

# Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade

## *Soy milk yogurt supplemented with fructooligosaccharides: probiotic properties and acceptance*

Maria Célia de Oliveira HAULY<sup>1</sup>

Renata Hernandez Barros FUCHS<sup>2</sup>

Sandra Helena PRUDENCIO-FERREIRA<sup>3</sup>

### RESUMO

#### Objetivo

Foram avaliadas as características probióticas dos microorganismos utilizados no preparo de iogurte de soja suplementado com os prebióticos oligofrutose e inulina (frutooligossacarídeos), suas características físico-químicas, microbiológicas e índice de aceitação.

#### Métodos

A formulação contendo extrato de soja em pó, oligofrutose e inulina, obtida por fermentação durante seis horas, em estufa mantida à temperatura de 42°C, foi caracterizada e comparada a uma formulação de iogurte de soja sem suplementação quanto à viscosidade, perfil de textura e características probióticas.

#### Resultados

O fermento misto utilizado no preparo do iogurte (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) apresentou resistência à bile e ao ácido. Os prebióticos mantiveram a viabilidade das bactérias lácticas até o 28º dia de armazenamento, em nível superior ao necessário para caracterizar um alimento probiótico. O iogurte suplementado apresentou pH de 4,63 e acidez de 0,37%, maior viscosidade, coesividade e adesividade e menor dureza que o iogurte sem suplementação. O índice de aceitação do iogurte de soja suplementado com prebióticos foi de 71,20%.

#### Conclusão

*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são probióticos e frutooligossacarídeos são ingredientes que mantêm a viabilidade das bactérias lácticas no iogurte de soja, propiciando a formulação de um produto com boa aceitabilidade.

**Termos de indexação:** inulina, iogurte, oligossacarídeos, probióticos, soja.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, 86051-970, Londrina, PR, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: M.C.O. HAULY. E-mail: <hauly@sercomtel.com.br>.

<sup>2</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Unidade de Campo Mourão. Rod. BR 369 km 0,5, 87301-005, Campo Mourão, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia em Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, Brasil.

## ABSTRACT

### Objective

The probiotic characteristics of the microorganisms (*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) used to produce soy yogurt supplemented with prebiotic fructooligosaccharides were evaluated and also the physicochemical and microbiological characteristics and acceptance of the product.

### Methods

The formulation containing powdered soy extract, supplemented with fructooligosaccharides (oligofructose and inulin), was fermented for 6 hours (42°C) and then characterized and compared to a soy yogurt formulation made without supplementation.

### Results

The starter used to prepare the yogurts (*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) showed resistance to bile and to acid. The prebiotics maintained the viability of the lactic acid bacteria at levels higher than necessary to characterize the product as a probiotic food, up to the 28th day of storage. The final pH value of the supplemented yogurt was 4.63, the acidity 0.37% and the acceptance 71.20%. The supplemented yogurt showed greater viscosity, cohesiveness and adhesiveness than the non-supplemented product and was less hard.

### Conclusion

*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* are probiotics and fructooligosaccharides are ingredients that maintain the viability of lactic acid bacteria in soy yogurt, giving rise to a product with good acceptability.

**Indexing terms:** inulin, yogurt, oligosaccharides, probiotics, soy.

## INTRODUÇÃO

A preocupação com relação à alimentação vem mudando muito nas últimas décadas. A nutrição continua desempenhando seu papel de fornecimento de nutrientes, mas o conceito de alimentos funcionais faz com que essa ciência se associe à medicina e ganhe dimensão extra no século XXI<sup>1</sup>.

A soja, além de importante fonte protéica, possui fibras, isoflavonas, oligossacarídeos com potencial prebiótico, como rafinose e estaquiose, vitaminas e minerais. Entretanto, seu maior problema é o sabor adstringente<sup>2</sup>.

A fermentação láctica é responsável pela formação de acetaldeído e de diacetil, que conferem características sensoriais agradáveis. Por esse motivo, o extrato de soja vem sendo utilizado para o preparo de iogurtes, melhorando sua aceitabilidade<sup>3,4</sup>.

Probióticos são definidos como microorganismos viáveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por promoverem balanço da

flora microbiana intestinal, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as espécies mais utilizadas como probióticos<sup>5</sup>.

Segundo Gibson & Fuller<sup>6</sup>, para um microorganismo probiótico garantir efetividade, várias condições devem ser atendidas: não apresentar variação genética; ser estável; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e a sais biliares; ter capacidade de proliferação, afinidade e sobrevivência no intestino; produzir metabólitos; fazer a modulação da atividade metabólica; a imunomodulação, além de ser seguro ou *Generally Regarded as Safe* (GRAS).

Para receber a nomenclatura de "alimento probiótico", os leites fermentados e iogurtes devem conter, no mínimo, 10<sup>7</sup> células viáveis por grama ou mL do produto. Por outro lado, a dose terapêutica mínima exigida é de 10<sup>5</sup> células viáveis por grama ou mL do produto<sup>7</sup>.

Vários estudos têm demonstrado a contribuição dos prebióticos no aumento da viabilidade dos microorganismos presentes no

cólon<sup>8</sup>. Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis, que estimulam a atividade bifidogênica, ou seja, o crescimento e/ou ação de algumas bactérias presentes no intestino<sup>9</sup>. Os prebióticos abrangem as frutanas, que incluem a inulina natural, inulina hidrolisada enzimaticamente ou oligofrutose e frutooligossacarídeos sintéticos, além de galactoligossacarídeos, lactulose, isomaltoligossacarídeo, xiloligossacarídeos, gentioligossacarídeos<sup>6</sup>.

Os simbióticos proporcionam a ação conjunta de prebióticos e probióticos, podendo ser classificados como componentes dietéticos funcionais que podem aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato digestório superior, pelo fato de seu substrato específico estar disponível para fermentação<sup>9</sup>.

O extrato de soja, assim como o leite de vaca, é adequado para o crescimento de bactérias lácticas. Os oligossacarídeos (rafinose e estaquiase), aminoácidos e peptídeos presentes na soja estimulam crescimento microbiano. Segundo Shimakawa et al.<sup>10</sup> o extrato de soja é um excelente veículo para bifidobactérias, já que sua proteína protege o microorganismo da ação de sais biliares, favorecendo a colonização intestinal.

Diante da procura dos consumidores por alimentos saudáveis e dos potenciais efeitos benéficos da soja, dos prebióticos e dos probióticos, este trabalho teve como objetivos avaliar as características probióticas (viabilidade celular, resistência à bile e tolerância ao ácido) dos microorganismos utilizados na elaboração de iogurte de soja suplementado com oligofrutose e inulina e determinar o índice de aceitação, composição química, viscosidade e perfil de textura do iogurte.

## MÉTODOS

O fermento lácteo Rich<sup>®</sup>, constituído de culturas superconcentradas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, foi fornecido pela empresa Christian Hansen, localizada em Valinhos, SP.

Olvebra Industrial S.A, localizada na Estrada Federal BR-116 km 287 Eldorado do Sul, RS, cedeu o extrato de soja em pó provesol PSA utilizado para o preparo do iogurte de soja. O extrato era constituído de 19g de carboidratos; 44g de proteínas; 26g de gorduras totais, sendo 5g de gorduras saturadas; 1g de fibras; 6g de cinzas, sendo 40mg de sódio, 157mg de cálcio e 4,5mg de ferro e 4% de umidade, sendo o valor calórico de 490kcal.

Os prebióticos oligofrutose (Raftilose P95) e inulina (Raftiline GR), da marca ORAFIT -Bélgica, foram empregados na suplementação do iogurte.

A formulação do iogurte foi preparada com extrato de soja em pó, 10,00% (m/v), suplementado com oligofrutose e inulina nas respectivas concentrações de 14,24% e 4,43% (m/v), as quais foram previamente definidas, juntamente com o tempo de fermentação, por meio do delineamento fatorial 3<sup>3</sup> incompleto<sup>11</sup>.

Para preparação do substrato para o iogurte, o extrato de soja e os prebióticos (oligofrutose e inulina) foram homogeneizados com água, em liquidificador, por cinco minutos, e distribuídos em recipientes de vidro, que foram tampados e submetidos a tratamento térmico, em autoclave, sob vapor fluente, durante vinte minutos. Em seguida, o substrato foi resfriado até 42°C para desenvolvimento da fermentação láctica. Foi utilizado inóculo de 0,16% de fermento lácteo (9 log UFC. mL<sup>-1</sup>). Os recipientes permaneceram em estufa (42°C) durante seis horas para fermentação.

O pH final do iogurte foi determinado através de potenciômetro digital (Microprocessador pHmeter HI 9321) previamente calibrado, sendo a acidez titulável determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N, conforme *Association of Official Analytical Chemest*<sup>12</sup>, técnica nº 970.124 e expressa em porcentagem de ácido láctico.

O iogurte de soja foi caracterizado quimicamente quanto ao teor de: proteínas, pelo método micro Kjeldahl; lipídeos pelo método de Soxhlet; umidade, pelo método de secagem a

vácuo; cinzas, pelo método de cinzas secas e carboidratos totais, estimados por diferença. Os minerais cálcio, ferro e sódio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica<sup>12</sup>.

A viscosidade das amostras (600mL) dos iogurtes, com e sem suplementação, foi realizada nas amostras homogeneizadas, acondicionadas em béquer e cobertas por filme plástico. Após doze horas sob refrigeração, foram submetidas à análise de viscosidade, em viscosímetro *Brookfield* modelo RVT, a 4°C, utilizando *spindle* 5 e velocidade de 2,5 rpm. Os resultados foram expressos em centipoise (cP).

Para análise do perfil de textura (TPA), as amostras de iogurte (com e sem suplementação com prebióticos) foram preparadas em recipientes de polietileno, com diâmetro de 30mm e altura de 45mm e, após o término da fermentação, os recipientes foram armazenados sob refrigeração a 4°C. Após 24 horas, as amostras foram submetidas à análise do perfil de textura, em texturômetro TA-TX2i (*Stable Micro Systems*), utilizando-se probe cilíndrico de acrílico de diâmetro de 1,2cm (P 0,5), força de 0,98N, velocidade de penetração do probe de 2mm/s, distância de penetração de 3mm.

A partir do perfil de textura foram avaliados os parâmetros de dureza (N), coesividade (adimensional), elasticidade (adimensional), adesividade (Ns) e gomosidade (N), fornecidos pelo *software* XTRAD acoplado ao texturômetro<sup>13</sup>.

A resistência dos microorganismos ao ácido foi testada de acordo com a metodologia sugerida por Clark et al., em 1993, citado por Rönkä et al.<sup>14</sup>, modificada em relação à ativação dos microorganismos e à avaliação da viabilidade celular. O fermento lácteo foi ativado por três vezes consecutivas, a cada 24 horas, em leite em pó desengordurado, reconstituído a 10% (m/v) em água, permanecendo em estufa (42°C). A seguir foram feitos três repiques em caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS)<sup>15</sup>, com pH 6,1-6,2. Após a ativação, adicionou-se HCl 2N aos tubos com caldo MRS até que se obtivessem valores de pH de 2 e 4 (a quantidade de ácido adicionado foi previamente

determinada). A escolha dos valores de pH 2,0 e 4,0 para testar a tolerância dos microorganismos ao ácido foi feita considerando-se que o pH do suco gástrico é de aproximadamente 2 e que no interior do estômago, quando na presença de alimento, esse valor não ultrapassa o pH 4. Ao controle não foi adicionado ácido. Os tubos permaneceram em estufa (42°C), por um período total de três horas, avaliando-se a viabilidade celular nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após a adição de ácido.

A resistência dos microorganismos à bile foi testada segundo metodologia sugerida por Gilliland et al., em 1984, citado por Rönkä et al.<sup>14</sup>, alterada em relação à ativação dos microorganismos e à avaliação da viabilidade celular. Adicionou-se 0,3% (m/v) de bile bovina liofilizada ao tubo contendo fermento ativado. Um controle sem adição de bile foi submetido às mesmas condições. Os tubos permaneceram em estufa por quatro horas, avaliando-se a viabilidade celular nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a adição de bile.

A viabilidade celular foi determinada por meio da técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se o meio de ágar Rogosa<sup>16</sup>. As placas foram incubadas a 42°C, durante 48 horas. As colônias foram contadas e os resultados expressos em log UFC. mL<sup>-1</sup>.

O iogurte foi armazenado por um período de 28 dias (4°C), sendo que a viabilidade das bactérias lácticas, o pH e a acidez foram determinados nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após o término da fermentação, como sugerido por Rönkä et al.<sup>14</sup>. Um controle (iogurte sem suplementação) foi analisado nos mesmos dias.

Pesquisa de bolores e leveduras, coliformes totais e fecais e contagem padrão em placas foram realizadas no iogurte de soja, após 28 dias de armazenamento, de acordo com legislação específica<sup>17</sup>.

A aceitabilidade do iogurte de soja suplementado com prebióticos e adicionado de aroma artificial de pêssego foi avaliada utilizando-se

escala hedônica estruturada de 9 pontos (9= gostei muitíssimo; 1= desgostei muitíssimo)<sup>18</sup>. Participaram da análise sensorial provadores não treinados que receberam amostra de iogurte refrigerada, codificada com três dígitos e ficha para avaliação do produto.

O teste foi realizado em cabines individuais do laboratório de análise sensorial, requisitando-se aos provadores que enxaguassem a boca com água potável em temperatura ambiente, antes de provarem a amostra.

A análise estatística foi feita submetendo-se os resultados à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O índice de aceitação do iogurte otimizado foi calculado de acordo com Monteiro<sup>19</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O iogurte de soja suplementado apresentou valor de pH final de 4,63 e acidez titulável de 0,37%. Esse produto apresentou 16,20% de carboidratos, 2,01% de lipídeos, 3,54% de proteínas, 0,40% de cinzas e 77,85% de umidade. O teor de cálcio foi de 37mg/100g, o de ferro foi de 0,99mg/100g e o de sódio de 15mg/100g. Comparando-se com a composição de iogurte de leite de vaca natural integral (industrializado), não há diferença nos teores de proteínas e lipídeos que, segundo Philippi et al.<sup>20</sup>, são de 3,47g/100g e 2,1g/100g, respectivamente. Entretanto, o teor de carboidratos do iogurte de soja é maior que o teor de carboidratos do iogurte de leite de vaca (4,65%)<sup>20</sup> pelo fato de o iogurte natural em consideração não ser adicionado de açúcar, sendo quantificados apenas os carboidratos naturalmente presentes no produto. Em iogurtes de leite de vaca aromatizados e adoçados, o teor de carboidratos é, em média, 14,00%.

Yazici et al.<sup>4</sup> desenvolveram iogurte de soja formulado a partir de farinha de soja suplementada com isolado protéico de soja, xarope de milho, glucose, sacarose e lactogluco-

nato de cálcio, visando a melhoria no teor desse mineral no iogurte. A composição química do produto foi de 5,4% de proteínas, 6,6% de carboidratos, 1,5% de lipídeos, 1,6% de cinzas e o teor de cálcio foi de 190mg/100g.

Lee et al.<sup>3</sup> avaliaram o teor protéico de iogurte de soja suplementado com concentrado protéico de soro ou leite em pó desengordurado. O produto suplementado com concentrado protéico apresentou 8,12% de proteínas, enquanto o suplementado com leite em pó desengordurado apresentou 7,28%, sendo que ambos obtiveram maior concentração protéica que o iogurte de soja elaborado neste trabalho.

A formulação desenvolvida por Umbelino et al.<sup>21</sup>, composta por extrato aquoso de soja, lactose, óleo de soja, sacarose e leite em pó desnatado, apresentou a seguinte composição química: 3,40% de proteínas, 2,75% de lipídeos e 12,05% de carboidratos.

O iogurte de leite de vaca possui maior teor de cálcio (103mg/100g), devido ao fato de sua matéria prima ser melhor fonte desse mineral que a soja. Porém, a suplementação do iogurte de soja com frutoligossacarídeos pode aumentar a absorção e o balanço de cálcio significativamente<sup>22</sup>. Além disso, a suplementação do iogurte com frutooligossacarídeos preserva a isoflavona ginistina, que é anticancerígena, além de aumentar o número de lactobacilos e bifidobactérias intestinais<sup>23</sup>.

O teor de ferro do iogurte de soja é maior que o do iogurte de leite de vaca (0,19mg/100g). Com relação ao sódio, o iogurte de leite de vaca possui maior quantidade desse mineral (46mg/100g).

A observação da relação benéfica entre probióticos, prebióticos e minerais, principalmente cálcio, ferro e magnésio, é recente. Tem-se observado o efeito positivo na absorção desses minerais principalmente através de estudos com animais. Os prováveis mecanismos envolvem a produção de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição do pH intestinal e a solubilização de

cálcio, magnésio e ferro complexados, aumento de proteínas relacionadas com absorção (Calbindina  $D_{9k}$ ), além de hiperplasia da mucosa intestinal com conseqüente aumento da área de absorção<sup>24</sup>.

Com relação às propriedades físicas, sabe-se que a característica do coágulo é de importância fundamental para a aceitação do iogurte. A viscosidade de um produto é definida como a resistência que o líquido oferece a uma certa força aplicada, sendo dependente de vários aspectos do processo, tipo de substrato e tratamento térmico a ele aplicado, condições de incubação e resfriamento e cultura láctica utilizada<sup>25</sup>.

A viscosidade média dos iogurtes foi de 21000 cP (suplementado) e 13000 cP (não suplementado). A viscosidade mais elevada do iogurte de soja suplementado pode ser explicada pela presença dos frutoligosacarídeos, que contribuem para o aumento de sólidos totais no produto. Resultado semelhante foi observado por Trindade et al.<sup>26</sup> ao concluírem que o teor de sólidos totais influenciou na viscosidade aparente de iogurtes preparados com extrato de soja. Gel-Nagar et al.<sup>27</sup> observaram que o acréscimo de inulina em sorvete de iogurte com baixo teor de gorduras aumenta significativamente sua viscosidade devido às interações da fibra solúvel com a parte aquosa do produto.

Inulina, sendo uma substância altamente higroscópica, pode ligar água e formar uma rede semelhante a um gel, alterando as propriedades reológicas do sistema<sup>27</sup>. Os resultados obtidos na análise do perfil de textura estão apresentados na Tabela 1.

A adição de prebióticos ao iogurte de soja confere ao produto maior coesividade e adesividade. Segundo Gel-Nagar et al.<sup>27</sup>, a inulina age como um estabilizante devido à sua capacidade de ligar água, promovendo a formação de uma rede mais coesa e um gel mais estável. O aumento da adesividade está relacionado à formação de um gel mais viscoso<sup>27</sup>.

**Tabela 1.** Perfil de textura de iogurte de soja suplementado e não suplementado com oligofrutose e inulina.

Parâmetros avaliados	iogurte de soja	
	Suplementado	Não suplementado
Dureza (N)	0,2052 <sup>b</sup>	0,2576 <sup>a</sup>
Coesividade	0,5704 <sup>a</sup>	0,5096 <sup>b</sup>
Elasticidade	0,9882 <sup>a</sup>	0,9744 <sup>a</sup>
Adesividade (Ns)	-0,0088 <sup>a</sup>	-0,016 <sup>b</sup>
Gomosidade (N)	0,1232 <sup>a</sup>	0,1308 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas de letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

O iogurte suplementado apresenta menor dureza que o produto sem adição de prebióticos. Tal condição foi relatada por Kim et al.<sup>28</sup>, que constataram que em baixas concentrações como 5% e 10% (m/v), a inulina não é capaz de formar gel após aquecimento e resfriamento.

Gel-Nagar et al.<sup>27</sup> observaram que a adição de 5% de inulina diminui a dureza em sorvete de iogurte com baixo teor de gordura. Entretanto, a adição de inulina na concentração de 7% e 9% aumenta a dureza desse produto.

Os parâmetros elasticidade e gomosidade não sofreram influência da suplementação com oligofrutose e inulina, sendo que não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os dois tipos de iogurtes.

## Características probióticas

Para atingir o intestino e garantir sua funcionalidade, as bactérias probióticas devem possuir uma ou mais características, como resistência ao suco gástrico, à bile e às condições de processamento a que o alimento é submetido (Tabela 2), entre outras<sup>29</sup>.

Observou-se que em pH 6,1 a viabilidade celular se mantém constante durante as três horas avaliadas. Nos meios com pH 4,0 e pH 2,0 ocorreu um decréscimo, não significativo ( $p > 0,05$ ), durante o período avaliado. Pode-se afirmar que o fermento lácteo é resistente ao ácido, confirmando uma importante característica probiótica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Viabilidade celular do fermento lácteo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* durante 3 horas de cultivo em meio líquido de MRS com baixos valores de pH (teste de resistência ao ácido).

Meio testado	Viabilidade celular contagem em placas (log UFC. mL <sup>-1</sup> )			
	Tempo de incubação (h)			
	0	1	2	3
MRS pH 6,1	9,48 <sup>a</sup>	9,46 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>
MRS pH 4,0	9,39 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>	9,18 <sup>a</sup>	8,71 <sup>a</sup>
MRS pH 2,0	9,36 <sup>a</sup>	9,38 <sup>a</sup>	9,17 <sup>a</sup>	8,77 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

A menor quantidade de microorganismos encontrada (8,71 log UFC. mL<sup>-1</sup>) na terceira hora de exposição ao pH 4 (Tabela 2) ainda é maior que a quantidade mínima necessária para caracterizar um alimento probiótico (7 log UFC. mL<sup>-1</sup>)<sup>7</sup>.

Rönka et al.<sup>14</sup>, utilizando a mesma metodologia, testaram a resistência de *L. brevis* ao ácido e observaram que, em pH 4,0, a viabilidade do microorganismo manteve-se constante (8 log UFC.mL<sup>-1</sup>). No entanto, em pH 2,0, a viabilidade chegou a 0,1 log UFC.mL<sup>-1</sup>, após três horas de incubação.

A bile pode promover a morte de microorganismos, impedindo sua implantação no trato intestinal. Por esse motivo, um microorganismo probiótico deve resistir à ação da bile para atingir porções distais do intestino e colonizá-lo<sup>6</sup>.

Em meio MRS sem adição de bile, a viabilidade celular manteve-se constante durante

todo o período de avaliação. Pode-se observar que até a quarta hora de exposição à bile, a quantidade de microorganismos viáveis (9,03 log UFC. mL<sup>-1</sup>) ainda é superior à quantidade mínima para que um alimento seja considerado probiótico<sup>7</sup>, demonstrando a resistência do fermento à bile (Tabela 3).

A mesma metodologia foi utilizada por Rönkä et al.<sup>14</sup> para testar a tolerância de *L. brevis* à bile. Esse microorganismo apresentou resistência à bile, mantendo sua viabilidade até o final do período avaliado.

A estabilidade das formulações de iogurte de soja (suplementado e não suplementado) durante o armazenamento foi avaliada considerando-se a viabilidade, a variação do pH e acidez durante 28 dias de armazenamento, à temperatura de 4°C (Tabela 4).

Verificou-se que os valores de pH diminuem durante o período avaliado nas duas formulações de iogurte. Essa queda é maior no iogurte suplementado, apesar de não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os valores de pH encontrados.

A acidez dos iogurtes aumenta com o tempo de armazenamento, sendo significativa ( $p\leq 0,05$ ) a diferença existente entre o produto após a fermentação e a partir do 21º dia de armazenamento (4°C).

O número de bactérias lácticas viáveis presentes no iogurte de soja suplementado no 28º dia de armazenamento (9,28 log UFC. mL<sup>-1</sup>) foi superior aos valores mínimos necessários para

**Tabela 3.** Viabilidade celular do fermento lácteo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* durante 4 horas de cultivo em meio líquido de MRS adicionado de bile (teste de resistência à bile).

Meios testados	Viabilidade celular contagem em placas (log UFC. mL <sup>-1</sup> )				
	Tempo de incubação (h)				
	0	1	2	3	4
MRS pH 6,1 sem adição de bile	9,48 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>
MRS pH 6,1+ 0,3% bile	9,48 <sup>a</sup>	9,42 <sup>a</sup>	9,38 <sup>a</sup>	9,29 <sup>a</sup>	9,03 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

**Tabela 4.** Valores de pH, acidez e viabilidade celular do iogurte de soja suplementado com oligofrutose e inulina e não suplementado, durante o armazenamento.

Dias	Parâmetros avaliados					
	iogurte suplementado			iogurte não suplementado		
	pH	Acidez %	Viabilidade celular (log UFC. mL <sup>-1</sup> )	pH	Acidez %	Viabilidade celular (log UFC. mL <sup>-1</sup> )
0	4,55 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	9,48 <sup>a</sup>
7°	4,52 <sup>a</sup>	0,41 <sup>ab</sup>	9,48 <sup>a</sup>	4,49 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	9,45 <sup>a</sup>
14°	4,40 <sup>a</sup>	0,49 <sup>abc</sup>	9,48 <sup>a</sup>	4,38 <sup>a</sup>	0,46 <sup>abc</sup>	9,45 <sup>a</sup>
21°	4,12 <sup>a</sup>	0,59 <sup>bc</sup>	9,31 <sup>a</sup>	4,35 <sup>a</sup>	0,51 <sup>bc</sup>	5,36 <sup>a</sup>
28°	4,03 <sup>a</sup>	0,67 <sup>c</sup>	9,28 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>	0,54 <sup>c</sup>	5,28 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

caracterizar um alimento probiótico, estando dentro do preconizado por autores que relatam a necessidade de, no mínimo, 8 log UFC.mL<sup>-1</sup> para receber a classificação de probiótico<sup>29</sup>. O mesmo não foi observado no iogurte sem suplementação. A partir do 21° dia de armazenamento, a quantidade de bactérias lácticas (5,36 log UFC.mL<sup>-1</sup>) já era insuficiente para caracterizá-lo como probiótico. Na última avaliação esse valor chegou a 5,28 log UFC.mL<sup>-1</sup>, indicando que apenas os oligossacarídeos da soja não foram suficientes para manter a viabilidade das bactérias lácticas e garantir a classificação do produto como probiótico.

A suplementação do iogurte com prebióticos manteve a viabilidade das bactérias lácticas, protegendo esses microorganismos, como é descrito por alguns autores<sup>6,8,29</sup>. *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* apresentaram resistência ao ácido e à bile, além de permanecerem viáveis em quantidades suficientes para caracterizar o iogurte como probiótico. O fermento utilizado é reconhecidamente GRAS e não apresenta variação genética, atendendo aos requisitos para garantir a efetividade do probiótico<sup>6</sup>.

As amostras não apresentaram crescimento para bolores e leveduras, coliformes totais e fecais até o 28° dia de armazenamento.

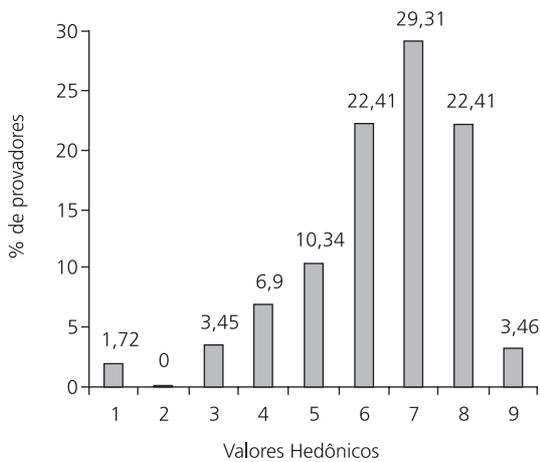
Em ambiente ácido, oligofrutose e inulina podem ser hidrolisadas resultando na formação de frutose e na perda de suas propriedades funcionais. Entretanto, durante a produção e estocagem de iogurte, ocorre uma hidrólise

limitada. Durante a pasteurização do leite, quantidades menores ou igual a 1% podem sofrer hidrólise; durante a incubação, até 2% dos prebióticos podem ser hidrolisados e durante o período de validade do iogurte (28 dias), no máximo 5% da oligofrutose e inulina adicionadas podem sofrer hidrólise<sup>30</sup>. Portanto, pelo menos 90% dos prebióticos adicionados ao iogurte de soja ainda permanecem em sua forma original no final do período de validade do produto, garantindo sua funcionalidade.

A análise sensorial do produto foi realizada através do teste de aceitação, desenvolvido com a participação de 58 provadores. A equipe sensorial foi composta por 60,3% de mulheres e 39,7% de homens, com idade variando de 20 a 60 anos, predominando a faixa etária de 20 a 30 anos (51,7%).

A maioria dos avaliadores (62,1%) apresentava o terceiro grau (completo ou em andamento); 22,4% dos provadores possuíam segundo grau completo e apenas 1,7% tinha o primeiro grau completo.

O índice de aceitação médio para o iogurte foi de 71,2%, sendo que 77,6% dos provadores atribuíram notas iguais ou superiores a 6 (Figura 1), resultado que pode ser considerado muito bom, levando-se em conta o fato de o produto ser derivado de soja e sem adição de sacarose. Índices semelhantes foram obtidos em iogurtes de soja desenvolvidos por Umbelino et al.<sup>21</sup>.



**Figura 1.** Porcentagem de aceitação do iogurte de soja suplementado com inulina e oligofrutose (formulação otimizada).

Comentários realizados por 53,5% dos provadores foram relacionados à baixa doçura do produto, indicando que um aumento da doçura do iogurte resultaria no aumento do índice de aceitação. Outros comentários, como sabor de soja (10,2%) e adstringência (14,3%), foram apresentados. Em produtos derivados de soja, a adstringência e o sabor típico da leguminosa são os fatores que limitam sua aceitação. No caso do iogurte, apenas 24,5% dos provadores fizeram referência a essas características, comprovando que a fermentação láctica melhora as características organolépticas do produto, aumentando sua aceitação.

## CONCLUSÃO

Os microorganismos (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) são resistentes à bile e ao ácido e mantiveram a viabilidade celular necessária para caracterizar o iogurte como probiótico.

O iogurte de soja suplementado com os prebióticos oligofrutose e inulina apresentou maior viscosidade, coesividade e adesividade e menor dureza que o iogurte não suplementado. Além disso, esse produto apresentou um bom índice de

aceitação. Portanto, os frutooligossacarídeos investigados mostraram-se adequados como ingredientes para formulação de iogurte de soja.

## REFERÊNCIAS

1. Salgado JM. Impacto dos alimentos funcionais para a saúde. *Nutr Pauta*. 2001; 48:10-7.
2. De Angelis RC. Fome oculta: bases fisiológicas para reduzir seu risco. São Paulo: Atheneu; 1999.
3. Lee SY, Morr CV, Seo A. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J Food Sci*. 1990; 55(2):532-6.
4. Yazici F, Alvarez VB, Hansen PMT. Fermentation and properties of calcium-fortified soy milk yogurt. *J Food Sci*. 1997; 62(3):457-61.
5. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66(5):365-78.
6. Gibson GR, Fuller R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr*. 2000; 130(2S Suppl):391S-5S.
7. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potencial for probiotics. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73(2 Suppl): 476S-83S.
8. Losada MA, Olleros T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutr Res*. 2002; 22:71-84.
9. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995; 125(6): 1401-12.
10. Shimakawa Y, Matsubara S, Yuki N, Ikeda M, Ishikawa F. Evaluation of *Bifidobacterium brevis* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *Int J Food Microbiol*. 2003; 81(2):131-6.
11. Box GEP, Behnke DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Techometrics*. 1960; 2(4):455-75.
12. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington (DC): AOAC; 1995.
13. Pons M, Fiszman SM. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *J Texture Stud*. 1996; 27(6):597-624.
14. Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol*. 2003; 83(1):63-74.

15. Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 1961; 23:130-5.
16. Zayed G, Winter J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. *Appl Microb Biotech.* 1995; 44(3-4):362-6.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage on the Internet]. Brasília: Anvisa. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 [acesso 2003 nov 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)
18. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. *Sensory Evaluations Techniques.* 3rd ed. London: CRC Press Inc; 1999.
19. Monteiro CLB. *Técnicas de avaliação sensorial.* Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA). 2.ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1984.
20. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. *Virtual Nutri.* Versão 1.0 for Windows [software]. São Paulo: Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, USP; 1996.
21. Umbelino DC, Cardello HM, Rossi EA. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do "iogurte" de soja. *Arch Latinoam Nutr.* 2001; 51(2):199-203.
22. Coudray C, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr.* 2003; 42(2):91-8.
23. Steer TE, Johnson IT, Gee JM, Gibson GR. Metabolism of the soybean isoflavone glycoside genistin *in vitro* by human gut bacteria and the effect of prebiotics. *Br J Nutr.* 2003; 90(3):635-42.
24. Ybarra LM, Costa NMB, Gibson GR, Ferreira CLLF. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. In: Ferreira CLLF. *Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção.* Viçosa: Suprema; 2003. 79-102.
25. Hashimoto EM, Antunes LAF. Efeito do tratamento térmico e de culturas filantes nas características reológicas do iogurte do leite de cabra. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1995; 3(15):255-61.
26. Trindade CSF, Cascardo-Silva F, Freitas S, Coury S. Comportamiento reológico de los yogurts de soya homogeneizados y no homogeneizados. *Alimentaria.* 1997; p.69-73.
27. Gel-Nagar G, Clowes G, Tudoricã CM, Kuri V. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *Int J Dairy Technol.* 2002; 55(2):89-93.
28. Kim Y, Faqih MN, Wang SS. Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydr Polymers.* 2001; 46(2):135-45.
29. Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J.* 2003; 12(2-3):173-82.
30. ORAFIT- Active Food Ingredients. Application File: Fermented Dairy Products. Doc. A8-90\*01/99. Belgium; 1999. 10p.

Recebido para publicação em 10 de maio de 2004 e aceito em 16 de fevereiro de 2005.