UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja:
resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse
gastrointestinal *in vitro* e atividade antimicrobiana.

Anna Carolina Meireles Piazzentin

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja:
resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse
gastrointestinal *in vitro* e atividade antimicrobiana.

Anna Carolina Meireles Piazzentin

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P584e	<p>Piazzentin, Anna Carolina Meireles</p> <p>Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja: resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> e atividade antimicrobiana / Anna Carolina Meireles Piazzentin. -- São Paulo, 2016.</p> <p>70p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica</p> <p>Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza</p> <p>1. Tecnologia da fermentação 2. Soja 3. Bactérias lácticas 4. Probióticos I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador.</p> <p>660.28449 CDD</p>
-------	---

Anna Carolina Meireles Piazzentin

Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja:
resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse
gastrointestinal *in vitro* e atividade antimicrobiana.

Comissão Julgadora

Da

Dissertação para obtenção do título de mestre

Profº Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, de de 2016.

*Deus me conceda a serenidade para aceitar o que não posso
mudar, a tenacidade para mudar o que posso e a boa sorte
para não bagunçar tudo com muita frequência. ”*

(Stephen King - A Torre Negra)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha família (mãe, pai, Paula, Pedro e tia Ny) por todo o apoio, carinho e conselhos durante esse período que não foi fácil. E também ao meu namorado Eduardo que chegou na metade dessa jornada, mas que sempre me apoiou e aconselhou.

Gostaria de agradecer o professor Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira por me abrir as portas para o mestrado, pela orientação, ajuda, conselhos, paciência e puxões de orelha. Muito obrigado professor.

As senhoras Thamires Maria Simões da Silva e Marcela Albuquerque de Alcanti Albuquerque pela amizade, carinho e ajuda nas horas difíceis. Muito obrigado sem a ajuda das senhoras muitas coisas desse trabalho não aconteceriam.

Aos meus colegas de laboratório em especial Pamela Oliveira de Souza de Azevedo pela amizade e ajuda, muito obrigado Pam.

A colaboração da Dra. Ana Carolina Florence que mesmo de longe sempre me auxiliou muito.

As professoras Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan e Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract, pelos conselhos e auxílios em algumas análises. A equipe técnica do bloco 16 Ivani, Nilton e principalmente ao Alexandre por me ajudarem nas análises.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por oferecer a oportunidade da realização do projeto e a Capes pelo auxílio financeiro com a bolsa.

Aos que não foram citados mas de alguma forma ajudaram na realização desse projeto.

PIAZENTIN, A. C. M. **Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja: resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse gastrointestinal *in vitro* e atividade antimicrobiana.** 2016. 67 f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

RESUMO

Alimentos funcionais são alimentos que contêm uma ou mais substâncias capazes de atuar no metabolismo ou na fisiologia do ser humano, promovendo benefícios à saúde. A soja é uma excelente matéria-prima para o desenvolvimento de alimentos funcionais, pois proporciona benefícios ao hospedeiro que apresenta intolerância ou alergia associada ao consumo de produtos lácteos. As bactérias lácticas probióticas vêm sendo aplicadas na fermentação de alimentos devido aos benefícios que as mesmas propiciam a saúde, como na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal e como adjuvantes na absorção de determinados nutrientes. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um fermentado a base de soja utilizando bactérias probióticas. A fermentação da bebida a base soja foi realizada pelos micro-organismos *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb) e *Lactobacillus paracasei* (Lp) Lpc-37 realizada a 37°C em diferentes condições de resfriamento aplicadas nas amostras ao fim da fermentação e durante os 28 dias de armazenamento refrigerado (4°C). Os resultados demonstraram que em média o tempo de fermentação foi menor na presença de St, Lb e Lp quando comparada a fermentação realizada apenas por Lp. A exposição das amostras a uma temperatura intermediária de resfriamento (25°C) durante 8 horas aumentou cerca de 2,1% a viabilidade das co-culturas ternárias, apresentando pós acidificação em média de 0,2 unidades de pH a partir do pH final da fermentação (4,5) até o primeiro dia de análise. O resfriamento intermediário promoveu uma modificação no perfil de ácidos graxos, demonstrando aumento de 14,5% do ácido linoleico após 28 dias de armazenamento a 4°C assim, como também, promoveu aumento de 14,6% na produção de ácido láctico. Outro resultado relevante e bastante expressivo foi o consumo de sacarose (94,9%). Desta forma, o resfriamento intermediário demonstrou ser um procedimento capaz de aumentar a viabilidade das bactérias em modelo *in vitro* de estresse gastrointestinal. De acordo com esses resultados, é possível concluir que o uso do resfriamento intermediário promove maiores benefícios em relação ao perfil microbiológico e de ácidos graxos.

Palavras-chave: probióticos, fermentação, extrato hidrossolúvel de soja, resfriamento.

PIAZENTIN, A. C. M. **Effect of probiotic culture in fermented soymilk: resistance to cold storage, stress gastrointestinal *in vitro* and antimicrobial activity.** 2016. 67 f. Master's Dissertation – Pharmaceutical Sciences Faculty, São Paulo University, São Paulo, Brasil, 2016.

ABSTRACT

Functional foods are foods that contain one or more substances capable of acting on the metabolism or physiology of the human being, promoting health benefits. Soy is an excellent raw material for the development of functional foods, providing benefits to the intolerant and allergic people to the dairy products consumption. The use of probiotic lactic acid bacteria in food fermentation has become quite common due to the beneficial effects provided by these bacteria to the individuals' health, maintaining the balance of intestinal microflora, in the gastrointestinal metabolic disorders and as an adjunct in the absorption of certain nutrients. In this context, this study aimed to develop a fermented soy base using probiotic bacteria. Fermentation of soy beverage was made by the microorganisms *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) and *Lactobacillus paracasei* (Lp) Lpc-37 at 37°C and evaluated at the end of the fermentation process and during 28 days of storage at 4°C. The results showed that the fermentation time was less on average in the presence of St, Lb and Lp when compared to the fermentation performed only by Lp. The exposure of samples to a cooling intermediate temperature (25°C) for 8 hours increased about 2.1% the viability of ternary co-cultures, with post acidification on average of 0.2 pH units from the final pH of the fermentation (4.5) to the first day of analysis. The intermediate cooling promoted a change in fatty acid profile, showing a 14.5% increase of linoleic acid after 28 days of storage at 4°C as well as also promoted an increase of 14.6% of lactic acid. Another important and very significant result was the sucrose consumption (94.9%). In this way, the intermediate cooling procedure demonstrated to be able of increase bacteria viability in the *in vitro* model of gastrointestinal stress. According to these results, it is possible to conclude that the use of the intermediate cooling promotes greater benefits in relation to the microbiological profile and fatty acids.

Keywords: probiotics, fermentation, soymilk powder, cooling.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
CAPÍTULO I – Revisão da literatura.....	13
1) Alimentos funcionais	13
2) Soja (<i>Glycine max</i>)	14
2.1) Extrato hidrossolúvel de soja	15
2.2) Compostos bioativos da soja	17
2.3) A soja como alimento funcional	17
3) Fermentação	18
3.1) <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	19
3.2) Resfriamento	19
4) Probióticos.....	20
4. 1) <i>Lactobacillus spp.</i>	23
4.1.1) <i>Lactobacillus paracasei</i>	23
4.2) Probióticos como alimento funcional.....	24
CAPÍTULO II- Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja: resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> e atividade antimicrobiana.....	26
2) Objetivos	27
2.1) Objetivos específicos	27
3) Material e Métodos	28
3.1) Micro-organismos	28
3.2) Preparação do inóculo	28
3.3) Preparo da base de soja a ser fermentada	28
3.4) Processo fermentativo	29
3.5) Pós-Acidificação	29
3.6) Contagem microbiológica	31
3.7) Quantificação de atividade antimicrobiana.....	31
3.8) Determinação dos ácidos graxos.....	32
3.9) Análise dos ácidos e açúcares.....	32
3.10) Implementação de estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> em modo estático	33
4) Análise Estatística	34

5) Resultados e discussão	34
5.1) Cinética de acidificação	34
5.2) Pós-Acidificação	36
5.3) Contagem microbiológica	39
5.4) Quantificação de atividade antimicrobiana	44
5.5) Perfil dos ácidos graxos	44
5.6) Ácidos orgânicos e açúcares	47
5.7) Implementação de estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> em modo estático .	51
6) Conclusões	56
Perspectivas	58
Referências	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de fermentação do extrato de soja.....30

Figura 2. Curva de acidificação dos micro-organismos *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. paracasei* (Lp) em base de soja a 37°C até o pH 4,5.....35

Figura 3. Evolução do pH em meio contendo extrato de soja fermentado por monocultura de *L. paracasei* (a), cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (b) e cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (c) após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único (4°C) e a coluna (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....38

Figura 4. Contagem microbiológica de *L. paracasei* (Lp) em fermentado de extrato de soja após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....40

Figura 5. Contagem microbiológica de *S. thermophilus* (a) e *L. bulgaricus* (b) em fermentado de extrato de soja em 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)...41

Figura 6. Contagem microbiológica de *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. paracasei* (c) em fermentado de extrato de soja em 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....43

Figura 7. Sobrevivência de *L. paracasei* em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico *in vitro* (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....52

Figura 8. Sobrevivência do *S. thermophilus* (a) e *L. bulgaricus* (b) em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico *in vitro* (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■)

refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. O período em que há ausência de colunas significa que as contagens foram inferiores à 100 UFC/mL. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....54

Figura 9. Sobrevivência do *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. paracasei* (c) em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico in vitro (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. O período em que há ausência de colunas significa que as contagens foram inferiores à 100 UFC/mL. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da monocultura de <i>L. paracasei</i> (Lp), co-cultura binária de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (StLb) e co-cultura terciária de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. paracasei</i> (StLbLp) em extrato de soja fermentado a 37°C até atingir o pH 4,5.....	36
Tabela 2. Contagem microbiológica de <i>L. paracasei</i> (Lp), <i>S. thermophilus</i> (St) e <i>L. bulgaricus</i> (Lb) em extrato de soja fermentado em 0h (d ₀) e 24h (d ₁), de armazenamento a 4°C.....	39
Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (g 100 g ⁻¹ do total ácidos graxos) em extrato de soja fermentado por monocultura de <i>L. paracasei</i> (Lp), cultura binária de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (StLb) e cultura terciária de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. paracasei</i> (StLbLp) em 1 dia (d ₁), 14 dias (d ₁₄) e 28 dias (d ₂₈) de armazenamento a 4°C.....	46
Tabela 4. Quantificação de ácidos orgânicos (g/L) em extrato de soja fermentado por monocultura de <i>L. paracasei</i> (Lp), cultura binária de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (StLb) e cultura terciária de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. paracasei</i> (StLbLp) após 1 dia (d ₁), 14 dias (d ₁₄) e 28 dias (d ₂₈) de armazenamento a 4°C.....	49
Tabela 5. Quantificação da sacarose, glicose e frutose (g/L) em extrato de soja fermentado por monocultura de <i>L. paracasei</i> (Lp), cultura binária de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (StLb) e cultura terciária de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. paracasei</i> (StLbLp) após 1 dia (d ₁), 14 dias (d ₁₄) e 28 dias (d ₂₈) de armazenamento a 4°C.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

AOCS: American Oil Chemistry Society

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL: bactérias ácido lácticas

CG: cromatografia gasosa

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

g: grama

h: hora

ISO: International Organization of Standardization

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lp: *Lactobacillus paracasei*

M17: base para cultivo de estreptococos lácticos

mg: miligrama

min.: minuto

mL: mililitro

MRS: De Main-Rogosa e Sharpe

rpm: rotação por minuto

RNA: ácido ribonucleico

St: *Streptococcus thermophilus*

U: unidade internacional

UFC: unidade formadora de colônia

CAPÍTULO I – Revisão da literatura

1) Alimentos funcionais

O termo “alimento funcional” começou a ser empregado no Japão depois da criação da categoria FOSHU (*Food for Specified Health Use*) ou em tradução livre “alimentos específicos para uso em saúde”. O ministério da Saúde e bem-estar japonês criou essa categoria de alimentos depois de observar que devido há mudanças alimentares da população, a chamada “ocidentalização” promoveu o aumento da prevalência de algumas patologias como hipertensão, aumento do colesterol LDL sérico, além do aparecimento da osteoporose precoce. Sendo assim, alguns desses alimentos funcionais inclusos na categoria alimentar FOSHU, seriam coadjuvantes na prevenção de doenças causadas pelo detrimento da qualidade de vida da população japonesa, proporcionando desta forma, uma melhoria do bem-estar físico e mental (Granato et al., 2010; Mitsuoka, 2014).

Os alimentos dito funcionais contêm substâncias capazes de modular as respostas metabólicas do indivíduo, resultando em maior proteção e estímulo à saúde. Promovem o bem-estar dos indivíduos, prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas e permitindo o aumento da longevidade com qualidade de vida (Thamer & Penna, 2006; Penha et al., 2007; Granato et al., 2010; Mitsuoka, 2014).

A regulamentação desses alimentos é realizada de maneiras diferentes em cada país, no Brasil o Ministério da Saúde juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinara através das resoluções 16, 17, 18 e 19 de 30 de abril de 1999 as normas para registro, comprovação de eficácia e rotulagem de produtos com alegação de propriedades funcionais ou de saúde, assim estabelecendo a obrigatoriedade de registro desses produtos e a necessidade de demonstração de eficácia e segurança com base em pesquisas científicas (Brasil, 1999a, 1999b, 1999c e 1999d).

O alimento ou ingrediente funcional além de suprir funções metabólicas básicas, quando se tratar de nutriente, deve também produzir comprovados

efeitos metabólicos, fisiológicos ou benéficos à saúde, devendo ser seguros para o consumo sem supervisão médica (de Angelis, 2001; Moraes & Colla, 2006). No entanto, são proibidas alegações que falem em prevenção de doenças, pois as doenças crônico-degenerativas são multifatoriais e o controle de apenas um componente como a dieta não é realmente suficiente para a prevenção (Brasil, 1999 d; Penha et al., 2007). No Brasil, a ANVISA atualizou em janeiro de 2009, a lista de produtos com alegação de benefícios à saúde. São substâncias com propriedades funcionais de saúde, novos alimentos ou ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.

2) Soja (*Glycine max*)

A soja (*Glicine max*) é uma leguminosa que surgiu na China e por muito tempo seu cultivo permaneceu no oriente, chegando ao ocidente no final do século XV. No Brasil, o primeiro relato de seu cultivo foi em 1882 na Bahia, sendo introduzida no Rio Grande do Sul em 1914, onde diversas variedades trazidas dos Estados Unidos da América se adaptaram melhor, devido às condições climáticas. Atualmente a soja é cultivada em todas as regiões do Brasil, considerado hoje o segundo maior produtor mundial com uma produção de 96,3 milhões de toneladas em 2014/15, sendo a soja responsável pelo total de 51,2% de todos os grãos produzidos no país e o Estado do Mato Grosso responsável por 23,3% da produção (Freitas, 2011; CONAB, 2016).

Segundo o levantamento da safra brasileira de grãos 2015/16, divulgado em setembro pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) a produção estimada é de 95,4 milhões de toneladas em 33,2 milhões de hectares cultivados e exportação de 56,60 milhões de toneladas. A produção sofreu queda de 0,8% quando comparada ao exercício anterior devido às fortes chuvas que atingiram a região sul do país (CONAB, 2016).

Sendo a mais rica das leguminosas, em termos nutricionais de grande destaque na alimentação humana e animal, constitui importante fonte de proteínas de baixo custo (Saad et al., 2011; Sartori et al., 2014). Dentre os vários componentes da soja, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos, isoflavonas, saponinas e amido estão relacionados

com o sabor (Masuda, 1991, 2004). Entre os açúcares, a sacarose corresponde a praticamente 60% do total de açúcares solúveis encontrados na soja, enquanto os oligossacarídeos rafinose e estaquiose representam cerca de 3 a 8%, respectivamente (Pereira et al., 2009). No entanto a rafinose e estaquiose são os responsáveis pela flatulência causada pelo consumo de leguminosas (Hymowitz et al., 1972; Csáki & Fekete, 2004; Oliveira et al., 2010).

A proteína de soja é muito parecida à proteína de origem animal, e pode ser considerada, dentre as proteínas vegetais, como a de melhor qualidade, possuindo cerca de 90% de digestibilidade (Zangemi et al., 1982; Morais & Silva, 1996).

2.1) Extrato hidrossolúvel de soja

O extrato hidrossolúvel de soja, popularmente denominado de leite de soja destaca-se como produto de origem vegetal que possui o potencial para o desenvolvimento de novas bebidas, devido as suas características químicas e nutricionais, que o qualificam como um alimento funcional. Além da qualidade de sua proteína, a soja e seus derivados podem ser utilizados de forma preventiva no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose (manutenção da saúde dos ossos), sintomas da menopausa, melhora dos perfis lipídicos, proteção contra danos oxidativos para o DNA e redução de alergias (Hasler, 1998; Tang et al., 2007; Donkor et al., 2007a; Larkin et al., 2009; Mazzara et al., 2012; Mazzara et al., 2013; Chang & Tsai, 2016). O extrato de soja também pode ser utilizado para criação de fórmulas como substituto nos casos de alergia das proteínas do leite e de intolerância à lactose (Yonamine et al., 2011).

A aceitabilidade do extrato hidrossolúvel de soja pelo consumidor é limitada por apresentar características sensoriais semelhantes às do feijão cru, o que ocorre devido aos compostos voláteis de baixa massa molar, que são produtos da ação das lipoxigenases (Pereira et al., 2009). Os principais substratos para essas enzimas são os ácidos graxos, linoleico e linolênico, no

entanto as lipoxigenases podem ser inativadas através de tratamento térmico adequado (Beasley et al., 2003; Haully et al., 2005; Rosa et al., 2009).

Segundo Peñalvo et al. (2004) os ácidos graxos presentes na soja estão distribuídos em 15% na forma saturada e 80% de forma insaturada. Sendo o ácido linoleico (C 18:2 n-6) a forma mais abundante correspondendo à metade do total de ácido graxos presentes. Além disso, está presente no extrato de soja o ácido graxo (C 18:3 n-3). Esses ácidos supracitados são popularmente conhecidos como ômega-6 e ômega-3 respectivamente, e se destacam por apresentarem efeitos benéficos a saúde humana, como auxiliares na resposta imune e inflamatória, precursores dos ácidos docosahexaenóico e docosapentaenóico que se mostram de grande importância para o desenvolvimento e funcionamento do cérebro e retina (Martini et al., 2006; Perini et al., 2010).

O extrato de soja apresenta um alto teor de oligossacarídeos, os mesmos exercem função muito importante no organismo, pois estimulam e promovem o crescimento de micro-organismos probióticos como as bifidobactérias, sendo assim considerados prebióticos por alguns autores (Hou et al., 2000; Wang et al., 2003; Pereira et al., 2009; Larkin et al., 2009; Saad et al., 2011). Os prebióticos auxiliam na inibição da multiplicação de micro-organismos patogênicos ao estimularem o crescimento seletivo das bactérias endógenas, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses ingredientes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora possam ter também algum impacto sobre os micro-organismos do intestino delgado (Saad, 2006; Larkin et al., 2009).

A fermentação tem sido uma técnica muito empregada para desenvolver produtos derivados de soja. Neste sentido, o extrato hidrossolúvel de soja é empregado como meio de crescimento e de atividade bioquímica de várias bactérias lácticas na produção de queijo de soja e diversos tipos de bebidas fermentadas (Chou & Hou, 2000; Fuchs et al., 2005; Haully et al., 2005; Donkor et al., 2007b; Pereira et al., 2009; Mazzara et al., 2012; Mazzara et al., 2013; Bedani et al., 2013; Chang & Tsai, 2016; Kuda, et al., 2016). Da mesma forma, do ponto de vista tecnológico, a qualidade sensorial do extrato hidrossolúvel de soja pode ser melhorada através da fermentação dos carboidratos presentes

através da ação de bactérias láticas. Esse processo fermentativo produzirá o ácido láctico, que confere um sabor refrescante à bebida mascarando o sabor classificado como de “feijão cru”, característico do extrato além de proporcionar um aumento dos benefícios já contidos na soja (Moraes & Silva, 2000; Brasley et al, 2003; Pereira et al., 2009; Larkin et al, 2009).

2.2) Compostos bioativos da soja

A soja é mundialmente conhecida pelo auxílio e prevenção de muitas doenças como, osteoporose, sintomas da menopausa, hiperlipidemia, entre outras. Porém, o que é desconhecido para muitos é que algumas das moléculas presentes na soja, que auxiliam na prevenção dessas doenças, são muitas vezes compostos bioativos ou peptídeos bioativos presentes na mesma. Entre os principais compostos bioativos presentes na soja estão, as isoflavonas, fitoesteróis, poliaminas e tocoferóis (Wag & Meija, 2005; Erdmann et al., 2008; Mehta et al., 2012; Chiang & Pan, 2013; Aron et al., 2014; Toro-Funes et al., 2014; Chang & Tsai, 2016).

Dentre os compostos bioativos mais estudados estão as isoflavonas, conhecidas como análogas ao estrogênio dos mamíferos, por conta disso, apresentam atividades nos sintomas pós-menstruais, na prevenção de doenças cardiovasculares, osteoporose, e em alguns tipos de cânceres de mama, próstata, cólon e estômago (Wag & Meija, 2005; Erdmann et al., 2008; Larkin et al., 2009; Chiang et al., 2012a; Aron et al., 2014; Toro-Funes et al., 2014). As isoflavonas presentes em maior quantidade na soja são a daidzina e a genistina, que são formas glicosídicas. A absorção e metabolização das mesmas ocorrem no intestino delgado, onde normalmente são ingeridas na forma glicosilada, e sofrem hidrólise pelos micro-organismos (*Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*) presentes na microbiota, assim adquirindo a forma agliconada (Larkin et al., 2009; Chiang et al., 2012a; Chiang & Pan, 2013; Aron et al., 2014).

2.3) A soja como alimento funcional

A funcionalidade da proteína de soja foi reconhecida em 1999 pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Em particular, foi admitido informar para finalidade de rotulagem nutricional que “dietas com baixo conteúdo de gorduras saturadas e colesterol e que incluam o consumo diário de 25 gramas de proteína de soja, podem reduzir os riscos de doenças do cardiovasculares”. No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adotou uma classificação semelhante que diz: “o consumo diário de no mínimo 25 g pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado com dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2007).

Apesar de nem todas as atividades biológicas exercidas pelos compostos presentes na soja e seus produtos serem reconhecidas pelos órgãos reguladores, é sabido que os benefícios oferecidos pelos mesmos são variados e o grande número de estudos realizados (Mazzara et al., 2012; Mazzara et al., 2013; Chang & Tsai, 2016; Kuda, et al., 2016) na área pode vir a influenciar o reconhecimento de sua funcionalidade por parte das agências.

3) Fermentação

Um dos métodos mais antigos para preparação e preservação dos alimentos é a fermentação e, diferentemente de outros métodos, ela fornece ao alimento uma variedade de sabores, texturas, valores nutricionais e terapêuticos (Mehta et al., 2012). O processo fermentativo é dividido em várias categorias, que são dependentes do produto final da fermentação; por exemplo na fermentação alcoólica, as enzimas produzidas por leveduras degradam os carboidratos a álcool e dióxido de carbono. Por outro lado, na fermentação homolática os carboidratos são catabolizados em ácido lático e na fermentação heterolática, duas moléculas de glicose são convertidas em duas moléculas de ácido lático e três moléculas de acetato (Hammes & Tiachaczek, 1994; Tamine & Robinson, 1999; Ross et al., 2002; Mehta et al., 2012). No entanto, as matrizes para fermentação são das mais variáveis e as mais utilizadas são o leite, cereais, legumes e carnes.

Para a realização de uma fermentação é necessário possuir o conhecimento dos micro-organismos que serão utilizados, pois dependendo do

processo poderá haver o estímulo do crescimento de micro-organismos desejáveis e/ou a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis. Dentre os micro-organismos mais empregados em fermentações estão as bactérias ácido-láticas (BAL). Dentre as BAL mais empregadas estão os *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (Hammes & Tiachaczek, 1994; Tamine & Robinson, 1999; Ross et al., 2002). Além da produção de ácido láctico, esses micro-organismos, também produzem compostos que têm ação antimicrobiana tais como as bacteriocinas e o peróxido de hidrogênio, ou compostos que possuam ação controladora do colesterol plasmático, ou controle de patógenos intestinais por conta da competição por nutrientes, (Hammes & Tiachaczek, 1994; Ross et al., 2002; Mazzara et al., 2013; Chang & Tsai, 2016).

3.1) *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*

Ambos micro-organismos são bactérias ácido lácticas e são utilizados como cultura iniciadora na indústria de laticínios na produção de iogurtes, e quando utilizadas separadamente na elaboração de leites fermentados probióticos, auxiliam na diminuição do tempo de fermentação (Florence, 2009; Oliveira et al., 2012). A utilização desses micro-organismos em conjunto é devido ao efeito simbiótico entre eles, pois *S. thermophilus* é estimulado por peptídeos e aminoácidos provenientes do metabolismo do *L. bulgaricus* e este último é estimulado pelo ácido fórmico e CO₂ produzidos pelo *S. thermophilus* (Zourari, 1992; Oliveira et al., 2012). As bactérias lácticas, quando utilizadas em co-cultura, podem gerar exopolissacarídeos, os quais aumentam a viscosidade e textura, que proporcionam melhor qualidade sensorial ao produto (Grobbe et al., 1998; Tamine & Robinson, 1999; Badel, et al., 2011).

3.2) Resfriamento

O resfriamento é uma importante etapa na fermentação láctica, pois quando o pH desejado é alcançado a fermentação deve ser interrompida pelo resfriamento em banho de gelo. Essa queda na temperatura controla a atividade metabólica dos micro-organismos e suas enzimas que possuem crescimento limitado em torno de 10°C (Wang, et al., 2005). No entanto esse

tipo de estresse causado pela mudança súbita de temperatura pode muitas vezes diminuir a viabilidade dos micro-organismos (Tamine & Robinson, 1999; Wang, et al., 2005). Nesse caso, a aplicação resfriamentos intermediários são divididos em etapas, onde parte-se da temperatura de fermentação (30–45°C), para temperaturas intermediárias (22–28°C) e finalmente à temperatura de armazenamento (4–10°C). Nesse tipo de procedimento, o que pode variar é a temperatura de resfriamento intermediária e o tempo de exposição à essas temperaturas entre 2 e 12 horas (Wouters, et al., 1999; Wang, et al., 2005; Florence, 2013).

A adaptação das BAL (bactérias ácido lácticas) a esse tipo de estresse frio se dá por conta de mudanças fisiológicas, sendo a composição lipídica presente na membrana celular a primeira delas. Essa alteração na composição em ácidos graxos membranares pode modular a permeabilidade da membrana celular. Dentre as bactérias que possuem estudos a respeito dessa adaptação nos ácidos graxos de membrana estão o *S. thermophilus* (Bèal, et al., 2001), *L. acidophilus* (Murga, et al., 2000; Wang et al., 2005), *L. delbrueckii* (Zavaglia, et al., 2000) e *Bifidobacterium spp* (Florence, 2013). Outra adaptação apresentada pelas BAL é a produção de proteínas resistentes ao frio, essas proteínas são capazes de se ligar ao RNA (ácido ribonucleico) de modo cooperativo e para alguns deles funcionam como chaperonas de RNA facilitando o trabalho de tradução. Sob baixas temperaturas, algumas das BAL estudadas produtoras dessas proteínas são: *L. acidophilus*, *S. thermophilus* e *L. lactis* (Wouters, et al., 1999; Wouters, et al., 2000; Phadtare, 2004; Wang, et al., 2005).

4) Probióticos

Segundo a definição estabelecida pela FAO/WHO, 2002 probióticos são “micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Segundo Mitsuoka (2014), Eli Metchnikoff (um dos pioneiros no estudo de probióticos do século passado) sugeriu que os micro-organismos presentes nos alimentos poderiam modificar a microbiota intestinal substituindo os micro-organismos patogênicos por micro-organismos benéficos, depois de observar os búlgaros que

consumiam leite fermentado com lactobacilos e o efeito positivo dessa bactéria na restauração da microbiota intestinal (de Prisco & Mauriello, 2016).

Os probióticos são utilizados em diversas áreas da medicina, como na prevenção de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como adjuvante na absorção de determinados nutrientes, no alívio dos sintomas de intolerância à lactose, na diminuição dos níveis de colesterol, na inibição de alguns tipos de tumores e no estímulo do sistema imunológico através da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos intestinais (Fuller 1989; Oliveira et al., 2002; de Prisco & Mauriello, 2016; da Silva et al., 2016). Além disso, os micro-organismos probióticos podem produzir compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, que podem favorecer na exclusão de micro-organismos patogênicos como *L. monocytogenes*, *S. aureus* (Coppola & Turnes, 2004; Aljewicz et al., 2014).

Os micro-organismos probióticos são disponíveis para o consumo, em sua maioria, em alimentos fermentados, por exemplo, iogurtes, bebidas lácteas, leites fermentados, queijos, podendo também ser encapsulados ou microencapsulados (Oliveira et al., 2002; Komatsu et al., 2008; Chiang & Pan, 2012 b; Mitsuoka, 2014; de Prisco & Mauriello, 2016; da Silva et al., 2016). Além disso, esses micro-organismos podem ser utilizados em cremes ou pomadas no tratamento de doenças relacionadas ao trato urogenital e na área veterinária onde há estudos envolvendo o uso de probióticos no intuito de evitar as infecções que acometem aves e peixes (Govender et al., 2014; Vandenplas et al., 2015; Olhood et al., 2015; Hsu et al., 2016; Dawood & Koshio, 2016).

Segundo alguns autores, os requisitos para selecionar uma cepa probiótica são: efeitos fisiológicos benéficos demonstrados cientificamente; cepa de origem humana e inócua; viabilidade por um longo período de tempo durante a estocagem e transporte do produto; estabilidade ao ácido, bile, secreções pancreáticas e intestinais; não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos; resistir a fagos e ao oxigênio; aderência às células da mucosa intestinal, reduzindo ou excluindo a presença de agentes patogênicos; e colaborar na formação de uma microbiota equilibrada (Oliveira et al., 2002; Coppola & Turnes, 2004; Amores et al., 2004; Govender et al., 2014).

Apesar de todos os estudos relacionados aos probióticos, os seus mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos. Estes mecanismos de atuação dos probióticos são divididos da seguinte forma: diminuição das células viáveis devido à competição por nutrientes e a produção de compostos antimicrobianos; alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; e estímulo do sistema imune do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (Fuchs, 1989; Oliveira et al., 2002; Komatsu, et al., 2008; Oelschlaeger, 2010; Saad et al., 2011; Ferreira, 2012; Mitsuoka, 2014).

Para garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente e, segundo a ANVISA, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g. No entanto, alguns autores recomendam que produtos lácteos de 100 g, devem conter pelo menos 10^6 UFC/g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto. A ANVISA também aceita valores menores com tanto que o fabricante garanta a eficácia do produto (Oliveira et al., 2002; Donkor et al., 2006; ANVISA, 2007; Komatsu et al., 2008; Ramchandran & Shah, 2010). Os probióticos nem sempre precisam estar viáveis para exercer seus efeitos benéficos, pois os componentes celulares tanto de micro-organismos vivos, como mortos, podem estimular o sistema imune intestinal (Mitsuoka, 2014), como por exemplo os micro-organismos pertencentes ao gênero *Streptococcus* que exercem efeitos probióticos sem necessariamente sobreviver a todo o trato gastrointestinal (Vandenplas et al, 2015).

Muitos micro-organismos possuem propriedades probióticas, entre eles bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido-láticas e leveduras. Dentre os mais utilizados, destacam-se cepas de lactobacilos e bifidobactérias. De acordo com Shah (2007), 56 espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. e 29 espécies são classificadas como *Bifidobacterium* spp. Além desses micro-organismos, também são utilizados como probióticos *Saccharomyces boulardii*, *E. Coli Nissle*, e *Enterococcus faecium* (Komatsu et al., 2008; Oliveira et al., 2002; Coppola & Turnes, 2004; Ramchandran & Shah, 2010; Mitsuoka, 2014; da Silva et al., 2016).

4. 1) *Lactobacillus spp.*

Lactobacilos são micro-organismos Gram-positivos, em forma de bastonete, aerotolerantes, que se desenvolvem bem em anaerobiose. Podem ser tanto homofermentativos como heterofermentativos (Giraffa, 2010). Fazem parte do gênero *Lactobacillus* cerca de 200 espécies e subespécies (Sun et al., 2015). Estes micro-organismos possuem especificidades nutricionais complexas e são encontrados em diversos habitats, como em mucosas humanas e animais ou material originário de plantas presentes no esgoto doméstico, assim como em produtos lácteos fermentados e também em alimentos deteriorados (de Vrese & Schrezenmeir, 2008; Stefanovic, et al., 2017). Os *Lactobacillus spp.* são utilizados em fermentações de alimentos, principalmente em produtos da indústria de laticínios e também pelo fato de que muitas espécies sejam reconhecidas como probióticas, colabora pelo seu domínio no mercado de probióticos (Sun et al., 2015; Stefanovic et al., 2017).

Com o propósito de estudar e diferenciar essas espécies, o 16 sRna vem sendo empregado com êxito no sequenciamento de genes principalmente do gênero e espécies dos lactobacilos, um exemplo é o caso da diferenciação das espécies em *Lactobacillus casei/paracasei*, onde pesquisas realizadas têm levado a diversas propostas de rejeição das espécies *L. paracasei* e incluí-las novamente na espécie *L. casei*, pois, a maioria dos *L. casei* são mais semelhantes com a cepa ATCC 334 que é nomeada como *L. paracasei* do que com a cepa oficial de *L. casei* ATCC 393 (Giraffa et al., 2010; Stefanovic et al., 2017).

4.1.1) *Lactobacillus paracasei*

Pesquisas com algumas cepas de *L. paracasei* vêm apresentando resultados favoráveis no que se trata de imunoregulação, dermatites, melhora da hipercolesterolemia, hipertensão, alergias, lesões gástricas, osteoporose e obesidade (Roessler et al., 2007; Tsai et al., 2008; Paineu et al., 2008; Forssten et al., 2011; Chiang & Pan, 2012 b; Inamine, et al., 2012; Lin, et al., 2014; Nocerino et al., 2015; Compare et al., 2015).

Dentre as cepas de *L. paracasei* está a linhagem ATCC SD5275 conhecida como *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, comercializada pela Dupont-Danisco. Esta cepa possui características genéticas propriamente classificadas como *L. paracasei* por laboratórios independentes que utilizam métodos modernos de genotipagem incluindo sequência genética 16S rRNA, usando primers espécie- específico para PCR e análise por eletroforese das proteínas (Danisco, 2010).

Alguns estudos apresentam resultados favoráveis sobre a aplicação do *Lactobacillus paracasei* Lpc 37 como imunomodulador, resistência ao ácido e à bile, adesão à mucosa intestinal, inibição de micro-organismos patogênicos e inibição da produção de biofilme na cavidade oral (Roessler et al., 2007; Paineu et al., 2008; Forssten et al., 2011; Aljewicz et al., 2014; Aljewicz et al., 2015; Lin et al, 2015).

4.2) Probióticos como alimento funcional

O emprego de bactérias lácticas em alimentos é de longa data e as cepas empregadas são consideradas micro-organismos comensais, sem potencial patogênico. Dentre esses micro-organismos, as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. são mais frequentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras (GRAS - “generally recognized as safe”). Por outro lado, certas bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. são patógenos oportunistas (Oliveira et al., 2002; Govender et al., 2014).

O consumo de probióticos veiculado aos alimentos vem crescendo ao redor do mundo. Segundo de Prisco & Mauriello, (2016), os probióticos correspondem a cerca de 60-70% de todo o mercado de alimentos funcionais, sendo o setor de laticínios pioneiro destes micro-organismos em alimentos.

Geralmente o uso de probióticos em alimentos vem com a indicação de que os mesmos promovem o balanço da microbiota intestinal. No entanto essa indicação de uso não se refere ao tratamento de alguma doença, mas sim ao estado fisiológico que o indivíduo se encontra (Govender et al., 2014; de Prisco & Mauriello, 2016). Apesar dos estudos comprovando os efeitos benéficos dos probióticos (Mazzara et al., 2012; Chiang et al., 2012a; Mazzara et al., 2013;

Sah et al., 2014; Lin et al., 2015; Chang & Tsai, 2016; Kuda, et al., 2016) a indicação de uso na prevenção ou tratamento de certas doenças ainda não é aprovada pelas agências reguladoras.

CAPÍTULO II- Efeito de cultura probiótica em fermentado a base de soja: resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse gastrointestinal *in vitro* e atividade antimicrobiana.

Alimentos funcionais são alimentos promotores de benefícios à saúde através da atuação de suas substâncias no metabolismo ou na fisiologia do ser humano (Granato et al., 2010; Mitsuoka, 2014). A soja está dentre os alimentos funcionais que apresentam cada vez mais procura pelo consumidor. Dentre os vários subprodutos o extrato hidrossolúvel de soja é um produto de origem vegetal que possui o potencial para o desenvolvimento de novas bebidas, no entanto a aceitabilidade do mesmo pelo consumidor é limitada por apresentar características sensoriais semelhantes às do feijão cru, devido a compostos voláteis de baixo peso molecular que são produtos da ação das lipoxigenases, que por sua vez, podem ser inativadas através de tratamento térmico adequado. (Rosa et al., 2009; Larkin et al., 2009)

A fermentação tem sido uma técnica muito empregada para desenvolver produtos derivados de soja, neste sentido o extrato hidrossolúvel de soja é empregado como meio de crescimento e de atividade bioquímica de várias bactérias lácticas na produção de queijo de soja e diversos tipos de bebidas fermentadas (Mazzara et al., 2012; Mazzara et al., 2013; Chang & Tsai, 2016; Kuda, et al., 2016). Fermentando o extrato hidrossolúvel de soja melhora-se a qualidade sensorial do mesmo, pois as bactérias lácteas dão um sabor refrescante à bebida, mascarando o sabor classificado como de “feijão cru” característico do extrato e propiciando os benefícios contidos na soja (Larkin et al., 2009; Pereira et al., 2009).

Os probióticos são comumente empregados nas fermentações de alimentos, devido aos benefícios que os mesmos propiciam a saúde, como na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como adjuvante na absorção de determinados nutrientes e no estímulo do sistema imunológico (Coppola & Turnes, 2004; Oliveira et al., 2002; Aljewicz et al., 2014; Prisco & Mauriello, 2016; da Silva et al., 2016). Dentre os micro-organismos utilizados como probióticos estão bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. Dentre os mais utilizados, destacam-se

várias cepas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., sendo normalmente disponibilizados em bebidas fermentadas, queijos, iogurtes, podendo também ser encapsulados ou microencapsulados. *Lactobacillus paracasei* são micro-organismos que colonizam diversos nichos ecológicos, entre eles, o trato gastrointestinal de mamíferos, apresentando, portanto, boa sobrevivência a um baixo valor de pH e tolerância a alta concentração de bile, adesão a mucosa intestinal e inibição de micro-organismos patógenos (Roessler, et al., 2007; Paineu et al., 2008; Aljewicz et al., 2014; Govender et al., 2014).

Nesse contexto, a preparação de um produto fermentado à base de matéria-prima não láctea, como extrato hidrossolúvel de soja, através da fermentação de *L. paracasei*, é uma proposta inovadora no campo de pesquisa em alimentos funcionais fermentados

2) Objetivos

O objetivo deste trabalho é desenvolver um fermentado probiótico de extrato hidrossolúvel de soja utilizando o micro-organismo *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 e avaliar suas alterações fisiológicas ocorridas durante o processo de fermentação e o armazenamento refrigerado.

2.1) Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento do *Lactobacillus paracasei* (micro-organismo probiótico) em cultura pura e/ou mista com culturas do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) em extrato hidrossolúvel de soja;
- Avaliar a cinética de acidificação dos micro-organismos *L. paracasei* (monocultura), *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (co-cultura binária) e *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (co-cultura ternária);
- Avaliar a resistência dos micro-organismos em armazenamento a 4°C após 1, 14 e 28 dias, assim como sua pós-acidificação e a resistência *in vitro* ao estresse gastrointestinal;
- Analisar os ácidos graxos presentes nos extratos de soja fermentados pelos micro-organismos *L. paracasei*, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*;

- Determinar os compostos decorrentes do metabolismo bacteriano durante o armazenamento refrigerado (1,14 e 28 dias) a 4°C;

3) Material e Métodos

3.1) Micro-organismos

As culturas liofilizadas utilizadas foram *Streptococcus thermophilus* (St) TA040 (Danisco-Dupont, Estados Unidos da América), *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* (Lb) LB340 (Danisco-Dupont, Estados Unidos da América) e *Lactobacillus paracasei* (Lp) Lpc- 37 (Danisco, Estados Unidos da América).

Os micro-organismos utilizados como bio-indicadores foram: *Listeria monocytogenes* 104 (proveniente de alimentos, cepa cedida pela professora Tit. Bernadete Dora Gombossy de Melo Franco do Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) e *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CETC239 (Cepa espanhola CETC-adquirida da Colección Española de Cultivo Tipo, Espanha).

3.2) Preparação do inóculo

Foram pesados 24 g de extrato hidrossolúvel de soja em pó (Soymilke, Olvebra, Brasil), que foram diluídos em 200 mL de água destilada e posteriormente autoclavados durante 15 minutos à 121°C. E então foram pesados 300 mg de *S. thermophilus* 500 mg de *L. bulgaricus* e 1,0 g de cultura de *L. paracasei* que foram adicionados separadamente a 50 mL do extrato de soja.

3.3) Preparo da base de soja a ser fermentada

A base de soja foi preparada utilizando o extrato hidrossolúvel de soja em pó (Soymilke, Olvebra, Brasil). Para tanto, foram pesados 240 g de extrato de soja hidrossolúvel (Soymilke, Olvebra, Brasil) os quais foram diluídos em 2 L de água filtrada e em seguida pasteurizados em Thermomix (Vorwerk & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha) a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente, a base foi transferida para frascos de 500 mL e resfriada em banho de gelo e posteriormente armazenada a 4°C.

3.4) Processo fermentativo

Os frascos contendo os inóculos foram acondicionados em banho a 37°C por 30 minutos para a ativação das culturas. Posteriormente, foram retiradas alíquotas de cada inóculo que foram transferidas para frascos tipo *Shott* contendo 500 mL da base de soja. As fermentações foram realizadas em triplicata e em dias distintos de acordo com a seguinte combinação de micro-organismos, (i) *L. pacarasei*; (ii) *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*; (iii) *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei*. Os frascos foram colocados em banho a 37°C e monitorados pelo sistema Cinac (Ysebaert, Frépillon, France) descrito por Spinnler & Corrieu (1989), onde o cultivo fermentativo foi conduzido até atingir o pH de 4,5.

A etapa de resfriamento foi dividida em duas formas (Figura 1): a) direta, onde a fermentação foi interrompida e os frascos foram colocados em banho de gelo durante 10 minutos; b) resfriamento em duas fases, onde após a interrupção da fermentação os frascos foram acondicionados em banho com temperatura intermediária de 25°C durante 8 horas. Após este período os frascos foram transferidos para banho de gelo. Posteriormente, em fluxo laminar (Pachane, Pa710ECO, Brasil), foi realizada a quebra do coágulo utilizando um bastão de aço inoxidável agitando-o para cima e para baixo durante 60 segundos. O conteúdo foi transferido para potes plásticos de polipropileno com capacidade de 50 mL cobertos com selo de alumínio e selados utilizando o equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) e armazenados a 4°C para análises posteriores.

3.5) Pós-Acidificação

A pós-acidificação das amostras de extrato de soja fermentado foi determinada em tempos pré-determinados (1, 14 e 28 dias) de armazenamento a 4°C, por medição de pH usando o pHmetro modelo Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brasil).

Figura 1. Fluxograma do processo de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja.

*(*Lp*) *L. paracasei*; (*StLb*) *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*; (*StLbLp*) *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei*.

3.6) Contagem microbiológica

As contagens foram feitas a partir do d_0 (início da fermentação), d_1 (1 dia), d_{14} (14 dias) e d_{28} (28 dias) após a fermentação. Os meios de cultivo utilizados para contagem de *S. thermophilus* foi o M17 (Difco, USA) suplementado com lactose 10% (p/v). Para a contagem de *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* foi utilizado o MRS (Difco, USA) acidificado a pH 5,4 com ácido acético (Oliveira et al., 2001) e para o *L. paracasei* foi utilizado o MRS (Difco, USA) com adição de vancomicina (Ong, et al 2006). A contagem foi realizada retirando-se 1 mL das amostras e diluindo as com 9 mL de água peptonada a 0,1 g/L, utilizando o método de contagem por profundidade, expressa em unidades formadoras de colônias (UFC).

3.7) Quantificação de atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas nos tempos pré-determinados de d_1 (1 dia), d_{14} (14 dias) e d_{28} (28 dias) após a fermentação. A extração das bacteriocinas foi baseada no trabalho de Yang et al. (1992), onde as amostras fermentadas foram centrifugadas a 14.000 rpm a 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi então retirado e o mesmo teve o seu pH corrigido para valores entre 6.0-6.5 utilizando NaOH 1M, no intuito de eliminar a ação de ácidos orgânicos. Além disso, o mesmo foi filtrado em membrana 0,45µm e aquecido a 70°C por 20 minutos para eliminação de possíveis proteases.

O sobrenadante foi serialmente diluído em tampão fosfato 25mM e 10µL de cada diluição foram colocados sobre placas contendo os meios Mueller-Hinton (Difco, USA) para *L. monocytogenes* 104 e Tryptic Soy Agar (Difco, USA) para a cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CETC239, e posteriormente incubadas a 37°C por 18 horas.

A quantidade de peptídeos antimicrobianos liberados nos meios de cultivo foi quantificada e expressa em unidades arbitrárias (AU) por mL. A primeira diluição em que não houve zona de inibição formada foi considerada e, utilizando a expressão matemática $D^n \cdot 1000 / P$ (em que D representa o fator de diluição; n – a primeira diluição não apresentando zona de inibição e P – o volume de sobrenadante colocando sobre o ágar).

3.8) Determinação dos ácidos graxos

A determinação dos ácidos graxos presentes no extrato hidrossolúvel de soja fermentado como não fermentado, será feita mediante a extração dos lipídeos segundo o método Bleigh-Dyer (Bleigh & Dyer, 1959) com algumas modificações, seguida da metilação dos ésteres de ácidos graxos, preparado segundo o método descrito pela *International Organization for Standardization* ISSO 15884-IDF.

Os ésteres de ácidos graxos obtidos foram analisados por cromatógrafo gasoso modelo Varian 430-GC (Varian, Holanda), utilizando coluna de sílica fundida 100mm x 0,25mm x 0,2µm, a temperatura do injetor foi fixada em 250°C e a do detector em 280°C, a temperatura inicial da coluna foi de 140°C durante cinco minutos e depois foi aquecida até 240°C com uma velocidade 4°C por minuto permanecendo nessa temperatura durante 20 minutos, foram injetados 1µL de amostra e o gás hélio utilizado para o arraste.

A composição das amostras foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com respectivos padrões de ácidos graxos, pelo software Galaxie Chromatography Data System versão 1.9 (Agilent Technologies, Estados Unidos da América) a determinação das porcentagens de massa presentes foi realizada por normalização da área de acordo com método oficial Ce 1-62 (AOCS,1997), todas as análises foram realizadas em duplicata sendo expresso os valores médios.

3.9) Análise dos ácidos e açúcares

As análises de ácidos (lático e acético) e açúcares (sacarose, glicose e frutose) foram realizadas nos tempos pré-determinados de d₁ (1 dia), d₁₄ (14 dias) e d₂₈ (28 dias) após a fermentação. As amostras fermentadas foram centrifugadas a 14.000 rpm a 10°C por 10 minutos, O sobrenadante foi então retirado e o mesmo foi filtrado em membrana 0,45µm e armazenado em ultrafreezer até o momento da análise. As concentrações de glicose, sacarose, frutose, ácido lático e ácido acético foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), modelo LC-20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com duas bombas (LC-20AD), uma unidade

desgaseificadora (DGU-20A), um auto injector (SIL-20ACHT), uma coluna (CTO-20AC), um detector de índice refratário (RI-210) (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japão) e uma coluna 300 x 7,8 mm (HPX-87H) (Aminex, Bio-Rad, CA, USA). As análises foram realizadas a temperatura ambiente utilizando acetonitrila: água ultrapura (75%:25%) como fase móvel a um fluxo de 0,9 mL/min. Glicose, sacarose, fructose, ácido láctico e ácido acético ultrapuros (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram utilizadas nas concentrações de 0,1 a 30 g/L como soluções padrão para o preparo da curva de calibração. As amostras foram analisadas em triplicata.

3.10) Implementação de estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

A resistência *in vitro* dos micro-organismos ao estresse gastrointestinal foi realizada após 28 dias da fermentação em modelo de digestão estática (Bedani et al, 2013), que é dividido em três fases, gástrica, primeira fase entérica (intestino delgado) e segunda fase entérica (intestino grosso), cada fase possui uma duração de 2 horas, totalizando 6 horas de análise ao final de cada fase amostras eram retiradas para a realizar a enumeração dos micro-organismos. Primeiramente 25 mL das amostras foram diluídas em 225 mL de solução salina (NaCl 0,85%), dessa diluição foram retirados 10 mL que foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 50 mL.

Na fase gástrica, foram adicionados 0,12 mL de HCl 1N (Labsynth, São Paulo, Brasil) para manter o pH da solução em torno de 2,4 – 2,7 e soluções de pepsina (Pepsina, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) e lipase (Amano lipase G, from *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) em concentrações de 3 g/L e 0,9 mg/L respectivamente. Os frascos Erlenmeyers foram incubados em banho agitador (Maxi-Shake, Heto, Brasil) a 37°C em agitação de 150 rpm durante 2 horas. Na primeira fase entérica o pH foi aumentado para 6,0 – 6,3 utilizando de uma solução 1N de NaOH em tampão fosfato, e foram adicionadas soluções de 10 g/L de bile (Bile extract, porcine, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) e 1 g/L de pancreatina (Pancreatina 3 NF, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil), os frascos foram novamente incubados no banho a 37°C - 150rpm durante 2 horas. Na segunda fase entérica o pH foi

ajustado para 7,2 – 7,4 utilizando a mesma solução da fase entérica I, para que as concentrações de bile e pancreatina se mantivessem em 10 e 1 g/L, respectivamente e os frascos foram novamente incubados a 37°C – 150 rpm durante 2 horas.

4) Análise Estatística

Todas as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas em triplicata nos tempos pré-determinados (1, 14 e 28 dias) de armazenamento a 4°C. Os resultados foram submetidos às análises de variância (ANOVA) usando o *Software Statistica* 10.0. Os valores médios foram comparados usando o teste de Tukey a $P < 0,05$.

5) Resultados e discussão

5.1) Cinética de acidificação

Observou-se na Figura 2 as curvas de acidificação obtidas durante o cultivo da base fermentada de soja. No que diz respeito ao tempo para atingir o pH4,5, notou-se claramente que a monocultura *L. paracasei* foi 40,8% e 36,7% mais lento em relação às co-culturas StLb e StLbLp, respectivamente. O tempo de cultivo das culturas está relacionado com a velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$) (Tabela 1). Essa afirmação pode ser justificada, pois os valores médios de $V_{\max}$ das co-culturas StLb (9,13 upH.min⁻¹) e StLbLp (10,82 upH.min⁻¹) foram maiores quando comparados com a monocultura Lp (5,78 upH.min⁻¹).

Kristo et al. (2003) realizaram uma fermentação utilizando a co-cultura ternária StLbLp em leite desnatado, e, obtiveram um valor de $V_{\max}$ de aproximadamente 20 upH min⁻¹, ou seja, 45,9% maior que o obtido no presente trabalho. Isso pode ocorrer devido ao fato de que o leite desnatado possui lactose, carboidrato facilmente assimilável pelas bactérias lácticas. Além de utilizar uma matriz diferente para a fermentação, a temperatura de cultivo que Kristo et al. (2003) utilizaram foi de 42°C, o que acelerou o metabolismo das co-culturas ternárias.

Figura 2. Curva de acidificação dos micro-organismos *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. paracasei* (Lp) em base de soja a 37°C até o pH 4,5.

No entanto Lazzaridou et al. (2014), também realizaram uma fermentação em leite pelas bactérias StLbLp e obtiveram um valor de $V_{\max}$ de 9,62 upH.min⁻¹ sendo 11% mais baixo que no obtido nesse trabalho e, cuja a diferença, pode estar relacionada à temperatura empregada que no caso foi de 36°C. Isso mostra que a temperatura empregada na fermentação influencia a velocidade máxima de acidificação (Florence, 2013).

O tempo de fermentação das co-culturas ternárias foi mais rápido em relação à monocultura pois existe um sinergismo entre as cepas utilizadas no presente estudo. Esse sinergismo entre co-culturas binária e ternárias já foi relatado por alguns autores (Kristo et al., 2003; Oliveira et al., 2012; Florence et al., 2012 b; Lazzaridou et al., 2014).

Algo observado apenas visualmente foi que as amostras que sofreram resfriamento intermediário seguido de armazenamento a frio estavam aparentemente mais viscosas e não apresentavam separação de fases como as amostras que sofreram o resfriamento único. As BAL são conhecidas por serem produtoras de expolissacarídeos, que são conhecidos por melhorarem a

textura dos alimentos os quais essas bactérias são empregadas (Badel et al, 2011).

Segundo Li et al, (2014) e Peng & Guo (2015), quando o extrato de soja foi fermentado por BAL, houve aumento na textura e produção de expolisacarídeos.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da monocultura de *L. paracasei* (Lp), co-cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (StLb) e co-cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (StLbLp) em extrato de soja fermentado a 37°C até atingir o pH 4,5.

Base	TpH _{5,5} (h)	TpH _{5,0} (h)	TpH _{4,5} (h)	V _{max} (mUpH.min ⁻¹)	T _{vmax} (h)	pH _{vmax}
Lp	10,7 ± 0,3 ^b	12,4 ± 0,2 ^c	15,2 ± 0,1 ^c	5,8 ± 0,1 ^a	12,2 ± 0,3 ^c	5,0 ± 0,2 ^a
StLb	4,9 ± 0,3 ^a	6,1 ± 0,1 ^a	9,0 ± 0,1 ^a	9,1 ± 0,1 ^b	3,0 ± 0,1 ^a	6,1 ± 0,1 ^c
StLbLp	5,3 ± 0,1 ^a	6,6 ± 0,1 ^b	9,6 ± 0,3 ^b	10,8 ± 0,4 ^c	5,0 ± 0,5 ^b	5,7 ± 0,2 ^b

TpH_{5,5}: tempo para alcançar o pH 5,5; TpH_{5,0}: tempo para alcançar o pH 5,0; TpH_{4,5}: tempo para completar a fermentação; V_{max}: máxima taxa de acidificação; T_{vmax}: tempo para alcançar a máxima taxa de acidificação; pH_{vmax}: pH do meio quando a máxima taxa de acidificação foi alcançada. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística significativa de acordo com o teste Tukey (P < 0,05).

5.2) Pós-Acidificação

Os perfis de pós-acidificação dos extratos de soja fermentados estão apresentados na Figura 3, onde os resultados estão dispostos de acordo com a combinação de culturas utilizadas na fermentação.

O extrato de soja fermentado pela monocultura de *L. paracasei* (Figura 3a) apresentou decréscimo de pH de 0,37 unidades de pH passando de 4,0 em d₁ para 3,6 em d₂₈ para os fermentados que sofrem o resfriamento intermediário. Já os extratos fermentados pela mesma monocultura que sofreram resfriamento único foram de 4,1 em d₁ para 3,6 em d₂₈ tendo um decréscimo de 0,4 unidades de pH. No entanto, observou-se que houve uma maior diferença no pH final para d₁ onde no caso do resfriamento intermediário que foi de 0,1 unidades de pH. E esse decréscimo provavelmente se deve à temperatura intermediária (25°C), que se trata de uma temperatura que não

corresponde ao crescimento ótimo, porém em que o metabolismo da bactéria ainda se encontra ativo (Wouters et al, 1999; Wang et al, 2005).

A Figura 3b mostra o perfil de acidificação da co-cultura binária (StLb), onde observou-se um aumento significativo de 0,1 unidades de pH ao final do período de armazenamento (28 dias). O aumento nos valores de pH pode ser justificado pela morte celular do Lb observada no tópico 5.3. Segundo Siegmund et al, (1999), demonstram que *L. bulgaricus*, manteve seu pH interno em função do externo, sendo que conforme o pH externo cai o interno também decresce, no entanto, os valores de pH interno se mantêm constantes depois que o pH externo atinge o valor de 5,0. Logo a morte a celular pode ocasionar um aumento do pH do meio.

Com relação ao extrato fermentado com a co-cultura terciária (StLbLp) (Figura 3c), assim como ocorreu com a monocultura (Figura 3a) quando submetida ao resfriamento intermediário, houve maior redução do valor de pH referente ao final da fermentação de 4,5 até 4,2 em d₁. Essa redução provavelmente é devida a temperatura empregada, que ainda permite atividade metabólica por parte das bactérias. Já no resfriamento único, os extratos fermentados mostraram decaimento de 0,5 unidades de pH durante o armazenamento (28 dias), correspondendo a um valor duas vezes maior do que o observado no resfriamento intermediário, que foi de 0,2 unidades de pH.

Donkor et al (2005), observou que a pós-acidificação do *L. paracasei* em fermentado a base de soja, mostrou baixa capacidade de pós-acidificação diminuindo 0,2 unidades de pH após 28 dias de armazenamento refrigerado, o que é 58,7% menor do que o observado nesse trabalho.

a)

b)

c)

Figura 3. Evolução do pH em meio contendo extrato de soja fermentado por monocultura de *L. paracasei* (a), cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (b) e cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (c) após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único (4°C) e a coluna (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento a 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.3) Contagem microbiológica

Streptococcus thermophilus (St), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) e *Lactobacillus paracasei* (Lp), apresentaram no início do processo fermentativo contagens de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (Tabela 2). Para os extratos fermentados que sofreram resfriamento único esse valor foi elevado em 2 log durante a fermentação o que em média foram 1,4% de aumento, enquanto nos extratos fermentados que sofreram resfriamento intermediário houve um aumento de cerca de 3 log o que foi em média 3,0% de aumento. Tais resultados mostram que as bactérias permanecem com o metabolismo ativo na temperatura intermediária (25°C) utilizada no resfriamento intermediário.

Tabela 2. Contagem microbiológica de *L. paracasei* (Lp), *S. thermophilus* (St) e *L. bulgaricus* (Lb) em extrato hidrossolúvel de soja fermentado em 0h (d₀) e 24h (d₁), de armazenamento a 4°C.

Micro-organismo	d ₀	d ₁ (RU)	d ₁ (RI)
Lp	6,10 ± 0,02 ^a	8,59 ± 0,04 ^b	9,18 ± 0,03 ^c
St	6,33 ± 0,33 ^a	8,62 ± 0,06 ^b	9,26 ± 0,09 ^c
Lb	6,13 ± 0,07 ^a	8,62 ± 0,01 ^b	9,22 ± 0,06 ^c

d₀: momento em os micro-organismos foram retirados do pré inóculo e transferidos para o extrato de soja que será fermentado; d₁: 24 horas após o término da fermentação; RU: resfriamento único; RI: resfriamento intermediário. Os valores médios das contagens de bactérias viáveis estão representados em log de UFC/mL. Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística significativa de acordo com o teste Tukey (P < 0,05).

Nos extratos de soja fermentados pela monocultura (Figura 4), o *L. paracasei* apresentou maior estabilidade durante o armazenamento, tanto para os fermentados que sofreram resfriamento único (9,44 log UFC/mL) como os que sofreram resfriamento intermediário (9,75 log UFC/mL). Entretanto o resfriamento intermediário proporcionou uma viabilidade bacteriana 3,2% maior nos extratos quando comparados com o resfriamento único.

Figura 4. Contagem microbiológica de *L. paracasei* (Lp) em fermentado de extrato de soja após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Como se pode observar na Figura 5a, que demonstra as contagens referentes à fermentação com as culturas binárias (StLb), o St se manteve estável durante todo o processo, enquanto o Lb apresentou uma queda significativa (3,3 log UFC/mL) na viabilidade, que provavelmente deve-se à dificuldade do Lb de metabolizar os nutrientes da soja, sendo esse um meio onde não há a presença de lactose um dos principais açúcares metabolizados por esse micro-organismo (Donkor et al, 2006).

A viabilidade do *L. bulgaricus* (Figura 5b) nos extratos que sofreram resfriamento intermediário mostrou-se maior do que quando comparando aos extratos que sofreram resfriamento único, chegando a uma diferença de 33,2% no último dia (d₂₈) de armazenamento refrigerado. Esse aumento pode estar relacionado à adaptação celular que a bactéria sofre na temperatura intermediária, o que ocorre muitas vezes devido a um rearranjo na camada lipídica (Zavaglia, et al. 2000). Essa queda na viabilidade do Lb que foi submetido ao resfriamento único também foi observada por Hou et al. (2003) que obteve contagens próximas a 4 log (UFC/mL) após 14 dias de análise.

a)

b)

Figura 5. Contagem microbiológica de *S. thermophilus* (a) e *L. bulgaricus* (b) em fermentado de extrato de soja em 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Assim como observado na Figura 4 (contagem do *L. paracasei*) a viabilidade das bactérias fermentadas em co-cultura terciária *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei* (Figura 6) se mantiveram estáveis durante o período de armazenamento refrigerado (28 dias), apresentando-se contagens de Lp 3,7% maiores nas amostras que sofreram resfriamento intermediário em d₂₈.

De modo geral, os resultados apresentados na Figura 6 mostram que as culturas St e Lb mantêm sua viabilidade mais estável na presença do probiótico *L. paracasei*. Esse comportamento também foi observado por Donkor et al (2005) e Lazzaridou et al. (2014) onde os mesmos empregaram St e Lb na

fermentação de extrato de soja e leite respectivamente e acompanharam uma melhora na viabilidade das mesmas quando junto delas foi empregado uma bactéria probiótica.

Além do mais, o micro-organismo *L. paracasei*, apresentou tanto em monocultura (Lp) quanto em co-cultura ternária (StLbLp), contagens superiores a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) viáveis, estando em acordo com o recomendado pela ANVISA para produtos considerados como probióticos.

a)

b)

c)

Figura 6. Contagem microbiológica de *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. paracasei* (c) em fermentado de extrato de soja em 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C. A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.4) Quantificação de atividade antimicrobiana

Nos ensaios realizados tanto na monocultura (Lp) quanto como na co-cultura binária (StLb) e co-cultura ternária (StLbLp) não foram observadas atividades antimicrobianas frente aos micro-organismos bioindicadores utilizados no presente estudo.

Alguns fatores que podem justificar essa falta de atividade seriam o fato de que geralmente as bacteriocinas são produzidas durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo e em valores de pH mais elevado (maior que pH 4,5) (Gillor et al., 2005). Além disso, as condições de estresse, como agitação, podem favorecer a produção de compostos antimicrobianos, o que não ocorreu durante a fermentação empregada no presente trabalho.

Apesar da aplicação de bacteriocinas na biopreservação de alimentos vir sendo estudada nos últimos anos no intuito de aumentar a vida útil e evitar a contaminação dos mesmos, alguns estudos apontam a produção de compostos antimicrobianos pelos *L. paracasei* (de Oliveira et al, 2012; Lin et al, 2015; Leite et al, 2015).

5.5) Perfil dos ácidos graxos

O perfil dos ácidos graxos do extrato de soja não fermentado e após a fermentação estão apresentados na Tabela 3.

Dentre os ácidos graxos analisados, o ácido palmítico (C 16:0) foi o único que não apresentou diferenças significativas entre as amostras, mesmo após a fermentação e resfriamento, mantendo sua estabilidade durante o período de armazenamento. Os valores de ácido palmítico obtidos no extrato de soja não fermentado ($10,2 \text{ g } 100^{-1}$) foram semelhantes aos observados por Peñalvo et al. (2004) $10,7 \text{ g } 100^{-1}$.

Já na quantificação do ácido esteárico (C 18:0) o que se pode observar foi que nas amostras que sofreram resfriamento intermediário, houve maior estabilidade nos teores desse ácido graxo no decorrer do período de

armazenamento estudado (28 dias), pois, os mesmos se mantiveram em $4,4 \text{ g } 100^{-1}$, valor que também foi observado por Antoniassi et al. (2011).

Inversamente ao que foi observado no ácido esteárico, o ácido oleico (C 18:1) mostrou menor estabilidade nos produtos que sofreram resfriamento intermediário, encontrando-se em uma quantidade média 25% menor do que quando comparado com o extrato de soja não fermentado. Nas amostras que sofreram resfriamento único o ácido oleico apresentou-se em média 33% maior em d_{28} quando comparado às amostras que sofreram resfriamento intermediário no mesmo período e sendo 10% maior do que o extrato de soja não fermentado.

A quantidade relativa de ácido linoleico (C 18:2 n-6) das amostras que sofreram resfriamento intermediário após fermentação, manteve-se estável, não sendo significativamente diferente, tendo média de $54,0 \text{ g } 100^{-1}$ quando comparada às amostras que sofreram resfriamento único, cuja média foi 18% superior em d_{14} .

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (g 100 g⁻¹ do total ácidos graxos) em extrato de soja fermentado por monocultura de *L. paracasei* (Lp), cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (StLb) e cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (StLbLp) em 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C.

Culturas	Tempo (dias)	Resfriamento	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Alfa-Linolênico
Extrato de soja	NF	NF	10,2 ± 0,02 ^a	4,3 ± 0,00 ^{ef}	34,5 ± 0,02 ^d	46,1 ± 0,04 ^e	4,8 ± 0,00 ^h
Lp	d1	RU	10,4 ± 0,02 ^a	4,6 ± 0,01 ^h	33,9 ± 0,02 ^c	46,3 ± 0,01 ^e	4,7 ± 0,01 ^g
		RI	11,5 ± 0,01 ^a	4,4 ± 0,02 ^{fg}	25,8 ± 0,03 ^a	54,1 ± 0,02 ^g	4,2 ± 0,00 ^{abc}
	d14	RU	10,4 ± 0,06 ^a	4,1 ± 0,01 ^{ab}	33,1 ± 0,01 ^b	47,4 ± 0,01 ^f	5,0 ± 0,01 ⁱ
		RI	11,6 ± 0,05 ^a	4,5 ± 0,08 ^e	25,8 ± 0,00 ^a	53,9 ± 0,03 ^g	4,2 ± 0,00 ^{ab}
	d28	RU	9,7 ± 0,03 ^a	4,2 ± 0,01 ^{ab}	39,0 ± 0,01 ^g	42,7 ± 0,01 ^c	4,4 ± 0,01 ^{de}
		RI	11,6 ± 0,01 ^a	4,4 ± 0,03 ^e	25,9 ± 0,05 ^a	53,9 ± 0,02 ^g	4,2 ± 0,01 ^a
StLb	d1	RU	10,0 ± 0,48 ^a	4,3 ± 0,10 ^{de}	37,6 ± 0,48 ^f	44,0 ± 0,32 ^d	4,6 ± 0,11 ^f
		RI	11,4 ± 0,03 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,9 ± 0,01 ^a	54,0 ± 0,05 ^g	4,2 ± 0,01 ^{ab}
	d14	RU	9,6 ± 0,05 ^a	4,2 ± 0,02 ^{cd}	40,0 ± 0,04 ⁱ	41,9 ± 0,05 ^a	4,2 ± 0,03 ^{ab}
		RI	11,5 ± 0,01 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,8 ± 0,00 ^a	54,0 ± 0,01 ^g	4,2 ± 0,00 ^{ab}
	d28	RU	9,6 ± 0,03 ^a	4,2 ± 0,01 ^{bc}	39,2 ± 0,03 ^{gh}	42,3 ± 0,01 ^b	4,3 ± 0,01 ^{cd}
		RI	11,4 ± 0,05 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,9 ± 0,01 ^a	54,0 ± 0,02 ^g	4,3 ± 0,03 ^{abc}
StLbLp	d1	RU	9,6 ± 0,06 ^a	4,1 ± 0,00 ^a	39,0 ± 0,03 ^g	43,0 ± 0,03 ^c	4,4 ± 0,00 ^e
		RI	11,5 ± 0,04 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,9 ± 0,03 ^a	53,9 ± 0,10 ^g	4,3 ± 0,01 ^{abc}
	d14	RU	9,5 ± 0,02 ^a	4,1 ± 0,02 ^a	39,4 ± 0,02 ^h	42,7 ± 0,02 ^c	4,3 ± 0,01 ^{cd}
		RI	11,5 ± 0,07 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,9 ± 0,15 ^a	54,0 ± 0,09 ^g	4,3 ± 0,02 ^{bc}
	d28	RU	10,0 ± 0,13 ^a	4,3 ± 0,07 ^{de}	37,0 ± 0,17 ^e	44,1 ± 0,16 ^d	4,4 ± 0,12 ^e
		RI	11,5 ± 0,00 ^a	4,4 ± 0,01 ^{fg}	25,8 ± 0,02 ^a	54,0 ± 0,00 ^g	4,3 ± 0,01 ^{abc}

NF: Não fermentado; RU: Resfriamento único; RI: resfriamento intermediário. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística significativa de acordo com o teste Tukey (P < 0,05).

O teor de ácido alfa-linolênico (C 18:3 n-3) apresentou um aumento significativo nas amostras de resfriamento único StLb (0,07 g 100⁻¹) e StLbLp (0,12 g 100⁻¹) do d₁₄ para o d₂₈, já no fermentado por Lp o teor foi de 5,0 g 100⁻¹ no d₁₄ decaindo para 4,2 g 100⁻¹ no d₂₈. Nas amostras que sofreram resfriamento intermediário, o teor foi 12,2% menor, comparado ao extrato não fermentado, além de os mesmos demonstraram-se estáveis durante o armazenamento.

Os valores dos ácidos graxos presentes nos extratos de soja não fermentados foram semelhantes aos obtidos por Peñalvo et al. (2004) e Antoniassi et al. (2011).

As variações observadas nas amostras que sofreram ou não o resfriamento intermediário pode ser devido a temperatura utilizada (25°C), onde as bactérias ainda permanecem com seu metabolismo ativo mesmo em temperaturas que não são as consideradas ótimas para o seu crescimento (Wouters et al., 1999; Murga et al., 2000).

O rearranjo na quantificação relativa dos ácidos graxos por BAL durante seu processo fermentativo e armazenamento já foram descritos por alguns autores (Tamine & Robinson, 1999; Florence et al., 2012 a; Florence et al., 2012 b; Florence et al., 2014; Florence et al., 2016), no entanto, os mesmos foram realizados em leite.

5.6) Ácidos orgânicos e açúcares

Dentre os principais metabólitos produzidos pelas BAL, estão o ácido láctico e o acético, ambos são produzidos através da metabolização de açúcares (Ross et al, 2002).

Na Tabela 4 encontra-se descrita a produção de ácido láctico e acético pela monocultura (Lp), cultura binária (StLb) e cultura terciária (StLbLp) no extrato de soja fermentado durante o período de armazenamento (28 dias). O que se pode observar na produção de ácido láctico é que independente da cultura utilizada ou do tipo de resfriamento, a quantidade de ácido láctico sempre aumenta, indicando que mesmo em armazenamento refrigerado (4°C) as bactérias ainda possuem seu metabolismo ativo (Donkor, et al., 2005, 2006 e 2007 a,b).

No extrato de soja fermentado pelo Lp houve uma maior produção de ácido láctico e acético nas amostras que sofreram resfriamento intermediário sendo 45% e 31% maiores no d₂₈ para o ácido láctico e acético, respectivamente. Esse aumento na produção de ácidos orgânicos deve-se provavelmente à temperatura intermediária (25°C), onde o metabolismo das bactérias mesmo que de forma mais lenta ainda está ativo (Wang, et al., 2005).

Essa produção de ácido acético mesmo que em baixas quantidades 0,5 g/L em resfriamento único e 0,8 g/L em resfriamento intermediário constatando que o *L. paracasei* é um micro-organismo heterofermentativo.

A cultura binária (StLb) apresentou produção de ácido láctico 62% menor nas amostras submetidas ao resfriamento único em d₁ quando comparadas as que sofreram resfriamento intermediário. No entanto, entre as duas condições de resfriamento o que se observou foi que ambas mantiveram estáveis as quantidades de ácidos orgânicos produzidos, contrário ao observado na monocultura (Lp), que apresentou aumento de 10,1 g/L na produção de ácido láctico nas amostras que sofreram resfriamento intermediário e 6,0 g/L no resfriamento único. Ao contrário do observado no presente trabalho Wang et al (2003) e Donkor et al. (2005) obtiveram produção de ácido acético em extrato de soja fermentado pelas cepas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. A partir destas observações, pode-se sugerir que as cepas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* utilizadas nesse trabalho não são capazes de produzir ácido acético quando a matriz utilizada é o extrato de soja, pois estas cepas podem ser homoláticas.

Nos fermentados pela cultura ternária (StLbLp) também se observou uma maior produção de ácido láctico pelas amostras submetidas as diferentes condições de resfriamento, sendo 58% no resfriamento único e 27% no resfriamento intermediário em d₁₄, respectivamente. Já a produção de ácido acético foi 55% menor quando comparada com a monocultura (Lp) em d₂₈ no resfriamento intermediário e que o tipo de resfriamento influencia a produção dos ácidos. A partir destes dados, nota-se que *L. paracasei* é o responsável pela produção de ácido acético, tal produção também foi observada por Donkor, et al. (2005) quando fermentaram leite de soja com *L. paracasei*.

A concentração dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) presentes no extrato de soja, está apresentado na Tabela 5. Foi observado um consumo de sacarose 15 vezes mais acentuado nas amostras que sofreram resfriamento intermediário, quando comparadas às amostras submetidas à um resfriamento único.

Tabela 4. Quantificação de ácidos orgânicos (g/L) em extrato de soja fermentado por monocultura de *L. paracasei* (Lp), cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (StLb) e cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (StLbLp) após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C.

Culturas	Tempo (dias)	Resfriamento	Ácido láctico	Ácido acético
Extrato de soja	NF	NF	nd	nd
Lp	d1	RU	4,8 ± 0,16 ^{bc}	0,5 ± 0,06 ^d
		RI	9,6 ± 0,73 ^{fg}	0,8 ± 0,11 ^{ef}
	d14	RU	9,5 ± 0,22 ^{gh}	0,5 ± 0,14 ^d
		RI	15,4 ± 0,40 ⁱ	0,9 ± 0,04 ^{fg}
	d28	RU	10,8 ± 0,00 ^{hi}	0,7 ± 0,03 ^e
		RI	19,7 ± 0,79 ^k	1,0 ± 0,01 ^g
StLb	d1	RU	2,4 ± 0,04 ^a	nd
		RI	6,3 ± 0,23 ^{cde}	nd
	d14	RU	2,7 ± 0,17 ^a	nd
		RI	6,9 ± 0,14 ^{de}	nd
	d28	RU	3,4 ± 0,09 ^{ab}	nd
		RI	7,0 ± 0,10 ^{de}	nd
StLbLp	d1	RU	2,4 ± 0,35 ^a	nd
		RI	7,5 ± 0,49 ^{ef}	0,4 ± 0,01 ^{bc}
	d14	RU	5,7 ± 0,02 ^{cd}	0,2 ± 0,02 ^a
		RI	10,2 ± 0,53 ^{gh}	0,4 ± 0,00 ^{bcd}
	d28	RU	6,0 ± 0,62 ^{cde}	0,3 ± 0,00 ^{ab}
		RI	11,8 ± 0,93 ⁱ	0,4 ± 0,01 ^{cd}

NF: Não fermentado; RU: Resfriamento único; RI: resfriamento intermediário; nd: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística significativa de acordo com o teste Tukey (P < 0,05).

Nas amostras fermentadas pela monocultura (Lp) o consumo de sacarose foi 78,6% maior nas amostras de resfriamento intermediário em d₁. Este fato provavelmente é devido à temperatura intermediária (25°C) em que as amostras foram submetidas, onde as mesmas continuam com os metabolismos ativos mesmo em temperaturas intermediárias (Wang et al, 2005).

Na co-cultura binária (StLb), o consumo de sacarose das amostras de resfriamento único foi 82,6% menor que nas amostras de resfriamento intermediário. Também foi observado que a concentração de sacarose

proveniente das amostras do resfriamento único sofreu um aumento de 3,6 g/L entre d₁₄ e d₂₈ esse fato provavelmente devesse ao fato de o *L. bulgaricus* ter apresentado acentuada morte celular como foi visto no tópico 5.3 e assim, havendo uma baixa no consumo de sacarose.

Assim como observado na monocultura (Lp) e co-cultura (StLb), a co-cultura ternária também apresentou maior consumo (79%) de sacarose nas amostras que sofreram resfriamento intermediário, provavelmente devido as 8 horas que as amostras ficaram a 25°C.

Quanto a glicose e frutose o que se observou foi que as concentrações das mesmas aumentaram cerca de 2,7 g/L e 1,8 g/L respectivamente, na monocultura (Lp) em d₁₄ e d₂₈. Esse aumento de glicose (2,1 g/L) e frutose (0,2 g/L) também foi observado na co-cultura ternária (StLbLp).

Segundo Hou et al. (2000) e Wang et al. (2003) que realizaram estudos com extrato de soja fermentado por BAL, observaram que o aumento nos valores de glicose e frutose deve-se a hidrólise da sacarose, processo químico que libera moléculas de glicose e frutose.

Tabela 5. Quantificação da sacarose, glicose e frutose (g/L) em extrato de soja fermentado por monocultura de *L. paracasei* (Lp), cultura binária de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (StLb) e cultura terciária de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* (StLbLp) após 1 dia (d₁), 14 dias (d₁₄) e 28 dias (d₂₈) de armazenamento a 4°C.

Culturas	Tempo (dias)	Resfriamento	Sacarose	Glicose	Frutose
Extrato de soja	NF	NF	19,6 ± 0,14 ^j	nd	nd
Lp	d1	RU	16,5 ± 0,10 ^h	nd	nd
		RI	3,5 ± 0,70 ^b	2,4 ± 0,30 ^d	nd
	d14	RU	13,4 ± 0,30 ^e	nd	1,1 ± 0,10 ^{bc}
		RI	5,4 ± 0,10 ^c	5,1 ± 0,20 ^f	nd
	d28	RU	13,4 ± 0,30 ^e	1,1 ± 0,20 ^c	2,9 ± 0,50 ^e
		RI	6,2 ± 0,00 ^d	6,3 ± 0,00 ^g	1,7 ± 0,30 ^{cd}
StLb	d1	RU	16,5 ± 0,10 ^h	0,7 ± 0,00 ^b	nd
		RI	0,9 ± 0,00 ^a	nd	nd
	d14	RU	17,9 ± 0,10 ⁱ	nd	nd
		RI	3,1 ± 0,00 ^b	nd	nd
	d28	RU	18,6 ± 0,20 ^k	nd	nd
		RI	3,3 ± 0,00 ^b	nd	nd
StLbLp	d1	RU	14,4 ± 0,20 ^f	nd	nd
		RI	1,0 ± 0,00 ^a	0,4 ± 0,00 ^a	nd
	d14	RU	17,5 ± 0,30 ⁱ	nd	0,7 ± 0,30 ^{ab}
		RI	2,8 ± 0,00 ^b	2,5 ± 0,10 ^d	nd
	d28	RU	15,4 ± 0,30 ^g	nd	1,0 ± 0,10 ^{bc}
		RI	3,2 ± 0,10 ^b	3,6 ± 0,10 ^e	0,6 ± 0,00 ^{ab}

NF: Não fermentado; RU: Resfriamento único; RI: resfriamento intermediário; nd: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística significativa de acordo com o teste Tukey (P < 0,05).

5.7) Implementação de estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

O estresse gastrointestinal foi dividido em 3 fases: gástrica (2h), entérica I (4h) e entérica II (6h). Na Figura 7 se encontra a sobrevivência da monocultura (Lp) no modelo digestivo, o que se pode observar é que do início até o final da fase gástrica (2h) há em média um decréscimo de 2,1 log (UFC/mL) e na fase entérica um decréscimo de 1,7 log (UFC/mL). No entanto, não houve diferença

significativa dentro da fase entérica I e II, assim como nas amostras que sofreram resfriamento único e resfriamento intermediário.

Ao contrário dos resultados apresentados em estudos realizados no intuito de verificar a sobrevivência do *L. paracasei* ao pH ácido e sais biliares (Wang et al., 2010; Urnau et al., 2012; Leite et al., 2015; Tulini et al., 2015), o estresse gastrointestinal conforme foi realizado nesse estudo se mostrou um ensaio mais completo quando comparado com os métodos empregados pelos autores citados acima onde suas análises eram realizadas de forma separada enquanto o modelo utilizado nesse trabalho é realizado de forma contínua.

Figura 7. Sobrevivência de *L. paracasei* em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico *in vitro* (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Já na Figura 8 a o *S. thermophilus* apresenta queda mais acentuada na viabilidade na fase gástrica sendo 3,4 log (UFC/mL) nas amostras que sofreram resfriamento único enquanto ao resfriamento intermediário a queda foi de 2,0 log (UFC/mL). Já na fase entérica I, a queda é de aproximadamente 0,9 log (UFC/mL), em resfriamento único e intermediário. Na fase entérica II não houve diferença significativa entre as contagens. Esses resultados correspondem com os encontrados por Uriot et al, (2016), onde o mesmo selecionou três cepas de *S. thermophilus* retiradas de produtos lácteos e

aplicou um modelo de digestão e observou a sobrevivência de três das cepas selecionadas ao estresse gastrointestinal.

No caso do *L. bulgaricus* Figura 8 b, as amostras que sofreram resfriamento único não apresentaram diferenças significativas, já as amostras que sofreram resfriamento intermediário mostraram diminuição de 2,2 log (UFC/mL) na fase gástrica e mantendo-se estável na fase entérica I. Pode-se observar que *L. bulgaricus* possui grande sensibilidade a fase entérica II, independentemente das diferenças inerentes ao tipo de resfriamento sofrido após fermentação. O mesmo comportamento foi observado por Hou et al. (2003), que utilizou Lb proveniente de fermentação em leite e depois testou sua resistência ao pH 2 e aos sais biliares. O autor obteve células viáveis somente até 4 horas após o início do ensaio.

A Figura 9 refere-se aos extratos de soja fermentados por co-cultura terciária (StLbLp). *S. thermophilus* (Figura 9 a) submetido a resfriamento intermediário, apresentou diminuição de 3,9 log (UFC/mL) e 3,3 log (UFC/mL) no resfriamento único após a fase gástrica mantendo-se estável até o final da fase entérica II. Quando comparado com a co-cultura binária (StLb) as contagens de St das amostras fermentadas por StLbLp foram 15% maiores.

Na Figura 9 b pode-se observar que não houve diferenças entre as condições de resfriamento, a queda na fase gástrica teve média 3,6 log (UFC/mL) e na fase entérica foi de em média 1 log (UFC/mL). Semelhante ao observado na Figura 8 b o *L. bulgaricus* não se apresentou viável na fase entérica II.

L. paracasei (Figura 9 c) também não apresentou diferenças entre os tipos de resfriamento, apresentando queda de 3,9 log (UFC/mL) na fase gástrica e mantendo-se estável nas fases entéricas I e II. No entanto, o mesmo apresentou contagens 10,0% menores quando comparadas a monocultura Lp (Figura 7) na fase entérica II.

a)

b)

Figura 8. Sobrevivência do *S. thermophilus* (a) e *L. bulgaricus* (b) em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico in vitro (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. O período em que há ausência de colunas significa que as contagens foram inferiores à 100 UFC/mL. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

a)

b)

c)

Figura 9. Sobrevivência do *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. paracasei* (c) em fermentado de extrato de soja após 28 dias de armazenamento a 4°C, antes (0h) e durante o estresse gástrico in vitro (2h) e entérico (4 e 6h). A coluna (■) refere-se às amostras que sofreram resfriamento único e a (▒) refere-se às amostras que sofreram resfriamento intermediário (25°C), seguido de armazenamento à 4°C. O período em que há ausência de colunas significa que as contagens foram inferiores à 100 UFC/mL. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Apesar da diminuição na viabilidade das bactérias durante o estresse gastrointestinal *in vitro*, pode-se observar de maneira geral que o emprego do resfriamento intermediário não influenciou significativamente na sobrevivência das bactérias. Apesar de não serem os mesmos micro-organismos empregados na fermentação os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos obtidos por Bedani et al. (2013) que relatou em média 4 log (UFC/mL) na fase entérica II para *L. acidophilus* ao fim de 28 dias de armazenamento refrigerado em um produto fermentado a base de soja.

Com os resultados positivos da sobrevivência do *S. thermophilus* e *L. paracasei* em d₂₈, pode-se afirmar que essas bactérias chegariam no trato gastrointestinal para exercer seus efeitos e que sobrevivendo a esse estresse gastrointestinal o *S. thermophilus* poderia ser considerado uma bactéria probiótica.

6) Conclusões

O uso das co-cultura binárias *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* auxilia na diminuição do tempo de fermentação, melhorando assim quando associada com a cepa *L. paracasei*, onde se observou uma redução de 5,6 horas na fermentação.

A pós acidificação das amostras que passaram pelo resfriamento intermediário apresentaram queda de 0,4 unidades de pH no dia 1 de análise quando comparadas com a queda de 0,3 unidades de pH das amostras que sofreram resfriamento único, e indiferentemente do tipo de resfriamento sofrido houve queda dos valores de pH durante os 28 dias de armazenamento.

O resfriamento intermediário das amostras independentemente das culturas utilizadas mostrou influência positiva na viabilidade das bactérias, pois proporcionaram um valor de contagem microbiológica de 10⁹ UFC/mL na bactéria probiótica *L. paracasei*, mesmo após 28 dias de armazenamento a 4°C, essa quantidade de bactéria viável se encontra dentro da dose recomendada pela ANVISA.

O emprego da fase de adaptação intermediária com o resfriamento a 25°C durante 8h promoveu o aumento de 14,5% nos teores relativos de ácido

linoleico (C 18:2 n-6) e de 45,1% na produção de ácido láctico. No entanto, nenhuma influência do resfriamento intermediário foi observada na sobrevivência das bactérias ao estresse gastrointestinal *in vitro*, sendo que tanto o *S. thermophilus* como *L. paracasei* atiniram contagens entre 4,5 e 5,6 logs de UFC/mL ao final das seis horas do estresse gastrointestinal *in vitro*.

Perspectivas

Produtos à base de soja apresentam-se como um novo nicho no mercado alimentício, pois além da busca por produtos funcionais há o aumento de casos de intolerância e alergia a proteína do leite. A procura por esse tipo de produto associado aos benefícios das bactérias probióticas, faz com o fermentado elaborado nesse trabalho possa servir de base para fabricação de um produto funcional. Porém, algumas mudanças e ensaios deveriam ser feitos, tais como:

- Estabelecer novas condições de fermentação para reduzir a pós acidificação, possivelmente interrompendo a fermentação em pH 4,7;
- Analisar textura e produção de exopolissacarídeos;
- Adicionar edulcorante e flavorizante;
- Promover análise sensorial;
- Realizar estudos *in vivo* a fim de avaliar os benefícios da soja e do probiótico na saúde do hospedeiro.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto, 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acessado em: 05 de fev. 2015.

ALJEWICZ, M; SIEMIANOWSKA, E; CICHOSZ, G; TONSKA, E; The effect of probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, and *Lactobacillus acidophilus* NCFM) on the availability of minerals from Dutch-type cheese. **J. Dairy Sci**, v. 97 p. 4824-4831, 2014.

ALJEWICZ, M; CICHOSZ, G. Protective effects of *Lactobacillus* cultures in Dutch-type cheese-like products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63 p. 52-56, 2015.

AMERICAN OIL CHEMISTRY SOCIETY. Official method Ce 1e62: Fatty acid composition by gas chromatography. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, IL, USA: American Oil Chemists' Society, 1997.

AMORES, R; et al. Probióticos. **Revista espanhola de Quimioterapia**. V. 17, n. 2, p. 131-139, 2004.

ANTONIASSI, R; FELBERG, I; FARAH, A; DONANGELO, C. M. Extrato de soja em pó: estabilidade dos ácidos graxos durante armazenamento. **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 194/195, p. 475-477, 2011.

ARON, N, M; GEORGESCU, C; TUTUNARU, D. Profiling of different bioactive compounds in soy milk-sea buckthorn beverage. **Revista de Chimie**, v. 65, n. 8, p. 952-955, 2014.

BADEL, S; BERNARDI, T; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 54–66, 2011.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que

Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BEAL, C; FONSECA, F; CORRIEU, G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 2347–2356, 2001.

BEDANI, R; ROSSI, E. A; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, p. 382-389, 2013.

BLEIGH, E. G; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiological**, v. 37, p. 911 917, 1959.

COMPARE, D; ROCCO, A; SGAMATO, C; COCCOLI, P; CAMPO, S. M. A; NAZIONALE, I; LARUSSA, T; LUZZA, F; CHIODINI, P; NARDONE, G. *Lactobacillus paracasei* F19 versus placebo for the prevention of protonpump inhibitor-induced bowel symptoms: A randomized clinical trial. **Digestive and Liver Disease**, v. 47, p. 273–279, 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, décimo segundo levantamento, setembro de 2016, safra 2015/16, v.3, n. 12. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_bol_etim_12_setembro.pdf. Acessado em: 21/09/2016.

COPPOLA, M N; TURNES, C G; Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v, 34, n.4, p. 1297-1303, 2004. ISSN 0103-8478.

CHANG, C. T; TSAI, T. Y. Antimelanogenic effects of the novel melanogenic inhibitors daidzein and equol, derived from soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* strain TWK10, in B16F0 mouse melanoma cells. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 211–223, 2016.

CHIANG, S-S; LIAO, J-W; PAN, T-M. Effect of bioactive compounds in lactobacilli-fermented soy skim milk on femoral bone microstructure of aging mice. **J Sci Food Agric**, v. 92, p. 328–335, 2012 a.

CHIANG, S-S; PAN, T-Z. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp.paracasei NTU 101 and its fermented products. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 903-916, 2012 b.

CHIANG, S-S; PAN, T-Z. Beneficial effects of phytoestrogens and their metabolites produced by intestinal microflora on bone health. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 1489–1500, 2013.

CHOU, C.; HOU, J. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 113-121. 2000.

CORRIEU, G.; SPINNLER, H. E.; JOMIER, J.; PICQUE, D. **Method of revealing and monitoring the acidifying of fermentation agents in fermentation vats and device for implementing it.** FR Pat. 2,629,612 10 jun. 1989. 27p.

CSÁKI, I; FEKETE, F. Soybean: feed quality and safety. Part 1: biologically active components a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 3, p. 299–313, 2004.

DANISCO. ***Lactobacillus paracasei* LPC-37**. Brabrand: Danisco, 2007. (Technical Memorandum, 56-le). Disponível em: http://www.probion.eu/files/2012/01/TM_Lpc-37_June20101.pdf. Acessado em: 04 de fev. 2015.

da SILVA, B. V; BARREIRA, J. C. M; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 144-158, 2016.

de ANGELIS, R C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidade degenerativas.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

de OLIVEIRA, C. P; de SIQUEIRA JÚNIOR, J. P; da SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p. 09-15, 2012.

de PRISCO, A; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27-39, 2016.

de VRESE M; SCHREZENMEIR J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Adv Biochem Eng Biotechnol** v.111, p. 1–66, 2008.

DAWOOD, M. A. O; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243–251, 2016.

DONKOR, O. N; HENRIKSSON, A; VASILJEVIC, T; SHAH, N. P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 8, p. M375-M381, 2005.

DONKOR, O N; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC T; SHAH N P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181–1189, 2006.

DONKOR O N; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC T; SHAH N P. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chem.**, v. 104, p. 10–20, 2007 a

DONKOR, O N; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC T; SHAH N P. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 9868-9876, 2007 b.

ERDMANN, K; CHEUNG, B, W, Y; Belinda W.Y; SCHRÖDER, C, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 643-654, 2008.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London: FAO/WHO, 2002.

FERREIRA, C L L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção.** Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

FLORENCE A C R; OLIVEIRA R P S; SILVA R C; SOARES F A S M; GIOIELLI L A; OLIVEIRA M N. Organic milk improves *Bifidobacteriumlactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. **LWT - Food Sci Technol.**, v. 49, p. 89-95, 2012 a.

FLORENCE A C R; BÉAL C; SILVA R C; BOGSAN C S B; PILLEGGI A L O S; GIOIELLI L A; OLIVEIRA M N. Fatty acid profile, *trans*-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. **Food Chem.**, v. 135, n. 4, p. 2207–2214, 2012 b.

FLORENCE, A. C R. Respostas fisiológicas de bifidobactérias submetidas aos estresses ácido, frio e gastrointestinal em leite orgânico e convencional [tese]. São Paulo: **Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2013. 203 p.

FLORENCE A C R; BEAL C; SILVA R C; OLIVEIRA M N. Survival of three *Bifidobacteriumanimalis* subsp. *lactis* strains is relatedto *trans*-vaccenic and α -linolenic acids contents in organic fermentedmilks. **LWT - FoodSciTechnol.**, v, 56, p. 290-295, 2014.

FLORENCE A C R; OLIVEIRA, M. N; DELILE, A; BÉAL, C. Survival of *Bifidobacterium* strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fatty acid composition. **International Dairy Journal**, v, 61, p. 1-9, 2016.

FORSSTEN, S D; SALAZAR, N; LÓPEZ, P; NIKKILÄ, J; OUWEHAND, A. C; PATTERSON, A; RUAS-MADIEDO, P; SUAREZ, A; GONZALEZ, S; GUEIMONDE, M. Influence of a probiotic milk drink, containing *Lactobacillus Paracasei* Lpc-37, on immune function and gut microbiota in elderly subjects. **European Journal of Food Research & Review**, v. 1, n.3, p. 159-172, 2011.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

FUCHS, R H B; BORSATO, D; BONA, E; HAULY, M C de O. "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 1, p. 175-181, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

GILLOR, O; NIGRO, L. M; RILEY, M. A; Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1067-1075, 2005.

GIRAFFA, G; CHANISHVILI, N; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487, 2010.

GOVENDER, M; CHOONARA, Y. E; KUMAR, P; du TOIT, L. C; van VUUREN, S; PILLAY, V. A review of the advancements in probiotic delivery: conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 15, n. 1, p. 29-43, 2014.

GRANATO, D; BRANCO, G. F; NAZZARO, F; CRUZ, A. G; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010.

HAULY, M C de O; FUCHS, R H B; PRUDENCIO-FERREIRA, S H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.

HASLER, C. M. Functional foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. **Food Technology**, v. 52, p. 63-68, 1998.

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

HOU, R. C. W; LIN, M. Y; WANG, M. M. C; TZEN, J. T. C. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 424-428, 2003.

HSU, Y. M; YU, B; TSENG, C. S; CHANG, C. H; CHEN, D. S; SU, C. H; CHEN, Y. S. Preventive activities of *Scutellariae radix*, *Gardeniae fructus*, and probiotics in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 121-129, 2016.

HYMOWITZ, T.; COLLINS, F. I.; PANCZNER, J.; WALKER, W. M. Relationship between the content of oil, protein and sugars in soybeans seed. **Agronomy Journal**, Madison, v. 64, n. 2, p. 613-616, 1972.

INAMINE, A; SAKURAI, D; HORIGUCHI, S; YONEKURA, S; HANAZAWA, T; HOSOKAWA, H; MATUURA-SUZUKI, A; NAKAYAMA, T; OKAMOTO, Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. **Clinical Immunology**, v. 143, p. 170-179, 2012.

KOMATSU, T R; BURITI, F C A; SAAD, S M I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

KRISTO, E; BILIADERIS, C. G; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v. 13 p. 517–528, 2003.

KUDA, T; KATAOKA, M; NEMOTO, M; KAWAHARA, M; TAKAHASHI, H; KIMURA, B. Isolation of lactic acid bacteria from plants of the coastal Satoumi regions for use as starter cultures in fermented milk and soymilk production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 202-207, 2016.

LARKIN, T. A; ASTHEIMER, L. B; PRICE, W. E. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 238–245, 2009.

LAZARIDOU, A; SERAFEIMIDOU, A; BILIADERIS C G; MOSCHAKIS, T; TZANETAKIS, N. Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat β -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 204-214, 2014.

LEITE, A. M. O; MIGUEL, M. A. L; PEIXOTO, R. S; RUAS-MADIEDO, P; PASCHOALIN, V. M. F; MAYO, B; DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3622-3632, 2015.

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

LIN, W-Y; FU, L-S; LIN, H-K; SHEN, C-Y; CHEN, Y-J. Evaluation of the effect of *Lactobacillus paracasei* (HF.A00232) in children (6-13 years old) with perennial allergic rhinitis: a 12-week, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Pediatrics and Neonatology**, v. 55, p. 181-188, 2014.

LIN, X; CHEN, X; CHEN, Y; JIANG, W; CHEN, H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Oral Diseases**, v. 21, p. e128–e134, 2015.

MARAZZA, J. A; NAZARENO, M. A; de GIORI, G. S; GARRO, M. S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilkby fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Functional Foods**, v.4, p. 594-601, 2012.

MARAZZA, J. A; LEBLANC, J. G; de GIORI, G. S; GARRO, M. S. Soymilk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 ameliorates hyperglycemia, lipid profiles and increases antioxidant enzyme activities in diabetic mice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1848–1853, 2013.

MARTIN, C. A; de ALMEIDA, V. V; RUIZ, M. R; VISENTAINER, J. E. L; MATSHUSHITA, M; de SOUZA, N. E; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos

poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MASUDA, R. Quality requirement and improvement of vegetable soybean. In: SHANMUNGASUNDARAM, S. Vegetable soybean: research needs for production and quality improvement. WORKSHOP HELD AT KENTING. **Proceedings...** Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, p. 92-102, 1991.

MASUDA, R. The strategy for sweetness increase of vegetable soybeans: maltose, another sugar in boiled seeds. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3, 2004, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soybean, p. 839-844, 2004.

MEHTA, B, M; KAMAL-ELDIN, A; IWANSKI, R, Z. **Fermentation: effects on food properties**. Florida: Editora CRC Press, 2012.

MITSUOKA, T. Development of Functional Foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, n. 3, p. 117–128, 2014.

MORAES, F. P; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORAIS, A A; SILVA, A L. **A soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. 259 p.

MURGA, M. L. F; CABRERA, G. M; de VALDEZ, G. F; DISALVO, A; SELDES, A. M. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 342–348, 2000.

NOCERINO, R; PAPARO, L; TERRIN, G; PEZZELLA, V; AMOROSO, A; COSENZA, L; CECERE, G; de MARCO, G; MICILLO, M; ALBANO, F; NUGNES, R; FERRI, P; CICCARELLI, G; GIACCIO, G; SPADARO, R; MADDALENA, Y; CANANI, F. B; CANANI, R. B. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, p. 1-8, 2015.

OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 57–62, 2010.

OLIVEIRA, M N; et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo Probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.1, 2002.

OLIVEIRA, M A; CARRÃO-PANIZZI, M. C; MANDARINO, J. M. G; LEITE, R. S; CAMPOS FILHO, P. J; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/ cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. **Braz. J. Food Technol**, v. 13, n. 1, p. 23-29, 2010.

OLIVEIRA, R, P, S; TORRES, B, R; PEREGO, P; OLIVEIRA, M, N; CONVERTI, A. Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-

culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 62–69, 2012.

OLNOOD, C. G; BESKI, S. S. M; CHOCT, M; IJI, P. A. Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. **Animal Nutrition**, v. 1, p. 184–191, 2015.

PAINEAU, D; CARCANO, D; LEYER, G; DARQUY, S; ALYANAKIAN, M-A; SIMONEAU, G; BERGMANN, J-F; BRASSART, D; BORNET, F; OUWEHAND, A. C; Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. **Federation of European Microbiological Societies**. 2008.

PEÑALVO, J. L; CASTILHO, M. C; SILVEIRA, M. I. N; MATAALLANA, M. C; TORIJA, M. E. Fatty acid profile of traditional soymilk. **Eur Food Res Technol**, v. 219, p. 251–253, 2004.

PENG, X; GUO, S. Texture characteristics of soymilk gels formed by lactic fermentation: A comparison of soymilk prepared by blanching soybeans under different temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 58-65, 2015.

PENHA, L A O; FONSECA, I C B; MANDARINO, J M; BENASSI, V T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do Centro de Processamento de Alimentos**, v. 25, n.1, p. 91-102, 2007.

PEREIRA, M O; BAMPI, M; RODRIGUES, F T; SANTA, O R D; SANTA, H S D; RIGO, M. Elaboração de uma bebida probiótica fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de frutas. **Ambiência**, v.5, n.3, p. 475-487, 2009. ISSN 1808 – 0251

PERINI, J. A. L; STEVANATO, F. B; SARGI, S. C; VISENTAINER, J. E. L; DALALIO, M. M. O; MATSHUSHITA, M; de SOUZA, N. E; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PHADTARE, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 6, p. 125-136, 2004.

RAMCHANDRAN, L; SHAH, N. P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 819–827, 2010.

ROESSLER, A; FRIEDRICH, U; VOGELSANG, H; BAUER, A; KAATZ, M; HIPLER, U. C; SCHMIDT, I; JAHREIS, G. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 39-102, 2007.

ROSA, A M; CLAVISO, J; PASSOS, L M L; AGUIAR, C L. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 454-462, 2009.

ROSS, R P; MORGAN, S; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

SAAD, S M I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, 2006.

SAAD, S M I; CRUZ, A G; FARIA, J A F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

SAH, B. N. P; VASILJEVIC, T; MCKECHNIE, S; DONKOR, O. N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**, v. 156, p. 264–270, 2014.

SARTORI, T C F de T; BRAZACA, S G C; SANTOS, M A T S; ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama na qualidade nutricional de grãos de soja *Glycine max* (L.). **Boletim do Centro de Processamento de Alimentos**, v. 32, n.2, p. 319-332, 2014.

SIEGUMFELDT, H; RECHINGER, K. B; JAKOBSEN, M. Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures. **Microbiology**, v. 145, p. 1703-1709, 1999.

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

STEFANOVIC, E; FITZGERALD, G; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33-49, 2017.

SUN, Z; HARRIS, H. M. B; MCCANN, A; GUO, C; ARGIMÓN, S; ZHANG, W; YANG, X; JEFFERY, I. B; COONEY, J. C; KAGAWA, T. F; LIU, W; SONG, Y; SALVETTI, E; WROBEL, A; RASINKANGAS, P; PARKHILL, J; REA, M. C; O'SULLIVAN, O; RITARI, J; DOUILLARD, F. P; ROSS, R. P; YANG, R; BRINER, A. E; FELIS, G, E; de VOS, W. M; BARRANGOU, R; KLAENHAMMER, T. D; CAUFIELD, P. W; CUI, Y; ZHANG, H; O'TOOLE, P. W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, p. 1-13, 2015.

TAMINE, A. Y; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology** 2 ed. Cambridge. Editora: Woodhead publishing Ltda, 1999.

TANG, A L; SHAH, N P; WILCOX G; WALKER, K Z; STOJANOVSKA L. Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids. **Journal of food Science**, v. 72, n. 9, p. M431-M436, 2007.

THAMER, K G; PENNA, A L B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23 n. 6, p. 589-595, 2006.

TORO-FUNES, N; BOSCH-FUSTÉ, J; VECIANA-NOGUÉS, M, T; VIDAL-CAROU, M, C. Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk. **Food Chemistry**, v. 152, p. 597–602, 2014.

TSAI, Y-T; CHENG, P-C; FAN, C-K; PAN, T-Z. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 219-225, 2008.

TULINI, F. L; HYMERYB, N; CHOISSET, Y; CHOBERT, J-M; HAERTLÉ, T; de MARTINIS, E. C. P; Le BLAY, G. Milk fermented with the probiotic candidate *Lactobacillus paracasei* FT700 induces differentiation of monocytes toward macrophages in vitro. **Journal of Functional Foods**, v.15, p. 533–540, 2015.

URIOT, O; GALIA, W; AWUSSI, A. A. PERRIN, C. DENIS, S; CHALANCON, S; LORSON, E; POIRSON, C; JUNJUA, M; Le ROUX, Y; ALRIC, M; DARY, A. BLANQUET-DIOT, S; ROUSSEL, Y. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. **Food Microbiology**, v. 53, p. 18-29, 2016.

URNAU, D; CIROLINI, A; TERRA, N. N; CAVALHEIRO, C. P; MILANI, L. I. G; FRIES, L. L. M. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v.67, n. 384, p. 5-10, 2012.

VANDENPLAS, Y; HUYS, G; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 6-21, 2015.

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.

WANG, W; de MEIJA, E, G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 63-78, 2005.

WANG, Y; DELETTRE, J; GUILLOT, A; CORRIEU, G; BÉAL, C. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Cryobiology**, v. 50, p. 294–307, 2005.

WANG, C-Y; LIN, P-R; NG, C-C; SHYU, Y-T. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. **Anaerobe**, v. 16, p. 578-585, 2010.

WOUTERS, J. A; ROMBOUTS, F. M; de VOS, W. M; KUIPERS, O. P; ABEE, T. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4436–4442, 1999.

WOUTERS, J. A; MAILHES, M; ROMBOUTS, F. M; de VOS, W. M; KUIPERS, O. P; ABEE, T. Physiological and regulatory effects of controlled overproduction

of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3756–3763, 2000.

YONAMINE, G. H; CASTRO, A. P. M; PASTORINO, A. C; JACOB, C. M. A. Uso de fórmulas à base de soja na alergia à proteína do leite de vaca. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 34, n. 5, p. 187-192, 2011.

ZANGELMI, A. B. C.; TAGLIOLATTO, M. A.; DIAS, E. L.; LANGE, D. A. Produtos de soja, leite, farinha e outros: Série Tecnologia Agroindustrial. **São Paulo: Governo do Estado de São Paulo**. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, p 97-132, 1982.

ZAVAGLIA, A. G; DISALVO, E. A; de ANTONI, G. L. Fatty acid composition and freeze–thaw resistance in lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 241-247, 2000.

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. **Le lait**, v. 72, p. 1-34, 1992.