJA”**, REALIZADA NO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS/UDEL, LONDRINA/PR. O OBJETIVO DA PESQUISA É DESENVOLVER MOLHO DE SOJA PROBIÓTICO. A SUA PARTICIPAÇÃO É MUITO IMPORTANTE, E IRÁ REQUERER CERCA DE 15 MINUTOS. VOCÊ PARTICIPARÁ COMO PROVADOR E IRÁ CONSUMIR PRODUTOS FERMENTADOS DE SOJA FORMULADOS E SERÁ SOLICITADO A DAR SUA OPINIÃO SOBRE A SUA PREFERÊNCIA, DENTRE OS PRODUTOS APRESENTADOS. SERÁ REALIZADA UMA SESSÃO E VOCÊ PODERÁ FAZÊ-LA NO HORÁRIO QUE TIVER MAIOR DISPONIBILIDADE. GOSTARÍAMOS DE ESCLARECER QUE SUA PARTICIPAÇÃO É TOTALMENTE VOLUNTÁRIA, PODENDO VOCÊ: RECUSAR-SE A PARTICIPAR, OU MESMO DESISTIR A QUALQUER MOMENTO SEM QUE ISTO ACARRETE QUALQUER ÔNUS OU PREJUÍZO À SUA PESSOA. INFORMAMOS AINDA QUE AS INFORMAÇÕES SERÃO UTILIZADAS SOMENTE PARA OS FINS DESTA PESQUISA E SERÃO TRATADAS COM O MAIS ABSOLUTO SIGILO E CONFIDENCIALIDADE, DE MODO A PRESERVAR A SUA IDENTIDADE. O PRODUTO APRESENTADO POSSUI EFEITOS BENÉFICOS COMO A DIMINUIÇÃO NO TEMPO DE TRÂNSITO INTESTINAL E AUXÍLIO NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS E A SUA INGESTÃO NÃO TRAZ RISCOS À SAÚDE, ENTRETANTO, RARAMENTE PODEM OCORRER DESCONFORTOS ABDOMINAIS COMO DORES, FLATULÊNCIA OU TRÂNSITO INTESTINAL AUMENTADO, QUE DEVERÃO CESSAR ALGUMAS HORAS APÓS O DO CONSUMO DO PRODUTO. INFORMAMOS QUE O SENHOR NÃO PAGARÁ NEM SERÁ REMUNERADO POR SUA PARTICIPAÇÃO. GARANTIMOS, NO ENTANTO, QUE TODAS AS DESPESAS DECORRENTES DA PESQUISA SERÃO RESSARCIDAS, QUANDO DEVIDAS E DECORRENTES ESPECIFICAMENTE DE SUA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA. CASO VOCÊ TENHA DÚVIDAS OU NECESSITE DE MAIORES ESCLARECIMENTOS PODE NOS CONTACTAR (PROF<sup>a</sup> SANDRA GARCIA , DCTA/UDEL,

SGARCIA@UEL.BR, (43) 3371.5966), OU PROCURAR O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, NA AVENIDA ROBERT KOCK, Nº 60, OU NO TELEFONE 3371 – 2490. ESTE TERMO DEVERÁ SER PREENCHIDO EM DUAS VIAS DE IGUAL TEOR, SENDO UMA DELAS, DEVIDAMENTE PREENCHIDA E ASSINADA ENTREGUE A VOCÊ.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

**Pesquisador Responsável**

Sandra Garcia

Marsilvio Lima de Moraes Filho

Aluno de Doutorado

Eu, \_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura : \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

**ANEXO 3 – Ficha para avaliação sensorial****TESTE DE ESCALA HEDÔNICA**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra de molho cremoso de soja probiótico produzido a partir de extrato de soja fermentado. Por favor, avalie as amostras com relação aos atributos cor, sabor, cremosidade, aroma, aparência e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- ( 9 ) gostei extremamente
- ( 8 ) gostei muito
- ( 7 ) gostei moderadamente
- ( 6 ) gostei ligeiramente
- ( 5 ) não gostei, nem desgostei
- ( 4 ) desgostei ligeiramente
- ( 3 ) desgostei moderadamente
- ( 2 ) desgostei muito
- ( 1 ) desgostei extremamente

AMOSTRA	COR	SABOR	TEXTURA	AROMA	APARÊNCIA	ACEITAÇÃO GLOBAL