

Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de tempeh de soja

Inês Isabel Panasqueira Naia

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Coorientador: Professora Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: - Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Ao longo deste percurso acadêmico no Instituto Superior de Agronomia, a terminar com a realização da presente dissertação de mestrado, muitas foram as pessoas, entre colegas, professores e funcionários, que de alguma forma tornaram possível o sucesso do mesmo. No entanto, existem algumas que contribuíram de forma mais direta e, por isso, é importante destacá-las.

À Professora Doutora Catarina Prista, pela forma como me orientou ao longo da dissertação, por todos os ensinamentos, pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Anabela Raymundo, coorientadora desta dissertação, por todos os ensinamentos e pelo apoio prestado.

Aos meus colegas do laboratório de Biotecnologia Energética, por me terem integrado da melhor forma e pela ajuda prestada, bem como às funcionárias do laboratório de Microbiologia.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Agro-Indústrias do Instituto Superior de Agronomia, por todo o apoio e ajuda sempre que solicitados por mim.

A todas as minhas colegas de curso, principalmente àquelas a quem passei a chamar de “amigas”, por toda a paciência, apoio, amizade, carinho e pelos momentos de discussão, descontração e diversão. Muito obrigada!

A todos os elementos da Tunassa, tuna feminina do Instituto Superior de Agronomia, pelos momentos de convívio, diversão, aventura, boa disposição, assim como o companheirismo, o apoio e as palavras de incentivo que me ajudaram a ultrapassar momentos mais difíceis durante este percurso. Até mesmo os momentos mais controversos que passámos me ajudaram a crescer e a tornar-me melhor pessoa. Obrigada queridas tunantes!

Aos meus amigos conterrâneos, por todo o apoio e companheirismo, bem como pelas palavras de incentivo e confiança que foram determinantes, essencialmente, ao longo destes meses. Obrigada pela vossa amizade!

Ao meu namorado, pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação, apoio incondicional, e pela paciência, compreensão e confiança em mim depositada, bem como pelas palavras de encorajamento, e momentos inesquecíveis que foram determinantes para o êxito deste percurso e, em particular, desta dissertação.

À minha família, principalmente ao meu irmão e à minha avó, por sempre terem acreditado em mim, pelo amor e carinho, e pela força que me transmitiram, a qual me ajudou a alcançar o maior sucesso possível. Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, porque

sem o seu grande espírito de sacrifício, de trabalho e coragem ao longo da vida não teria sido possível o meu acesso a esta oportunidade de estudo de forma a ter um melhor futuro. Obrigada pelo vosso amor e apoio incondicionais, pelas palavras de incentivo e pela confiança que depositaram em mim, as quais foram imprescindíveis no vencimento de obstáculos e barreiras que foram surgindo, pela compreensão, e por sempre terem acreditado nas minhas capacidades. Muito obrigada!

A todos, muito obrigada!

Resumo

O tempeh é um alimento indonésio fermentado pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, cuja produção é benéfica no que diz respeito à melhoria da digestibilidade proteica e do valor nutricional de leguminosas.

Neste trabalho pretendeu-se otimizar o método de produção do inóculo (*R. oligosporus*), tendo como base a valorização de subprodutos da indústria alimentar (farinhas de trinca de arroz, trigo, milho e centeio). Adicionalmente, pretendeu-se otimizar o processo de produção de tempeh, utilizando como substratos produtos tradicionais portugueses (ervilha, tremço) em comparação com a soja. Avaliaram-se parâmetros físicos de textura (firmeza, coesividade) e parâmetros instrumentais de cor, ao longo da fermentação e após conservação à temperatura de refrigeração.

Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade da produção de inóculo a partir de subprodutos da indústria alimentar, tendo-se verificado uma maior esporulação nas farinhas de centeio e de arroz carolino e agulha (5 dias, 29°C). Nos tempehs de soja e ervilha a fermentação completa ocorreu às 48h, a 29 e 37°C, respetivamente, enquanto no tempeh de tremço apenas às 72h, a 37°C. No final da fermentação registaram-se os maiores valores de firmeza, coesividade e luminosidade (L*). Observaram-se variações significativas de cor ao longo da fermentação, expressas em termos dos parâmetros a* e b*.

Palavras-chave: leguminosas, inóculo de *Rhizopus oligosporus*, fermentação, tempeh, textura (TPA), cor.

Abstract

Tempeh is an Indonesian fermented food by the fungus *Rhizopus oligosporus*, which the production is beneficial as regards the improvement of the protein digestibility and nutritional value of legumes.

The present work intended to optimize the production method of inoculum (*R. oligosporus*), while adding value to food industry (broken rice, wheat, corn and rye flours). The following objective consisted in optimizing the production process of tempeh, using traditional Portuguese legumes (pea and lupine) in comparison with soy tempeh. Finally, texture parameters (firmness and cohesiveness) were evaluated by a TPA. Instrumental colour parameters, throughout the fermentation and after storage at refrigeration temperature were also evaluated.

The results showed the viability of producing the inoculum using food industry by-products (5 days, 29 ° C), with rye, rice "carolino" and long grain rice flours yielding a higher sporulation. Soybean and pea tempeh complete fermentation after 48 h at 29 and 37 °C, respectively, while the lupine tempeh only after 72 h at 37 ° C. The highest values of firmness, cohesiveness and lightness (L *) were obtained at the end of fermentation. Significant variations in color, expressed in terms of a * and b * parameters, were observed.

Keywords: legumes, *Rhizopus oligosporus* inoculum, fermentation, tempeh, texture (TPA), colour.

Extended abstract

The contemporary society is increasingly demand for a wide variety of foods with pleasant flavour and texture characteristics which also contain a proper balance of ingredients to promote human health, in addition to providing basic nutrition. Foods with these characteristics are designated by functional foods.

The soybean fermentation by adding the fungus *R. oligosporus* gives rise to a traditional Indonesian fermented functional food, tempeh. During the fermentation process, changes that result in a higher digestibility and nutritional value of tempeh compared to soybean occur.

The present work was developed in three distinct phases. In the first, it intended to optimize the method of production of inoculum (*R. oligosporus*), while adding valute to by-products of the food industry, in particular 6 flours of °types of cereals – broken rice (steamed, “carolino” and long grain), corn, wheat and rye. The second phase aimed to optimize the process fermentation of tempeh, using as raw material the traditional Indonesian legume soya in comparison with two Portuguese traditional legumes: pea and lupine. The third and final stage consisted in evaluating the texture parameters – firmness and cohesiveness – and the color parameters – L * (lightness), a * (green to red) and b * (blue to yellow) – throughout the fermentation of the soybean, pea and lupine tempeh and also after 1 week, 2 weeks and 1 month storage at refrigeration temperature.

In order to evaluate/optimize the viability of producing the inoculum from by-products of the food industry, each of the six flours was placed in a sterile glass inoculated with a spore suspension of *R. oligosporus*, capped with a cotton plug and incubated at 29 °C, and the degree of sporulation was observed. Results obtained showed that an optimum fungal development for the inoculum production requires 5 days of incubation at 29 °C, when it was observed a good sporulation on the surface of the flour. The rye, broken “carolino” rice and broken lon grain rice flours were those that allowed greater sporulation, while steamed rice flour was where the fungus developed smallest amount of spores.

In order to compare the production of tempeh using the three legumes, an optimization of the fermentation process of tempeh was necessary. Changes in the relation between the amount of inoculum added to a certain amount of legume, as well as the legume humidity and temperature of incubation, in order to obtain the final product with the desired characteristics were introduced. The results were different for the three legumes. Soybean tempeh showed the desired appearance after 48 h of fermentation at 29 °C, while it was not possible to produce it at temperature of 37 °C. Pea tempeh required more inoculum and a higher temperature (37 °C) compared to soybean, to obtain a compact and firm product after 48 h. Lupine tempeh was the one in which the development of the fungus was slower, so the best product was obtained only after 72 h of fermentation, also at 37 ° C as pea tempeh.

In the final phase of the work, the evaluation of texture and colour parameters was performed along the fermentation period and throughout the conservation at refrigerated temperature. Results obtained revealed the three tempehs showed higher firmness, cohesiveness and lightness (L^*) values when fermentation was completed (48 h for the soybean and pea tempeh and 72 h for the lupine tempeh). In ascending order, the firmness and lightness values obtained were 25.23 N and 88.11, 20.08 N e 83.58, e 17.44 N e 79.81 for soybean, pea and lupine tempeh, respectively. As regards cohesiveness this order was completely reversed, with values of 0.42 in lupine tempeh, 0.36 in pea tempeh and 0.33 in soybean tempeh. After fermentation the firmness, cohesiveness and lightness values decreased until the end of storage (1 month) in all the three tempehs, although the cohesiveness values in lupine tempeh had fluctuated during storage. As the redness (a^*), the general trend was a progressive increase until near the end of fermentation, followed by a decrease, and an increase again until the end of storage for the soybean and lupine tempeh, while for the pea tempeh this value was always increasing until the end of storage. Already the yellowness (b^*) oscillates similarly in 3 tempeh, following what happens to redness in soybean and lupine tempeh.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Extended abstract	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Alimentos Fermentados	3
2.1.1. Enquadramento Histórico	3
2.1.2. Alimentos Fermentados: Alimentos funcionais de importância económica, social e cultural	5
2.1.3. Tipos de alimentos fermentados.....	7
2.1.4. Propriedades dos alimentos fermentados.....	8
2.1.5. Fermentação em estado sólido.....	10
2.2. Tempeh	11
2.2.1. Origem, definição e história	11
2.2.2. Diversidade de tempeh.....	11
2.2.3. Evolução da produção e do consumo.....	13
2.2.4. Matérias-primas: Soja, ervilha e tremço.....	13
2.2.5. Microbiota do tempeh	18
2.2.6. Processo de produção.....	21
2.2.7. Benefícios nutricionais e de saúde	26
2.2.8. Conservação	29
2.3. Parâmetros físicos do tempeh.....	29
2.3.1. Textura	29
2.3.2. Cor	32

2.4. Utilização de métodos instrumentais para avaliação da influência da fermentação nas propriedades físicas de produtos alimentares	34
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Materiais	36
3.2. Métodos	36
3.2.1. Métodos de contagem de esporos.....	36
3.2.2. Preparação do inóculo para produção do tempeh	37
3.2.3. Preparação da matéria-prima para produção do tempeh.....	38
3.2.4. Preparação do tempeh	39
3.2.5. Conservação do tempeh.....	40
3.2.6. Caracterização física do tempeh	40
3.2.7. Análise estatística dos resultados.....	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Otimização do processo de obtenção do inóculo para produção de tempeh.....	42
4.1.1. Obtenção da cultura de <i>Rhizopus oligosporus</i>	42
4.1.2. Metodologia para obtenção do inóculo de <i>Rhizopus oligosporus</i>	43
4.2. Otimização do processo fermentativo de tempeh.....	46
4.3. Avaliação dos parâmetros físicos do tempeh	52
4.3.1. Avaliação da textura e da cor do tempeh ao longo da fermentação.....	53
4.3.2. Avaliação da textura e da cor do tempeh ao longo do processo de conservação	59
5. Considerações Finais e Perspetivas Futuras.....	66
Referências Bibliográficas	69
Anexos	78
Anexo I – Diversos processos de produção de tempeh	79
Anexo II – Meio de cultura (MEA)	84
Anexo III – Câmara de contagem de esporos	85
Anexo IV – Registo dos valores dos parâmetros de textura e cor dos 3 tipos de tempeh .	86
Anexo V – <i>Abstract</i> do XII Encontro de Química dos Alimentos (Instituto Superior de Agronomia – Lisboa).....	87

Índice de Figuras

Figura 1 - Tempeh cru (a) e tempeh frito (b).....	11
Figura 2 - Aspeto microscópico de hifas e esporos de <i>R. oligosporus</i>	19
Figura 3 - Diagrama das etapas essenciais de produção de tempeh de soja	22
Figura 4 - Feijões de soja embalados em folhas de bananeira	25
Figura 5 - Feijões de soja embalados em sacos de plástico.....	25
Figura 6 - Texturómetro <i>TA.XT.Plus Texture Analyser</i>	31
Figura 7 - Exemplo de um texturograma obtido numa análise de perfil de textura.....	32
Figura 8 - Sistema CIELab	33
Figura 9 - Texturograma de um teste de perfil de textura de um tempeh de soja (representação do pico de firmeza).....	40
Figura 10 - Colorímetro MINOLTA CR-300.....	41
Figura 11 - Aspecto do micélio de <i>R. oligosporus</i> após 3 (esq.) e 7 (dir.) dias de incubação.	43
Figura 12 - Suspensões de esporos preparadas em 50 mL de água desmineralizada estéril	44
Figura 13 - Farinhas de centeio (esq.), milho e trinca de arroz vaporizado (dir.) inoculadas com <i>R. oligosporus</i> , após 6 dias de incubação	45
Figura 14 - Transferência de metade das farinhas dos cristalizadores para os copos	45
Figura 15 - Farinhas de milho (esq.), trigo, centeio, trinca de arroz carolino, trinca de arroz agulha e trinca de arroz vaporizado (dir.), após 5 dias de incubação a 28 °C.....	46
Figura 16 - Tempehs após 4 dias de incubação, a 29 °C	46
Figura 17 - Tempeh de soja após 48 h de incubação a 29 °C. (a) Parte superior; (b) Parte lateral.	47
Figura 18 - Tempeh de soja após 24 h de fermentação a 29 °C.....	48
Figura 19 - Tempeh de soja após 48 h de fermentação a 29 °C.....	48
Figura 20 - Tempeh de soja após 24 h (a) e 48 h (b) de fermentação a 37 °C	49
Figura 21 - Tempeh de ervilha após 2 dias a 29 °C seguidos de 4 dias a 37 °C.....	49
Figura 22 - Tempeh de ervilha ao fim de 20 h (a), 24 h (b) e 48 h (c) de fermentação a 37 °C	50

Figura 23 - Tempeh de tremço após 48 h de fermentação a 29 °C (a) e a 37 °C (b)	51
Figura 24 - Tempeh de tremço após 65 h (a) e 72 h (b) de fermentação a 37 °C	51
Figura 25 - Tempeh de tremço, inoculado com ≈ 2,6 g de inóculo, após 65 h (a) e 72 h (b) de fermentação a 37 °C	52
Figura 26 - Aspeto evolutivo do tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.....	53
Figura 27 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação	54
Figura 28 - Coesividade obtida para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação	54
Figura 29 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação	55
Figura 30 - Aspeto evolutivo do tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação....	55
Figura 31 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação	56
Figura 32 - Coesividade obtida para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação	56
Figura 33 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação	57
Figura 34 - Aspeto evolutivo do tempeh de tremço ao longo dos tempos de fermentação .	57
Figura 35 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de tremço ao longo dos tempos de fermentação	58
Figura 36 - Coesividade obtida para o tempeh de tremço ao longo dos tempos de fermentação	58
Figura 37 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de tremço obtidos para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação	59
Figura 38 - Aspeto evolutivo do tempeh de soja ao longo do processo de conservação	60
Figura 39 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação	60
Figura 40 - Coesividade obtida para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação	60
Figura 41 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação.....	61

Figura 42 - Aspeto evolutivo do tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação ..	61
Figura 43 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação ..	62
Figura 44 - Coesividade obtida para o tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação ..	62
Figura 45 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação ..	63
Figura 46 - Aspeto evolutivo do tempeh de tremoço ao longo do processo de conservação..	63
Figura 47 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de tremoço ao longo do processo de conservação ..	64
Figura 48 - Coesividade obtida para o tempeh de tremoço ao longo do processo de conservação ..	64
Figura 49 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de tremoço ao longo do processo de conservação ..	65
Figura 50 - Diagrama de produção de tempeh, em pequena escala (Indonésia) ..	79
Figura 51 - Diagrama de produção moderna de tempeh numa fábrica na Indonésia ..	80
Figura 52 - Diagrama de produção de tempeh, em larga escala (<i>Maruzan Ai Company</i> , Japão) ..	81
Figura 53 - Diagrama de produção de tempeh de soja, em pequena escala (<i>The Farm, Summertown, Tennessee</i>) ..	82
Figura 54 - Diagrama de produção de tempeh de soja, em larga escala (<i>The Farm, Summertown, Tennessee</i>) ..	83
Figura 55 - Câmara de <i>Neubauer</i> ..	85

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Alimentos fermentados típicos de diversas regiões do Mundo	7
Tabela 2 - Diferentes tipos de tempeh e respectivas matérias-primas.....	12
Tabela 3 - Composição nutricional das leguminosas soja, ervilha e tremoço	14
Tabela 4 - Classificação taxonômica de <i>Rhizopus oligosporus</i>	19
Tabela 5 - Composição nutricional do tempeh de soja	27
Tabela 6 - Parâmetros característicos de textura	32
Tabela 7 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de soja	86
Tabela 8 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de ervilha	86
Tabela 9 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de tremoço	86

Lista de Abreviaturas

≈ – Aproximadamente

°C – Graus Celsius

a.C. – Antes de Cristo

ANOVA – Análise de Variância

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BAL – Bactérias Ácido-Láticas

CBAA – Centro de Botânica Aplicada à Agricultura

cm – Centímetro

dir. – Direita

esq. – Esquerda

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FUFOSE – *Functional Food Science in Europe*

g – Grama

GRAS – *Generally Regarded as Safe*

HAA – Ácido 3-hidroxiantranílico

ISO – *International Organization for Standardization*

kcal – Quilocaloria

kg – Quilograma

kgf – Quilograma-força

kJ – QuiloJoule

LDL – *Low Density Lipoprotein*

m – Minuto

MEA – *Malt Extract Agar*

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

N – Newton

PDA – *Potato Dextrose Agar*

pH – Potencial de hidrogénio

R. – *Rhizopus*

s – Segundo

sem. – Semana

SOD – Enzima superóxido dismutase

TPA – *Texture Profile Analysis*

UFC – Unidade Formadora de Colónias

µg – Micrograma

µL – Microlitro

1. Introdução

A indústria alimentar é um sector em constante evolução, revelando rápidos progressos tanto a nível tecnológico como científico. Estes progressos devem-se, essencialmente, à rápida alteração de gostos por parte do consumidor aliada à sua procura cada vez maior de produtos práticos e rápidos de confeccionar, mas também inovadores, provenientes de outras etnias e culturas e que, ao mesmo tempo, tenham efeitos benéficos no organismo humano aquando do seu consumo.

Os avanços acima mencionados, em conjunto com questões concorrenciais e de marketing, com o envelhecimento da sociedade e a inversão populacional, com a evidência clínica da bioatividade de alguns compostos dos alimentos e com a diferenciação entre marcas, conduziram ao desenvolvimento do conceito de alimento funcional. Segundo a FUFOSSE (*Functional Food Science in Europe*), “um alimento é considerado funcional se estiver comprovado que apresenta efeito fisiológico benéfico para a saúde e/ou redução dos riscos de doenças crónicas, para além da função nutricional básica” (Martins *et al.*, 2004).

As principais classes de ingredientes que constituem os alimentos funcionais são: probióticos, prebióticos, vitaminas, minerais, antioxidantes, proteínas/péptidos/aminoácidos, ácidos gordos e fitoquímicos. A estes ingredientes é-lhes atribuída a responsabilidade dos efeitos benéficos provenientes do consumo de alimentos funcionais, como por exemplo a redução do colesterol, a redução do risco de doenças cardiovasculares, osteoporose e cancro, e o fortalecimento do sistema imunitário (Martins *et al.*, 2004).

Os alimentos fermentados são considerados substratos alimentares nos quais microrganismos que ocorrem naturalmente ou que são posteriormente adicionados produzem enzimas, particularmente amilases, proteases e lipases, que hidrolisam polissacáridos, proteínas e lípidos em produtos não tóxicos cujos *flavour*, aromas e texturas são agradáveis e atrativos ao consumidor (Steinkraus, 2002). Assim, os alimentos fermentados são um grupo importante do sector dos alimentos funcionais.

Ancestralmente os alimentos fermentados eram produzidos tendo como objetivo primário a conservação. No entanto, atualmente, o aumento da sua produção associado à crescente procura do consumidor por alimentos saudáveis, variados e sensorialmente agradáveis, está diretamente relacionado com as suas características organoléticas, o seu valor nutricional e a sua funcionalidade (Hutkins, 2006).

Na Europa, os alimentos fermentados tradicionalmente consumidos e produzidos são o pão, os produtos lácteos, os enchidos, as azeitonas, os *pickles*, entre outros, enquanto no sector das bebidas o vinho e a cerveja estão no topo das mais ingeridas e produzidas. Já em

países orientais, como o Japão e a Indonésia, o *natto*, o miso e o tempeh são exemplos de alimentos fermentados mais frequentemente consumidos.

O tempeh é um produto originalmente feito a partir de feijões de soja fermentados pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, o qual vai formar um micélio branco ao redor dos feijões, obtendo-se um produto compacto e firme (Steinkraus, 1996; Steinkraus, 2002; Kuswanto, 2005). Este produto fermentado oriental originário da ilha de Java, na Indonésia, (i) é uma excelente fonte proteica e de cálcio, (ii) tem um baixo teor de sódio e gordura saturada e (iii) tem um elevado teor de ácidos gordos essenciais, vitaminas do complexo B, nomeadamente vitamina B12, e fibra alimentar solúvel. A maior parte destas características nutricionais derivam de alterações que ocorrem durante a fermentação dirigida por *Rhizopus oligosporus*, da qual resulta uma maior digestibilidade e valor nutricional do tempeh face ao feijão de soja cozido (Nout e Kiers, 2005; Babu *et al.*, 2009).

Devido ao seu elevado teor proteico, o tempeh é bastante utilizado como substituto da carne em comunidades indonésias com menor poder de compra. No entanto, devido à sua popularidade e ao seu valor nutricional, o tempeh tem valores mais elevados de consumo do que outros produtos alimentares ricos em proteína, não só nessas comunidades indonésias pobres como também em comunidades ricas (Karyadi e Lukito, 1996).

Tendo presente o conceito de diversidade alimentar e a importância que, hoje em dia, este tem para o consumidor, bem como a necessidade de desenvolver produtos a partir de fontes proteicas vegetais, neste projeto, para além dos feijões de soja, apostou-se na utilização de outros substratos de elevado teor proteico tradicionalmente usados na alimentação mediterrânica, como o tremço e a ervilha, para a produção de tempeh.

Assim, numa primeira fase deste trabalho, o objetivo foi a otimização do método de produção de inóculo (*Rhizopus oligosporus*), tendo como base o aproveitamento de subprodutos da indústria alimentar, nomeadamente 3 farinhas de trinca de arroz (vaporizado, agulha e carolino) e 3 farinhas de outros cereais (milho, trigo e centeio). Numa segunda fase, o objetivo centrou-se na otimização do processo fermentativo de tempeh variando a quantidade de inóculo e as condições e tempo de incubação. Após esta etapa, o terceiro objetivo deste projeto consistiu no acompanhamento da evolução do processo fermentativo com base em parâmetros físicos (propriedades de textura – firmeza e coesividade – e parâmetros instrumentais de cor), permitindo estabelecer procedimentos controlados para a produção de tempeh a partir de tremço e ervilha, para que no futuro, eventualmente, se possa vir a comercializar este produto em Portugal, utilizando-se como matéria-prima diferentes tipos de leguminosas muito apreciadas no país.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Alimentos Fermentados

Mundialmente, são consumidos diariamente 50 – 400 g *per capita* de alimentos e bebidas fermentadas, representando cerca de 5 – 40 % do consumo diário total de alimentos (Tamang e Kailasapathy, 2010).

Os alimentos fermentados são produtos que foram sujeitos à ação de microrganismos que, ao fermentarem o substrato, provocaram alterações bioquímicas e organolépticas desejáveis como: 1) o enriquecimento das características sensoriais do alimento, através do desenvolvimento de uma grande variedade de *flavour*, aromas e texturas nos alimentos; 2) a conservação do alimento devido à formação dos ácidos láctico e acético, de álcool ou a fermentações alcalinas, o que inibe o crescimento de microflora indesejável nos alimentos, nomeadamente de microrganismos patogênicos; 3) o enriquecimento do valor nutricional com proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos gordos essenciais, vitaminas e minerais resultantes da ação dos microrganismos ou deles próprios; e 4) a remoção de compostos indesejáveis, nomeadamente fatores antinutricionais (Ross *et al.*, 2002; Tamang e Kailasapathy, 2010).

A fermentação é definida como sendo um processo de decomposição lenta de substâncias orgânicas, induzido por microrganismos ou por substâncias azotadas complexas (enzimas) de origem vegetal ou animal (Walker, 1988, citado por Battcock e Azam-Ali, 1998). Bioquimicamente, a fermentação é o processo metabólico em que ocorre oxidação de hidratos de carbono, quer por microrganismos quer por enzimas (Battcock e Azam-Ali, 1998; Jay *et al.* 2005).

2.1.1. Enquadramento Histórico

Acredita-se que os alimentos fermentados estão entre os primeiros alimentos consumidos pelo ser humano e que, atualmente, representam em média um terço do consumo alimentar total (Nout e Kiers, 2005). Várias evidências arqueológicas tornaram possível estabelecer registos históricos e geográficos dessas fermentações e, ainda, descrever algumas das técnicas já conhecidas para produzir esses produtos (Hutkins, 2006). Uma vez que não existia qualquer tipo de conhecimento sobre os microrganismos e as suas funções em alimentos, é certo que as primeiras fermentações ocorreram de forma espontânea e involuntária, sendo o resultado inevitável de as matérias-primas alimentares serem deixadas em estados não conservantes (Caplice e Fitzgerald, 1999; Hutkins, 2006).

O pão, a cerveja, o queijo e o vinho são conhecidos por terem sido dos primeiros alimentos (e bebidas) fermentados e que, ainda hoje, são diariamente consumidos, essencialmente, no

continente europeu. A produção de pão e de cerveja teve origem em 3000 – 4000 a.C. em padarias egípcias e cervejeiras babilônicas, respetivamente (Ross *et al.*, 2002; Hutkins, 2006).

Em relação ao queijo, acredita-se que a arte do seu fabrico terá surgido há 8000 anos, no crescente Fértil, entre os rios Tigre e Eufrates no Egito (Ross *et al.*, 2002). Por outro lado, segundo estudos arqueológicos, o vinho terá sido primeiramente produzido nas regiões do Médio Oriente, em torno da atual Turquia, Egito e Irão enquanto decorria o Período Neolítico, 8500 – 4000 a.C. (Hutkins, 2006). Para além destes, também há evidências de que produtos cárneos fermentados terão sido produzidos há milhares de anos atrás, na Babilónia, e de que os vegetais fermentados terão tido origem na China (Battcock e Azam-Ali, 1998).

As metodologias e os conhecimentos associados à produção de alimentos fermentados passavam de geração em geração entre comunidades locais, monges (aqueles que operavam fora das igrejas e dos mosteiros eram os artesãos de alguns produtos, especialmente da cerveja) e propriedades feudais, sendo que produziam pequenas quantidades para serem distribuídas numa área próxima (Caplice e Fitzgerald, 1999; Hutkins, 2006).

A fermentação, que começou por ser um método tradicional e natural de conservação de alimentos, atualmente, através da utilização de culturas *starter* (estirpes) desenvolvidas especificamente para garantir a qualidade e consistência do produto final desejáveis, é uma tecnologia de processamento alimentar que origina produtos com características organolépticas e sensoriais agradáveis, e com maior valor nutricional do que as matérias-primas que lhes deram origem (Ross *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do conhecimento sobre o papel essencial dos microrganismos na fermentação, bem como a evolução dos processos fermentativos a uma larga escala foram possíveis devido a 2 acontecimentos significativamente importantes ocorridos em meados do século XIX: 1) a revolução industrial que, tendo resultado numa grande concentração da população nas vilas e cidades, conduziu à industrialização do processo de fabrico de alimentos fermentados de modo a produzirem-se quantidades suficientes para atender aos requisitos de expansão e mercados mais distantes, em detrimento do método tradicional de fornecimento de alguns alimentos nas comunidades locais; e 2) o nascimento da microbiologia como ciência, em 1850, que levou à compreensão, pela primeira vez, das bases biológicas da fermentação, ou seja, passou a ter-se conhecimento do papel essencial dos microrganismos na fermentação de alimentos e, conseqüentemente, foi possível a obtenção de fermentações mais controladas e eficientes (Caplice e Fitzgerald, 1999; Ross *et al.*, 2002; Hutkins, 2006).

2.1.2. Alimentos Fermentados: Alimentos funcionais de importância económica, social e cultural

Desde o Neolítico até à era atual, passando pela Idade Média, os alimentos fermentados têm estado entre os alimentos mais importantes consumidos pelos seres humanos. Este facto pode ser devido à popularidade deste tipo de alimentos e ao subsequente desenvolvimento de tecnologias para a sua produção contribuírem diretamente para a evolução cultural e social da história humana (Hutkins, 2006).

O estilo de vida atual da população diretamente relacionado com a globalização e os avanços tecnológicos, alia o sedentarismo ao maior consumo de alimentos nutricionalmente mais pobres, os designados *fast-food*, alimentos rápidos e prontos para consumo amplamente disponíveis no mercado. Estes são alguns fatores responsáveis pelo aumento de doenças cardiovasculares, devido ao maior teor de colesterol LDL, obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão, cancro e, ainda, doenças do foro psicológico, como a depressão. No entanto, tem havido uma maior consciencialização da população para estes problemas e, conseqüentemente, um aumento na procura de alimentos dietéticos/*light* e funcionais que ajudam a manter uma alimentação e vida saudáveis (Gallo, 2010; El e Simsek, 2012; Tsuruda *et al.*, 2013).

A indústria alimentar tem vindo a investir na produção e comercialização dos chamados alimentos funcionais. Em 1980, o governo japonês decidiu regulamentar o uso de alimentos comercializados, até então, como alegadamente promotores de saúde, introduzindo o conceito de alimento funcional. Não existe uma definição oficial de alimento funcional, mas a FUFOS FAIR-95-0572 adotou a seguinte definição: “Um alimento pode ser considerado como funcional se estiver demonstrado que apresenta efeito fisiológico benéfico para a saúde e/ou redução dos riscos de doenças crónicas, para além da função nutricional básica” (Martins *et al.*, 2004).

Uma gama importante do sector dos alimentos funcionais são os alimentos fermentados. A fermentação desempenha 3 funções importantes no processamento de alimentos (Steinkraus, 2002):

1. O enriquecimento da dieta humana através do desenvolvimento de uma variedade de sabores, aromas e texturas nos alimentos;
2. A conservação de quantidades substanciais de alimentos através de fermentações lácticas, alcoólica, acéticas, alcalinas e de fermentações em presença de elevado teor de sal;
3. O enriquecimento dos substratos alimentares por via biológica com vitaminas, proteínas, aminoácidos essenciais e ácidos gordos essenciais.

Sendo os alimentos fermentados obtidos pelo processo de fermentação, um método de conservação relativamente eficiente e de baixa energia que aumenta o tempo de prateleira e diminui a necessidade de refrigeração ou outras formas de tecnologia de conservação de alimentos, a sua produção é bastante vantajosa em países em desenvolvimento e áreas remotas onde o uso de equipamentos mais sofisticados é limitado (Battcock e Azam-Ali, 1998). Os alimentos fermentados podem ter um impacto económico significativo numa região, estado ou país (Hutkins, 2006): matérias-primas de baixo valor económico, como uva, vegetais, cevada, soja ou outros cereais e leguminosas, são transformadas, através da fermentação, em produtos alimentares/bebidas de elevado valor acrescentado, como vinho, cerveja ou molho de soja. Por outro lado, nos países desenvolvidos onde estes problemas se colocam em menor grau, existem cada vez mais pessoas com necessidades alimentares específicas, hábitos alimentares particulares e problemas de saúde derivados de uma alimentação menos saudável, sendo os alimentos fermentados não só uma fonte alimentar variada e saudável para a população em geral como também uma forma de aportar nutrientes específicos a grupos populacionais singulares.

Muitos tipos de alimentos fermentados são característicos de determinados países e parte integrante da dieta diária, simbolizando o seu património e os aspetos socioculturais da população aí residente (Tamang e Kailasapathy, 2010). Na tabela 1 são apresentados alguns exemplos destes produtos fermentados bem como o substrato que lhes deu origem e a região do mundo onde habitualmente são produzidos/consumidos. Por exemplo, na Indonésia e no Japão o molho de soja é um ingrediente fundamental na dieta; nesses e noutros países orientais, também são importantes na dieta o miso, o tempeh e o tofu; o *gundruk*, produto vegetal fermentado e seco consumido como refeição principal ou aperitivo, é importante para garantir a segurança alimentar e para fornecer energia (uma vez que é rico em amido) e minerais a muitas comunidades do Nepal, especialmente em áreas remotas; em países africanos, o *gari* e o *fofu*, produtos obtidos a partir de mandioca fermentada, são importantes componentes da dieta, podendo, em algumas áreas, representar mais de 50% da mesma (Battcock e Azam-Ali, 1998); na Europa, pão, queijo, iogurte, enchidos, azeitonas, *pickles* e bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja, são consumidos diariamente, verificando-se também um crescente consumo de produtos à base de soja, como o tofu, o tempeh, o miso e o leite de soja, devido ao aumento da procura por uma alimentação saudável e ao conseqüente aumento de pessoas vegetarianas.

Tabela 1 - Alimentos fermentados típicos de diversas regiões do Mundo.

Alimento fermentado	Substrato	Região
Azeitonas	Azeitonas imersas em Salmoura	Sul da Europa
Kimchi	Couve, rabanete	Coreia, China
Chouxcroute	Couve branca	Europa, EUA, Canadá, Austrália
Dawadawa	Alfarroba	Gana
Tempeh	Soja	Indonésia, Holanda, Japão, EUA
Miso	Soja	Japão
Kinema	Soja	Índia, Nepal, Butão
Ogi	Milho, sorgo, milho-painço	Nigéria
Pão de centeio	Centeio	Dinamarca
Airag	Leite de égua ou camela	Mongólia
Kefir	Leite de vaca, cabra ou ovelha, grãos de <i>kefir</i>	Rússia, Europa, Médio Oriente, África do Norte
Manteiga	Leite animal	Mundialmente
Queijo	Leite animal	Mundialmente
Gulbi	Marisco	Coreia
Budu	Anchovas	Malásia
Pedah	Cavala	Indonésia
Salame	Carne de porco	Europa
Presunto	Carne de porco curada	Espanha, Itália
Alheira	Carne de porco ou de vaca	Norte de Portugal
Gari	Raízes de mandioca	África
Chickwangué	Raízes de mandioca	Congo
Kombucha	Chá	China (Tibete), Índia
Chuk	Frutos	Nepal, Índia

Fonte: Tamang e Kailasapathy, 2010

2.1.3. Tipos de alimentos fermentados

Os vários tipos de fermentações podem classificar-se com base no estado físico do substrato como fermentações em estado sólido (é o caso do *tempeh*), fermentações em estado líquido (por exemplo, o *shoyu* e o molho de soja) e fermentações em estado semi-sólido (como o *kinema*). As fermentações podem ainda classificar-se com base no tipo de microbiota envolvida como sendo: 1) fermentações naturais ou espontâneas, ou seja, as matérias-primas são fermentadas pela microflora nelas presentes ou presentes no meio ambiente (por exemplo, o *gundruk* ou a *chouxcroute* caseira), e 2) fermentações controladas, onde são utilizadas culturas de arranque. Por sua vez, a fermentação controlada pode ser de 2 tipos: 1) fermentação de monocultura, em que só se utiliza uma cultura pura de microrganismos (é o caso do *natto*); e 2) fermentação multicultural, em que se utiliza uma cultura de 2 ou mais estirpes de microrganismos (por exemplo, o queijo, o saké e muitas outras) (Tamang e Kailasapathy, 2010).

No Este e Sudeste Asiático, os microrganismos predominantemente usados na fermentação são fungos filamentosos (como *Aspergillus oryzae*, usado na produção de saké, miso e *soyu*, e *Rhizopus oligosporus*, usado na produção de tempeh), enquanto em África, na Europa, Austrália e América do Norte se utilizam predominantemente bactérias ou misturas de bactérias e leveduras (Tamang e Kailasapathy, 2010).

Segundo Tamang e Kailasapathy (2010), de acordo com o tipo de substratos que lhes dão origem, os alimentos fermentados não alcoólicos podem ser divididos em 8 grandes grupos: 1) fermentados à base de vegetais, 2) fermentados à base de soja e outras leguminosas, 3) fermentados à base de cereais, 4) fermentados à base de leite, como o queijo ou o iogurte, 5) fermentados à base de peixe, 6) fermentados à base de carnes, 7) fermentados à base de raízes/tubérculo, e 8) produtos fermentados diversos.

2.1.4. Propriedades dos alimentos fermentados

Os microrganismos envolvidos no processo fermentativo dos alimentos são responsáveis pela melhoria das suas propriedades comparativamente às propriedades da matéria-prima que lhes deu origem, quer em termos de conservação quer de propriedades nutricionais e organolépticas.

É através da fermentação que há um aumento no poder de conservação dos alimentos e, por isso, da sua segurança microbiológica: a oxidação inicial de hidratos de carbono e seus derivados não só diminui a fonte de carbono disponível para o seu crescimento como gera como produtos finais ácidos (lático ou acético), álcool e dióxido de carbono, com ação antimicrobiana, os quais vão controlar o crescimento de microrganismos patogénicos e de alteração dos alimentos (Caplice e Fitzgerald, 1999). Atualmente estão disponíveis culturas especializadas que contêm microrganismos produtores de agentes antimicrobianos específicos nos alimentos, que fornecem uma segurança extra e um tempo de prateleira prolongado nesses alimentos (Hutkins, 2006).

Existem numerosas evidências sobre o papel do processo fermentativo no aumento do valor nutricional, da digestibilidade e da funcionalidade dos alimentos, e, conseqüentemente, na sua importância para a saúde humana, como por exemplo:

- Os indivíduos com intolerância à lactose (ou seja, não produzem a enzima β -galactosidase responsável pela digestão da lactose) podem consumir iogurte, produto obtido a partir da fermentação de leite, com uma redução dos sintomas desagradáveis, tendo, ao mesmo tempo, a possibilidade de obter os benefícios nutricionais contidos no leite, como o cálcio, proteínas de elevada qualidade e vitaminas do complexo B (Hutkins, 2006);

- Durante a fermentação de leguminosas como a soja (ricas em proteínas) as proteínas complexas são transformadas em compostos (péptidos) mais facilmente digestíveis, produzindo-se alimentos de elevado valor proteico como o miso e o tempeh, menos indigestos que na forma crua ou cozinhada não-fermentada (Katz, 2003; Nout e Kiers, 2005; Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005);
- A fermentação também é responsável pelo aumento da biodisponibilidade e absorção de minerais e vitaminas, bem como pela redução ou eliminação de fatores antinutricionais, como o ácido fítico e inibidores da tripsina (presentes, por exemplo, na soja), e ainda pela formação de compostos antioxidantes, o que não só aumenta o valor nutricional dos alimentos como também a sua funcionalidade (Caplice e Fitzgerald, 1999; Katz, 2003; Nout e Kiers, 2005);
- Compostos formados durante a fermentação, como é o caso dos compostos fenólicos, mostraram ter atividade antioxidante, ou seja, atuam contra os radicais livres das células do organismo (Katz, 2003) e, por isso, podem reduzir o risco de cancro e doenças cardíacas (Hutkins, 2006);
- Um estudo levado a cabo na Tanzânia mostrou que a taxa de sobrevivência infantil aumentou uma vez que os bebés alimentados com papas fermentadas sofreram menos episódios de diarreia do que aqueles alimentados com papas não fermentadas, o que comprova que os alimentos fermentados promovem a saúde intestinal, ajudando no controlo de doenças digestivas, como a diarreia e a disenteria (doença inflamatória do intestino) (Katz, 2003);
- Recentemente, investigadores da Universidade de Cambridge afirmaram que o consumo regular de alimentos fermentados de baixas calorias, como o iogurte ou o queijo fresco, pode reduzir até 25% o risco de se desenvolver diabetes tipo 2, ao longo de 11 anos (Lambert, 2014);
- Vários estudos têm, também, comprovado que o consumo de produtos fermentados à base de leite e de grãos integrais diminui o teor de colesterol LDL do sangue e, conseqüentemente, o risco de doenças como hipertensão, aterosclerose, hipercolesterolemia e, até mesmo, AVC (Mann e Spoerry, 1974, citado por Tamang e Kailasapathy, 2010; Truswell, 2002, citado por Tamang e Kailasapathy, 2010; Anderson, 2003, citado por Tamang e Kailasapathy, 2010).

Outra propriedade dos alimentos sujeitos ao processo de fermentação é a melhoria e diversificação das suas características organolépticas. Durante a fermentação, os microrganismos têm a importante função de sintetizar enzimas responsáveis pela degradação de macromoléculas de baixo peso molecular, levando à solubilização das paredes celulares e do material intracelular e, conseqüentemente à formação da textura, do *flavour* e do aroma desejáveis no produto final, propriedades estas muito diferentes da matéria-prima inicial (Nout e Kiers, 2005). A elevada diversidade de compostos aromáticos que se formam durante a

fermentação leva a que uma só matéria-prima dê origem a vários produtos fermentados com diferentes características organolépticas, como por exemplo, o leite que dá origem a queijo e iogurte, a carne que dá origem a diferentes enchidos, e a soja a partir da qual se produzem alimentos como o tempeh, o tofu e o miso, todos eles com diferentes propriedades de *flavour*, aroma e textura.

2.1.5. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é uma técnica alternativa de processamento de uma grande variedade de leguminosas e/ou cereais com o objetivo de melhorar a sua qualidade nutricional e de obter produtos comestíveis com características sensoriais palatáveis (Reyes-Moreno *et al.*, 2004; Angulo-Bejarano *et al.*, 2008).

Existem microrganismos, nomeadamente fungos filamentosos, que se multiplicam melhor e produzem maior quantidade de hidrolases extracelulares em substratos sólidos (por exemplo, farelo de trigo e polpa de beterraba) do que em cultura líquida ou submersa (Spencer-Martins e Sá-Nogueira, 2003), como é o caso do fungo utilizado na produção de tempeh, *Rhizopus oligosporus*, e do utilizado na produção de miso, *Aspergillus oryzae*. Tal como o tempeh existem outros alimentos produzidos pelo processo de fermentação em estado sólido tais como o miso, o *natto* e a chouxcroute. O miso é obtido através da fermentação de uma mistura de feijões de soja previamente demolidos, cozidos a vapor e arrefecidos, sal e koji, o qual se obtém através da incubação, durante 40 a 48 horas em ambiente quente (30 – 40 °C) e húmido, de arroz ou cevada demolidos, cozidos a vapor, arrefecidos e inoculados com *Aspergillus oryzae* (Hutkins, 2006). À mistura de soja, sal e koji são adicionadas as leveduras halotolerantes *Zygosaccharomyces rouxii* e/ou *Candida versatilis* (Tamang e Kailasapathy, 2010), sendo depois incubada a 28 – 30 °C durante um tempo que pode variar desde menos de 1 mês até 2 anos (Hutkins, 2006). O *natto* é obtido através da inoculação dos feijões de soja, previamente preparados de forma semelhante à que ocorre no miso, com esporos de *Bacillus subtilis* var. *natto* e posterior embalamento, incubação a 40 °C durante 16 a 20 h e, por fim, arrefecimento entre 2 e 4 °C para maturação. Ambos os produtos orientais são principalmente consumidos no Japão. Já a chouxcroute, alimento essencialmente consumido nos EUA, na Europa Central e no Canadá, é produzida pela fermentação de couve branca finamente cortada e misturada com sal em recipientes com pouco ou nenhum oxigénio, levada a cabo por bactérias lácticas naturalmente presentes na couve, sendo as principais *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, e *Pedococcus pentosaceus* (Hutkins, 2006; Tamang e Kailasapathy, 2010).

2.2. Tempeh

2.2.1. Origem, definição e história

O tempeh, ou tempé, é um alimento fermentado que foi desenvolvido há alguns séculos atrás na ilha de Java, Indonésia, e onde atualmente faz parte da dieta diária. Originalmente, é obtido através da fermentação de feijões de soja pelo fungo filamentoso *Rhizopus oligosporus* (sendo conhecido por tempeh *kedele*) obtido a partir das folhas de hibisco usadas para envolver os feijões de soja, o qual desempenha um papel fundamental no que toca às características organolépticas e ao valor nutricional do produto final. O tempeh (Figura 1a) pode, então, ser definido como uma “massa” sólida e compacta de feijões de soja hidratados e cozidos envolvidos pelo micélio branco produzido pelo fungo, suficientemente coesa para ser trabalhada em termos de cozinha, como representado na figura 1b (Kuswanto, 2005).



Figura 1 - Tempeh cru (a) e tempeh frito (b).

Segundo Nout e Kiers (2005), o primeiro tempeh terá sido obtido a partir do resíduo da extração de leite de soja para fabrico de tofu, designado “okara”. Conhecido como “alimento dos pobres”, o tempeh serviu de alimento de sobrevivência aos prisioneiros americanos da 2ª Guerra Mundial, principalmente aos que sofriam de disenteria, uma vez que estes não digeriam os feijões de soja, ao contrário do que acontecia com o tempeh. Este foi o primeiro indício relativo ao tempeh no que diz respeito à capacidade de aumento da digestibilidade por parte do consumidor (Kuswanto, 2005).

O tempeh não deve ser consumido cru pois é no momento da cozedura que se desencadeiam as reações de Maillard responsáveis pelo desenvolvimento do *flavour* agradável semelhante ao da carne assada (Hutkins, 2006). Assim, é normalmente consumido frito em azeite (Figura 1b), refogado, ou utilizado como substituto da carne em guisados e sopas que contêm batatas, pimentos ou outros vegetais (Steinkraus, 1996).

2.2.2. Diversidade de tempeh

De forma a promover a utilização de leguminosas alternativas e expandir o acesso dos consumidores a fontes de proteína de baixo custo, alguns produtores apostaram na produção de tempeh utilizando como matéria-prima outras leguminosas para além dos feijões de soja,

e também alguns cereais, como tremçoço doce (*Lupinus angustifolius* L.), trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), feijão-frade (*Vigna sinensis*), fava (*Vicia faba*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ou misturas destes (Kuswanto, 2005). A tabela 2 mostra outros tipos de tempeh e a respetiva matéria-prima que lhes deu origem.

Tabela 2 - Diferentes tipos de tempeh e respetivas matérias-primas.

Matéria-prima	Tipo de tempeh
Feijão-veludo/Feijão-mucuna (<i>Mucuna pruriens</i>)	<i>Benguk</i>
Côco	<i>Bongkrek</i>
Okara	<i>Gembus</i>
Ervilha d'Angola/Feijão-guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	<i>Gude</i>
Feijão-alado (<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>)	<i>Kecipir</i>
Feijão-espada (<i>Canavalia gladiata</i>)	<i>Koro</i>
Leucena (<i>Leucanea leucocefala</i>)	<i>Lamtoro</i>
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	<i>Oncom</i>

Fonte: Steinkraus, 1996

Na Austrália, o tremçoço tem sido testado como potencial substituto da soja na produção de tempeh uma vez que é uma leguminosa mais barata que a soja, por isso os custos de produção seriam reduzidos, mantendo-se o elevado valor nutricional e efeitos benéficos para a saúde (The Jakarta Post, 2010). O passo inicial foi utilizar 30% de tremçoço e 70% de soja, embora o objectivo final seja produzir um tempeh 100 % tremçoço. Este tempeh soja-tremçoço foi bem aceite pela comunidade indonésia (Baxter, 2011). No entanto, existem várias etapas a ultrapassar. A primeira é o desenvolvimento de um inóculo capaz de produzir um tempeh 100% tremçoço em larga-escala, que tem vindo a ser feito no *Indonesian Institute of Sciences* (LIPI) (The Jakarta Post, 2010). Outra etapa a ultrapassar é o processo de descasque dos tremçoços: no Departamento de Agricultura e Alimentação, na Austrália Ocidental, procedeu-se ao descasque mecânico e à remoção manual dos cotilédones de má qualidade, o qual mostrou ser um processo demorado e que limita a quantidade de tremçoço de qualidade obtido. Por último, existe o problema da aceitação do produto nos mercados indonésios, pois o tempeh 100% tremçoço é amarelo, assemelhando-se ao tempeh de soja quando se torna “velho” ou estragado. Para contornar este problema sugere-se que os comerciantes apelidam o produto de “Tempeh de tremçoço amarelo”, pois a palavra “amarelo” em conexão com o tremçoço torna mais claro que se trata de um tempeh diferente do original de soja, ou então, também se pode informar os consumidores dos efeitos benéficos do tremçoço, incentivando-os a provar o tempeh de tremçoço (Baxter, 2011).

2.2.3. Evolução da produção e do consumo

A crescente preocupação dos consumidores relativamente à saúde e a consequente procura por diversidade de alimentos funcionais e com agradáveis características organolépticas têm levado à expansão da produção e do consumo de tempeh para além do local de origem em países como Malásia, Tailândia, Vietname, Holanda, Alemanha, Canadá e EUA. Neste último, por exemplo, a popularidade do consumo de tempeh deve-se, não só às suas propriedades nutricionais, mas, essencialmente, ao seu interesse pela cozinha vegetariana e por produtos alternativos não-cárneos (Hutkins, 2006).

No entanto, a Indonésia continua a ser, de longe, o principal produtor e consumidor mundial de tempeh, sendo o consumo *per capita* de 15 g/pessoa/dia (Hutkins, 2006), e o consumo total de 20 000 toneladas/semana (1 040 000 ton/ano) (Kuswanto, 2005). Embora o processo de produção de tempeh tenha vindo a ser industrializado, as produções caseiras e as pequenas “fábricas de campo” são responsáveis pela produção de mais de 500 milhões de quilogramas de tempeh por ano (Hutkins, 2006).

2.2.4. Matérias-primas: Soja, ervilha e tremçoço

Maioritariamente, o tempeh é feito a partir da fermentação de leguminosas, embora cada vez mais se utilizem também cereais ou, ainda, misturas de leguminosas com cereais.

As leguminosas são uma família (*Fabaceae* ou *Leguminosae*) do reino *Plantae* cujo seu cultivo e utilização na alimentação data de há milhares de anos, desde a mais antiga prática da agricultura. Estas são um importante componente alimentar em países em desenvolvimento dos continentes africano, asiático e latino-americano, uma vez que servem como valiosas fontes proteicas de custo reduzido comparativamente à carne. Em termos nutricionais, as leguminosas são uma boa fonte de proteína (embora tenham limitações relacionadas com o equilíbrio aminoacídico, uma vez que têm um défice em aminoácidos sulfurosos, metionina e cisteína), vitaminas (principalmente do complexo B) e minerais, ricas em fibra, têm baixo teor de gordura (sendo 40% ácidos gordos polinsaturados) e um teor considerável de hidratos de carbono complexos (Ferreira, 1983; Amarowicz e Pegg, 2008). É de referir que o conteúdo nutricional das leguminosas secas é diferente do conteúdo nutricional das leguminosas frescas, sendo que se torna semelhante após um processo de demolha. Apesar do seu valor nutricional, as leguminosas contêm, porém, os chamados fatores antinutricionais que podem contrariar os benefícios que advêm do seu consumo. Estes fatores podem ser proteicos, que é o caso de inibidores de proteases e lectinas, ou não-proteicos, como por exemplo, alcalóides, ácido fítico, compostos fenólicos, saponinas. O ácido fítico, por exemplo, pode interferir na biodisponibilidade de minerais devido à formação de fitatos, enquanto as saponinas provocam a inibição do transporte ativo de nutrientes. (Australian Government, 2013). Processos como a demolha ou a fermentação podem inibir

ou eliminar esses mesmos fatores mas muitas vezes não são suficientes para esse efeito (Benevides *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Composição nutricional das leguminosas soja, ervilha e tremçoço.
(Valores por 100 g de parte edível)

		Soja		Ervilhas secas		Tremoço
		Grão seco cru	Grão cozido	Cruas	Cozidas	Cozido e Salgado
	Energia	378	140	306	106	117
	(kcal)					
	(kJ)	1582	586	1279	441	489
Macroconstituintes	Água	10	67	9,3	69,1	66,1
	Proteína	32,8	12,5	22,7	6,9	16,4
	Gordura Total	19,3	7,5	1,3	0,4	2,4
	Total HC disponíveis	18,3	5,6	49,4	18,1	7,2
	Amido	5,4	2	45,4	16,5	6,7
	Oligossacáridos	6,3	1,2	1,7	0,7	0
	Fibra Alimentar	14,3	5,6	15	5,1	4,8
Ácidos Gordos	Saturados	2,5	1	0,5	0,1	0,3
	Monoinsaturados	4,3	1,7	0,4	0,1	1
	Polinsaturados	11,5	4,5	0,1	0,1	0,6
	Ácido linoleico	10,4	4,1	0,1	0,1	0,5
	Colesterol	0	0	0	0	0
Vitaminas	A total (equivalentes retinol)	17 103	7 040	44	13	0
	Caroteno	0	0	262	80	0
	α-Tocoferol (Vit. E)	2,9	1	1	0,34	0,1
	Tiamina (Vit. B1)	1,2	0,3	0,88	0,11	0,1
	Riboflavina (Vit. B2)	0,49	0,14	0,3	0,07	0,01
	Niacina (Vit. B3)	1,8	0,5	2,9	1	0,5
	B6	0,6	0,16	0,13	0,36	0,12
	Folatos	328	64	33	10	110
Minerais	Na	4	1	40	253	912
	K	1 750	513	1036	270	245
	Ca	246	82	61	24	45
	P	667	235	336	110	100
	Mg	254	84	121	32	54
	Fe	8	2,6	3,7	1,4	5,5
	Zn	3,8	1,4	3,7	1	1,5

Adaptado de: Porto e Oliveira, 2006

A composição nutricional das 3 leguminosas (secas e cozidas) utilizadas neste trabalho encontra-se discriminada na tabela 3. Naturalmente, o valor nutricional da soja e da ervilha

diminui quando sujeitas a processamento térmico, contudo, não deixam de ser ótimas fontes de proteína, vitaminas e minerais, destacando-se a soja como maior fonte proteica. As frações proteicas das 3 leguminosas são constituídas essencialmente por albuminas - 10 %, 21 % e 15 % para soja, ervilha e tremoço, respetivamente - e globulinas - 90 %, 66 % e 85 % para soja, ervilha e tremoço, respetivamente (Cubero e Moreno, 1983; Australian Government, 2013). De realçar, também, que todas as leguminosas em estudo são uma boa fonte de fibra, não contendo colesterol na sua composição. Por outro lado, todas têm na sua constituição oligossacáridos, essencialmente os α -galactósidos rafinose e estaquiose, um fator antinutricional que se destaca aquando do seu consumo, pois é responsável pelo problema de flatulência. Este acontece porque o organismo humano não tem presente na sua mucosa intestinal a enzima α -galactosidase, responsável pela hidrólise desses açúcares (Jiménez-Martínez, *et al.*, 2007; Muzquiz *et al.*, 1999, citado por Muzquiz *et al.*, 2012), e, por essa razão, quando passam para o intestino grosso são fermentados pelas bactérias anaeróbias produzindo-se hidrogénio, CO₂ e vestígios de gás metano (Rochfort e Panozzo, 2007, citado por Muzquiz *et al.*, 2012). Muito embora, como se pode observar na tabela 3, estes açúcares não metabolizáveis pelo nosso organismo sejam completamente eliminados quando se procede, por exemplo, à cozedura e salga do tremoço. Já no caso da soja e, sobretudo, da ervilha, a percentagem destes açúcares que permanece após a cozedura é suficiente para provocar problemas intestinais.

Soja

A soja (*Glycine max*) teve origem na Ásia Oriental, provavelmente no norte e centro da China, e chegou à Europa no fim do século XVIII e aos EUA no início do séc. XIX (Guerreiro *et al.*, 2008). Atualmente é uma das plantas mais importantes da economia mundial e um componente fundamental na dieta tradicional de países do Este e Sudeste Asiático (Alves e Santos, 2008).

Como se pode observar na tabela 3, a soja é bastante rica em proteína (\approx 13% quando cozida), vitaminas – realçando-se a vitamina E (1 mg/100 g soja cozida), a niacina (0,5 mg/100 g soja cozida) e a tiamina (0,3 mg/100 g soja cozida) – e minerais – dos quais se destacam o potássio (513 mg/100 g soja cozida) e o fósforo (235 mg/100 g soja cozida), seguidos do magnésio (84 mg/100 g soja cozida) e do fósforo (82 mg/100 g soja cozida) (Paulo e Oliveira, 2006). Em comparação com a ervilha e o tremoço cozidos, a soja é a leguminosa que fornece maior teor de fibra alimentar (5,6 mg/100 g soja cozida). Pelo facto de conter todos os aminoácidos essenciais, a fração proteica da soja é de alto valor biológico, assemelhando-se a proteínas animais de alta qualidade, exceto no que diz respeito ao teor em aminoácidos sulfurosos (como a metionina) (Singh *et al.*, 2008), e, por isso, é uma leguminosa bastante utilizada como substituto da carne. A sua fração lipídica é composta, essencialmente, por ácidos gordos essenciais (aqueles que o organismo humano não é capaz de sintetizar),

ómega-3 (ácido α -linolénico) e ómega-6 (4,1 mg ácido linoleico/g soja cozida) (Porto e Oliveira, 2006).

Esta leguminosa é também conhecida pelos seus compostos bioativos como saponinas, ácidos fenólicos, lecitinas, fitoesteróis, isoflavonas (as principais são a genisteína e a daidzeína) (Chang *et al.*, 2009). Alguns destes compostos são fundamentais no que toca aos benefícios da soja para a saúde humana, pois diminuem o colesterol (por isso protegem contra doenças cardiovasculares), têm efeitos anticancerígeno (o qual está associado às propriedades antioxidantes da leguminosa) e anti osteoporótico (inibe a ressorção óssea e estimula a formação óssea). Por outro lado, outros compostos, como os fitatos e os inibidores de protease (inibidores de tripsina e quimiotripsina), são considerados antinutricionais uma vez que têm impacto negativo, por exemplo, na atividade de enzimas digestivas e na absorção de minerais (Head *et al.*, 1996; Lindsay e Claywell, 1998; Munro *et al.*, 2003; Omoni *et al.*, 2005; Muzquiz *et al.*, 2012).

Ervilha

A ervilha (*Pisum sativum* spp. *sativum*) deriva da forma selvagem *Pisum elatius*, natural da região oriental do Mediterrâneo e da Ásia Menor e Central. Nos dias de hoje, cultiva-se em todo o mundo, estando as maiores áreas de cultivo situadas na Europa, nos EUA e na Índia (Alves e Santos, 2008). As ervilhas na forma seca faziam já parte da cozinha medieval, cuja utilização era essencialmente em sopas e purés, e só no século XVI começaram a ser consumidas como grão fresco. Atualmente, devido à sua facilidade de congelação, são mais consumidas na versão frescas-congeladas do que secas, ou ainda em conserva (Guerreiro *et al.*, 2008).

A ervilha é uma leguminosa que tem na sua composição uma elevada quantidade de água ($\approx 69\%$) e hidratos de carbono ($\approx 18\%$), sendo a maioria amido (16,5%). Por outro lado, tem um baixo teor em proteína ($\approx 7\%$) e gordura total (0,4%). Apesar do baixo teor no aminoácido metionina, a ervilha tem um perfil satisfatório de aminoácidos essenciais e é uma boa fonte de lisina (Guerreiro *et al.*, 2008). É também uma boa fonte vitamínica, destacando-se o teor em vitaminas B3 (1 mg/100 g ervilha cozida), B6 (0,36 mg/100 g ervilha cozida) e E (0,34 mg/100 g ervilha cozida). Quanto aos minerais pode realçar-se o teor em potássio (270 mg/100 g ervilha cozida) e fósforo (110 mg/100 g ervilha cozida), seguidos de magnésio (32 mg/100 g ervilha cozida) e cálcio (24 mg/100 g ervilha cozida) (Porto e Oliveira, 2006). O elevado teor em sódio apresentado na tabela 3, deverá estar relacionado com o facto de a fonte considerar o processo de cozedura em água e sal, pois esse mesmo valor é bastante superior ao da ervilha seca crua (Porto e Oliveira, 2006).

Devido ao seu teor em compostos fenólicos (taninos e flavonoides), a ervilha é conhecida pela sua elevada atividade antioxidante (Amarowicz e Pegg, 2008).

Diretamente relacionados com a composição nutricional, os benefícios para a saúde humana provenientes do consumo de ervilha são variados (Rodet, 2006; Guerreiro *et al.*, 2008):

- ✓ Ajuda no controlo dos níveis de colesterol no sangue, devido ao teor em fibras solúveis;
- ✓ Aumento da absorção de cálcio - vitamina K;
- ✓ Ajuda no controlo da hipertensão – potássio;
- ✓ Prevenção contra a má formação óssea, a osteoporose e doenças cardiovasculares - vitamina B6 e ácido fólico;
- ✓ Prevenção contra a obstipação;
- ✓ Melhoria do funcionamento do sistema nervoso – folatos, vitaminas do complexo B e minerais.

Tremoço

O tremoço (*Lupinus*) é uma leguminosa tipicamente mediterrânica, consumida habitualmente como aperitivo após maceração em salmoura, sendo muito apreciada em Portugal. Existem mais de 300 espécies, no entanto, as mais cultivadas são: branca (*Lupinus albus*), azul (*Lupinus angustifolius*) e amarela (*Lupinus luteus*). O tremoço seco é muito rico em alcalóides naturais, substâncias azotadas não proteicas e tóxicas que lhes conferem sabor amargo. Em termos do teor em alcalóides as 3 espécies mais cultivadas podem classificar-se em amargas (algumas variedades de *L. angustifolius* com teor de alcalóides que pode variar entre 0,31 e 30%), semi-doces (*L. luteus*, variedades que têm 0,25 – 0,3% de alcalóides) e doces (*L. albus*, variedades que têm menos de 0,05% de alcalóides) (Kay, 1979; Cubero e Moreno, 1983). Devido à toxicidade dos alcalóides, o tremoço deve ser sempre cozido e sujeito ao processo de lixiviação antes do seu consumo, de modo a retirar-lhe o sabor amargo e eliminar a quantidade de alcalóides (Kay, 1979; Cubero e Moreno, 1983).

Entre as 3 leguminosas em estudo o tremoço é aquela que, após cozedura, tem maior teor de proteína ($\approx 16\%$) mas menor teor vitamínico, destacando-se a niacina (0,5 mg/100 g tremoço cozido) seguida da vitamina B6 (0,12 mg/100 g tremoço cozido). A sua fração proteica é deficiente em aminoácidos sulfurosos (metionina e cisteína) mas rica em lisina, à semelhança da ervilha (Bhat e Karim, 2009). No que aos minerais diz respeito, o tremoço apresenta elevado teor de potássio (245 mg/100 g tremoço cozido) e fósforo (100 mg/g tremoço cozido), seguidos de magnésio (54 mg/100 g tremoço cozido) e cálcio (45 mg/100 g tremoço cozido), tal como acontece na composição da soja (Porto e Oliveira, 2006).

Tal como as restantes leguminosas, o tremoço contém fatores antinutricionais, como o ácido fítico e as saponinas, embora em menores quantidades comparativamente à soja e à ervilha.

O tremçoço tem inúmeras propriedades benéficas para a saúde humana, as quais são provenientes da sua composição nutricional, como (Duranti, 2005; Rodet, 2006):

- ✓ Redução do colesterol – fibras e proteína reguladora dos recetores de LDL;
- ✓ Proteção cardiovascular;
- ✓ Redução da hipertensão – aminoácido arginina;
- ✓ Proteção contra a diabetes.

2.2.5. Microbiota do tempeh

A superfície dos feijões de soja crus contém uma variedade de bactérias Gram⁺ e Gram⁻, incluindo *Lactobacillus casei* e outras bactérias lácticas (enterococos, estafilococos, estreptococos, bacilos, e outros coliformes). Também podem estar presentes leveduras dos géneros *Pichia*, *Saccharomyces* e *Candida* (Hutkins, 2006).

A microbiota do tempeh envolve inúmeros microrganismos incluindo leveduras, bactérias, como *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*, *S. epidermis*, e fungos. Gandjar (1960), referido por Kuswanto (2005), relatou que os fungos dominantes em tempehs produzidos em 2 cidades distintas da Indonésia, Malang e Purwokerto, foram *R. oryzae* e *R. arrhizus*. No entanto, recentemente descobriu-se que os tempehs das mesmas cidades têm como fungo dominante *R. microsporus* var. *oligosporus*.

2.2.5.1. *Rhizopus oligosporus*

Rhizopus oligosporus é um fungo filamentoso de elevado interesse para a indústria alimentar devido às suas características únicas. O mesmo é considerado seguro e recebe a denominação “GRAS” (*Generally Regraded as Safe*) pela FAO, classificação dada a elementos de reconhecida segurança para utilização alimentar (Randhir *et al.*, 2004). No entanto, este fungo também tem outras aplicações, as quais incluem a produção de enzimas industriais (Jin *et al.*, 1999; Casey & Walsh, 2004) e o tratamento de efluentes e resíduos (Jin *et al.*, 1999).

Taxonomia e características morfológicas

Os fungos pertencem ao reino Fungi, o qual está dividido em 6 filos, dos quais 4 têm importância nos alimentos: Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota e Basidiomycota (Perdoncini, 2012). É no primeiro filo mencionado que se encontram alguns dos géneros de maior importância em alimentos e em fermentações alimentares, *Rhizopus* e *Mucor*.

A classificação taxonómica do fungo *Rhizopus oligosporus* está representada na tabela 4.

Tabela 4 - Classificação taxonómica de *Rhizopus oligosporus*.

Domínio	Eucarya
Reino	Fungi
Divisão	Eumycota
Filo	Zygomycota
Classe	Zygomycetes
Ordem	Mucorales
Família	Mucolaceae
Género	<i>Rhizopus</i>
Espécie	<i>Rhizopus oligosporus</i>

Fonte: <http://www.uniprot.org/taxonomy/4847>

A espécie *Rhizopus oligosporus* (Figura 2) possui células filamentosas assetadas (células contínuas que não se dividem em compartimentos), designadas por hifas, que se caracterizam pelo seu crescimento aéreo rápido, formando uma estrutura ramificada e complexa, o micélio aéreo (pois forma-se à superfície do meio de cultura, crescendo em altura). As estruturas de reprodução assexuada, os esporângios, através da clivagem do seu citoplasma originam no seu interior unidades reprodutoras, os esporos. A reprodução sexuada ocorre quando hifas opostas se fundem e formam um zigósporo, o qual, sob condições favoráveis, forma esporos que germinam para desenvolver um novo indivíduo (Pampulha e Oliveira, 2009; Perdoncini, 2012).

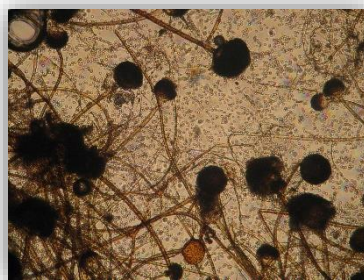


Figura 2 - Aspeto microscópico de hifas e esporos de *R. oligosporus*.

Características fisiológicas

Rhizopus oligosporus é um microrganismo eucarionte quimio-organo-heterotrófico, ou seja, depende exclusivamente do carbono orgânico como fonte de carbono e energia, e o seu habitat natural é constituído, principalmente, por solos húmidos (onde o seu papel fundamental é decompor a matéria orgânica) e com concentrações relativamente elevadas de sais e açúcares. Quando se encontra em condições de humidade adversas (ambiente seco) produz esporos mais resistentes ou entra em estado de vida latente. O seu pH ótimo de crescimento está próximo de 5 e a temperatura ótima entre 28 e 30 °C (Pampulha e Oliveira, 2009).

Para obtenção de energia, esta espécie realiza respiração celular e a sua reserva energética é sob a forma de glicogénio. Devido à rigidez da sua parede celular, a nutrição ocorre por absorção de nutrientes solúveis simples, os quais são formados pela digestão parcial das substâncias no exterior das paredes celulares através da ação de enzimas extracelulares produzidas pelo próprio *R. oligosporus* (Moraes *et al.*, 2010).

Fermentação fúngica

A utilização deste fungo na produção de tempeh está relacionada com as suas importantes características, tais como (Kuswanto, 2005):

- O rápido crescimento do micélio;
- A eficiente germinação de esporangiósporos;
- A produção de compostos com elevado poder antioxidante;
- As elevadas atividades proteolítica e lipolítica;
- A capacidade de crescer em diferentes substratos sem produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos que tornam o produto ácido;
- A capacidade de produzir o tempeh com as suas características típicas de aroma, *flavour* e textura.

O fungo *Rhizopus oligosporus* é o principal responsável pelo aumento da digestibilidade, da funcionalidade e do valor nutricional do tempeh, e pelos seus efeitos benéficos para a saúde do consumidor. Isto deve-se ao facto de, durante a fermentação, provocar alterações químicas e, ainda, sintetizar enzimas proteolíticas e lipolíticas que hidrolisam os constituintes da soja, as quais vão contribuir, igualmente, para o desenvolvimento da textura, do aroma e do *flavour* desejáveis no produto final (Hachmeister e Fung, 1993; Kuswanto, 2005).

Ibrahim e colaboradores (2002) estudaram o efeito da fermentação por *R. oligosporus* nos fatores antinutricionais presentes no feijão-frade (*Vigna unguiculata*) e observaram que o inibidor de tripsina e os oligossacáridos foram totalmente removidos e houve uma redução significativa no teor de ácido fítico após 48 h de fermentação. Jiménez-Martínez e colaboradores (2007) também avaliaram o efeito da fermentação pelo mesmo fungo no teor de oligossacáridos em 2 espécies de tremçoço (*L. mutabilis* e *L. campestris*) e em soja, tendo demonstrado que, ao fim de 48h, o teor de oligossacáridos diminuiu para valores indetermináveis na espécie *L. campestris* e na soja, e cerca de 93% na espécie *L. mutabilis*. Stodolak e colaboradores (2008) examinaram a influência da fermentação para produção de tempeh nos fatores antinutricionais e na biodisponibilidade proteica de chícharo (*Lathyrus sativus*), concluindo que o teor de inibidores de tripsina no tempeh diminuiu 99% em relação ao teor na leguminosa crua e, conseqüentemente, a disponibilidade proteica aumentou. Assim, estes estudos apoiam a afirmação de que a fermentação pela ação desta espécie

fúngica diminui os fatores antinutricionais presentes nas leguminosas cruas e, por isso, obtém-se um produto com um valor nutricional elevado.

2.2.5.2. Bactérias Ácido-Láticas

As bactérias ácido-láticas são bactérias Gram⁺, geralmente não móveis, não esporuladas, catalase e oxidase negativas, e têm como principal ou único produto fermentativo do metabolismo o ácido lático. Os principais gêneros são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* (Adams e Moss, 1995; Poffo e Silva, 2011).

Fermentação láctica

A fermentação láctica, durante a qual as bactérias ácido-láticas (BAL), como *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus dysgalactiae* (Lund *et al.*, 2000), produzem ácidos que vão provocar a diminuição do pH dos feijões de soja para o intervalo de 4,5 – 5,3, ocorre no processo de demolha e é bastante importante na produção de um tempeh seguro e de boa qualidade uma vez que vai evitar o desenvolvimento tanto de bactérias deteriorantes (como *Bacillus* e *Enterobacter*) como de potenciais patogênicos (como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*), não afetando, no entanto, o posterior desenvolvimento do fungo (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005; Hutkins, 2006).

Durante a demolha, parte da sacarose e dos açúcares não metabolizáveis estaquiose e rafinose difundem-se dos feijões para a água de demolha e são, depois, hidrolisados pela ação de invertases e glucosidases, originando glucose e frutose, que vão ser utilizadas como fonte de carbono e energia pela microbiota composta por bactérias ácido-láticas presentes naturalmente na matéria-prima (Ruiz-Téran e Owens, 1999; Hutkins, 2006).

2.2.6. Processo de produção

O processo de produção de tempeh é considerado uma fermentação em estado sólido cujo substrato originalmente utilizado é o feijão de soja, previamente preparado.

Os diversos processos de produção indígenas têm evoluído com o desenvolvimento e o estabelecimento de indústrias modernas de tempeh que se baseiam em inovações no bio processamento, com o objetivo de melhorar e assegurar a qualidade do produto final e ainda introduzir novos tipos de tempeh. As principais alterações entre o processamento indígena e o moderno são a melhoria do equipamento necessário e do método de embalagem, a manutenção de um ambiente sanitário e higiênico e a utilização de um inóculo produzido com microrganismos selecionados (Kuswanto, 2005).

Não obstante, como mostra o esquema da Figura 3, o processo geral de produção do tempeh engloba 8 passos fundamentais, quer na produção caseira quer na produção de carácter mais industrial, variando consoante o local e a dimensão da produção, ou seja, se é de pequena ou larga escala (Anexo 1).

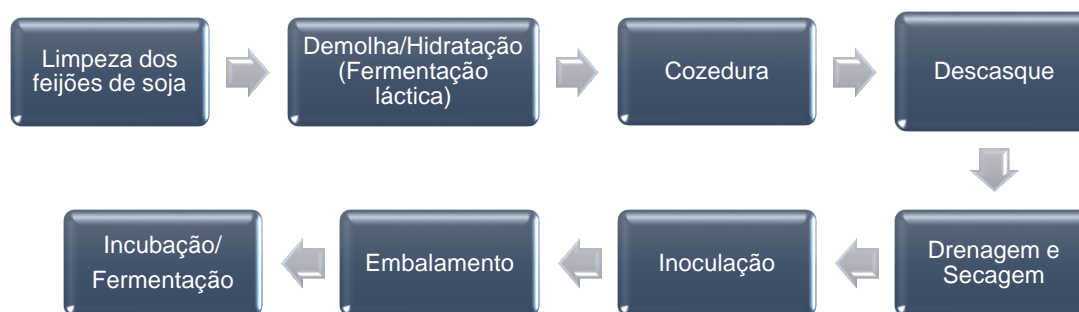


Figura 3 - Diagrama das etapas essenciais de produção de tempeh de soja.

Limpeza dos feijões de soja e demolha/hidratação (Fermentação Láctica)

Tendo como objetivo a obtenção de matéria-prima nas condições necessárias para o correto desenvolvimento do processo de obtenção de tempeh, primeiramente deve ser feita uma seleção dos grãos, removendo-se aqueles que estejam danificados ou deteriorados (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005; Hutkins, 2006).

O passo seguinte é demolhar a matéria-prima numa quantidade abundante de água fria durante um intervalo de tempo que pode variar entre 16 e 24 horas à temperatura ambiente, fazendo-a aumentar o teor de humidade e, conseqüentemente, duplicar o seu peso seco original. Esta é uma etapa muito importante uma vez que é durante a mesma que ocorre a fermentação láctica, a qual vai provocar a diminuição do pH, permitindo o controlo de microrganismos deteriorantes e patogénicos, como referido anteriormente (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005; Hutkins, 2006).

É de realçar que esta fermentação ocorre naturalmente nos trópicos mas não em climas temperados. Neste caso, é necessário adicionar à água de demolha ácidos láctico, acético ou outros ácidos orgânicos, com o objetivo de baixar o pH e inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005). Em processos modernos mais industrializados, esta adição de ácidos também é efetuada como substituição do processo de acidificação por bactérias ácido-lácticas (BAL) (Tamang e Kailasaphaty, 2010).

Cozedura

Após a demolha, a matéria-prima deve ser sujeita a uma cozedura a vapor ou em água a ferver (100 °C) durante um tempo mínimo de 60 minutos e um máximo de 2 horas, consoante o tipo de grão e garantindo que este mantém a firmeza após cozedura.

Os principais objetivos da cozedura são os seguintes:

1. Destruição de bactérias contaminantes que possam interferir na subsequente fermentação fúngica (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005; Hutkins, 2006);
2. Desnaturação do inibidor da tripsina, uma proteína da soja que actua como fator antinutricional (Hutkins, 2006);
3. Libertação de nutrientes necessários ao crescimento do fungo durante o passo seguinte (Kuswanto, 2005; Hutkins, 2006);
4. Melhoria da produção do *flavour* específico do tempeh (Kuswanto, 2005).

Produtores especializados em produção de tempeh defendem que nesta fase do processo deve ocorrer apenas uma cozedura parcial durante 30 minutos, cujo objetivo principal é amaciar os grãos, tornando o produto final com uma textura mais suave. Neste caso, a cozedura seguinte decorre entre 90 minutos a 2 horas, após o processo de descasque (Kuswanto, 2005).

Descasque

Finda a cozedura, é necessário proceder-se à remoção das cascas dos grãos para que os nutrientes estejam mais facilmente disponíveis para o desenvolvimento do fungo (Kuswanto, 2005).

Nos processos de fabrico tradicionais, o descasque é feito friccionando-se os grãos com as mãos (ou até mesmo com os pés), sendo as cascas, posteriormente, separadas por flutuação (Hutkins, 2006), designando-se por descasque por via húmida (Nout e Kier 2005; Kuswanto, 2005). Atualmente, os locais de produção em larga escala têm vindo a substituir este tipo de descasque pelo descasque por via seca, método desejável e eficiente desde que estejam disponíveis equipamentos mecânicos. Antes de qualquer hidratação, a matéria-prima é sujeita a uma secagem num secador de ar quente a 104 °C durante 10 minutos, ou é seca ao sol durante 1 a 2 horas, e arrefecida, passando depois por um moinho de rolos adequado à remoção das cascas sem que ocorra quebra dos cotilédones e, finalmente, as cascas são separadas dos cotilédones através de um separador por gravidade (Kuswanto, 2005).

Drenagem e Secagem

Depois do tradicional descasque (descasque por via húmida), a água deve escorrer-se e devem secar-se os grãos de modo a diminuir o seu teor de humidade. Este passo é de extrema importância, uma vez que um dos problemas mais comuns no processo de obtenção de tempeh é o excesso de humidade da matéria-prima que impede o correto desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, origina um produto final não comestível (Katz, 2003).

Inoculação

A inoculação é efetuada após a secagem adequada dos feijões de soja. O inóculo tradicionalmente usado na Indonésia é uma mistura de estirpes designada “*usar*” (preparada em folhas de hibisco). No entanto, existem outros tipos de inóculos: tempeh anteriormente

produzido e reduzido a pó (Kuswanto, 2005), cultura de esporos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, mais comumente utilizada numa indústria moderna (Hutkins, 2006), suspensão aquosa de esporos (Kuswanto, 2005), fungo desenvolvido e seco em grandes folhas da planta *Hibiscus tiliaceus* (Steinkraus, 1996) e, ainda, inóculo produzido através da inoculação de esporos em arroz cozido ou farinha de trigo e posterior incubação até ao desenvolvimento pretendido do fungo (Hutkins, 2006).

A quantidade típica de inóculo varia entre 10^7 a 10^8 esporos de *Rhizopus oligosporus* (cerca de 1 g) por kg de grãos demolhados e secos (Hutkins, 2006). Este é um aspeto a ter em conta pois quantidade insuficiente de inóculo ($\leq 10^2$ UFC/g) pode provocar um crescimento irregular do fungo, períodos de fermentação maiores e maiores probabilidades de deterioração microbiana, enquanto quantidade excessiva ($\geq 10^{16}$ UFC/g) pode resultar numa fermentação “violenta” acompanhada de níveis de temperatura demasiado elevados e na morte prematura do fungo (Nout e Kier, 2005).

Deve ter-se, ainda, em atenção a correta distribuição do inóculo pela superfície dos feijões de modo a que ocorra o crescimento homogéneo do micélio (Kuswanto, 2005).

De forma a garantir que, durante a fermentação fúngica, não há desenvolvimento de qualquer microrganismo indesejável que comprometa o desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus*, deve adicionar-se uma colher (de chá) de vinagre (≈ 5 mL) por cada 100 g de substrato (Katz, 2003).

Embalamento

Terminada a inoculação, a matéria-prima inoculada deve ser acondicionada de forma a permitir o desenvolvimento abundante do micélio branco, formando-se o desejado “bolo compacto” que é o tempeh.

Na Indonésia, os produtores tradicionais utilizam como forma de embalagem folhas de bananeira (Figura 4), hibiscos ou tubos de bambu, as quais fornecem um ambiente microaerófilo e húmido que beneficia o rápido crescimento do fungo (Hutkins, 2006). Entretanto, outros tipos de fermentadores têm sido testados: Martinelli e Hesseltine (1964), citado por Kuswanto (2005), relataram que, de todos os tipos de embalagem, os sacos de plástico com perfurações intervaladas de 0,25 a 1,3 cm (de modo a permitir a oxigenação necessária) são os melhores porque são mais baratos, de fácil manuseamento, não necessitam de esterilização e produzem um tempeh bastante atrativo; em 1986, Wadud e colaboradores (1986), citado por Steinkraus (1996), mostraram que tabuleiros de aço inoxidável com perfurações de 1 mm permitiram um excelente crescimento do fungo e a consequente formação de um tempeh com o aspeto desejável.



Figura 4 - Feijões de soja embalados em folhas de bananeira.

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tempeh>

Atualmente, a forma mais comumente utilizada no fabrico de tempeh é o embalamento em sacos de plástico perfurados, como representa a figura 5 (Kuswanto, 2005).



Figura 5 - Feijões de soja embalados em sacos de plástico.

Fonte: <http://daniellelevynutrition.com/2014/06/16/noble-bean-tempeh-company-montreal/>

Ainda assim, qualquer que seja a forma de embalamento utilizada, para que a fermentação ocorra da melhor maneira, terá que ter as seguintes características (Steinkraus, 1996):

- ✓ Permitir o fornecimento suficiente de oxigénio para o crescimento fúngico, evitando o excesso do mesmo que pode levar à esporulação e ao conseqüente escurecimento do micélio;
- ✓ Ter sempre a temperatura controlada;
- ✓ Permitir que a matéria-prima mantenha a sua humidade durante a fermentação;
- ✓ Não permitir qualquer água livre em contacto com os grãos, uma vez que tal favorece o desenvolvimento de bactérias contaminantes.
- ✓ Permitir uma fermentação higiénica e segura.

Incubação/Fermentação

A fermentação em estado sólido é a última etapa essencial do processo de obtenção de tempeh onde, sob condições adequadas de temperatura, humidade e oxigenação, o fungo irá desenvolver o micélio branco entre os grãos inoculados, dando origem ao produto final compacto pretendido.

A duração da fermentação vai depender da temperatura, que não deverá ser inferior a 25 °C nem superior a 40 °C para se obter um produto final de boa qualidade (Hedger, 1982).

A uma temperatura entre 25 e 30 °C, a fermentação demora 36 a 48 h (Steinkraus, 1996), enquanto, segundo Martinelli e Hesseltine (1964), citado por Kuswanto (2005), a uma temperatura entre 31 e 37 °C dura entre 22 e 24 h (Kuswanto, 2005).

Steinkraus (1996) relatou que nas primeiras horas após a inoculação ocorre germinação de esporos, tornando-se o crescimento do fungo mais lento durante as primeiras horas após essa germinação. Mais tarde, e durante 4 – 5 horas, verifica-se um rápido crescimento do fungo e um aumento contínuo da temperatura. Quando o crescimento do fungo começa a diminuir, os grãos ligam-se a uma massa sólida através do micélio, obtendo-se então o tempeh.

Durante a fermentação, o controlo dos parâmetros de temperatura (ao longo do seu crescimento o fungo também produz calor), humidade e oxigénio são determinantes na obtenção de um tempeh com aspeto e características organoléticas ótimas: 1) temperatura demasiado baixa resulta num crescimento lento do fungo enquanto temperatura excessivamente alta leva à inibição do crescimento do mesmo; 2) elevada quantidade de humidade favorece o crescimento de bactérias, mas teores de humidade muito baixos inibem completamente o crescimento micelial e favorecem a esporulação prematura (o que torna o produto mais escuro e, por isso, menos atrativo para o consumidor); e, 3) quantidade de oxigénio insuficiente inibe o crescimento do fungo, enquanto o excesso de oxigénio disponível favorece uma esporulação prematura (Steinkraus, 1996).

O produto final obtido terá que ser um “bolo” compacto com uma coloração branca e um *flavour* agradável suave que faz lembrar cogumelos (Hutkins, 2006).

2.2.7. Benefícios nutricionais e de saúde

Como referido anteriormente, o tempeh é um alimento com inúmeros benefícios nutricionais e de saúde, os quais provêm de alterações enzimáticas e químicas que ocorrem ao longo do processo de fermentação. Na tabela 5 está representada a composição nutricional do tempeh de soja.

O tempeh é uma excelente fonte proteica (19,5%), fornecendo os aminoácidos essenciais ao organismo humano (Handoyo e Morita, 2006; Babu *et al.*, 2009). Por outro lado, a hidrólise das proteínas durante a fermentação aumenta a digestibilidade das proteínas da soja (Ruiz-Téran e Owens, 1996; Astuti *et al.*, 2000; Hutkins, 2006; Jiménez-Martínez *et al.*, 2007; Nassar *et al.*, 2008), sendo o quociente de digestibilidade do tempeh de 86,1% (Kovac e Raspor, 1997).

Tabela 5 - Composição nutricional do tempeh de soja.
(Valores por 100 g de parte edível)

	Energia	(kcal)	157
Macroconstituintes	Proteína	(g)	19,5
	Lípidos	(g)	7,5
	Hidratos de carbono	(g)	9,9
	Fibra	(g)	3,2
	Cinza	(g)	1,6
	Sólidos solúveis	(g)	28,0
Vitaminas	Tiamina (Vit. B1)	(mg)	0,28
	Riboflavina (Vit. B2)	(mg)	0,65
	Niacina (Vit. B3)	(mg)	2,52
	Ácido pantoténico	(mg)	0,52
	Piridoxina (Vit. B6)	(mg)	0,83
	Biotina	(µg)	53,0
	Cianocobalamina (Vit. B12)	(µg)	0,1
	Folacina (Vit. B9)	(µg)	3,9
Minerais	Ca	(mg)	142
	P	(mg)	240
	Fe	(mg)	5

Fonte: Karyadi *et al.*, 1995, cit. por: Kuswanto, 2005

Em relação aos lípidos, Astuti e colaboradores (2000) relataram que a quantidade presente no tempeh diminui 26% relativamente aos feijões de soja cozidos não fermentados, uma vez que a lipase produzida pelo fungo durante a fermentação hidrolisa os triglicéridos em ácidos gordos livres (Ruiz-Téran e Owens, 1996). De acordo com vários autores, durante a fermentação os teores em ácido linoleico e ácido α -linolénico aumentam, enquanto o teor em ácido oleico diminui (Hering *et al.*, 1991; Bisping *et al.*, 1993). No entanto, a fração lipídica do tempeh (7,7%) caracteriza-se pelo elevado teor em ácidos gordos essenciais e baixo teor em ácidos gordos saturados (Babu *et al.*, 2009). Assim, associado ao consumo regular de tempeh há uma redução do teor de colesterol e triglicéridos no sangue, diminuindo-se o risco de doenças cardiovasculares (Kovac e Raspor, 1997; Karyadi e Lukito, 1996).

Segundo vários autores, o alimento fermentado em estudo é, também, uma boa fonte de vitaminas, essencialmente vitaminas do complexo B, como niacina (2,52 mg/100 g tempeh), piridoxina (0,83 mg/100 g tempeh), riboflavina (0,65 mg/100 g tempeh), folacina (3,9 µg/100 g tempeh) e vitamina B12 (0,1 µg/100 g tempeh) (Prinyawiwatkul *et al.*, 1996; Arcot *et al.*, 2002;

Nout e Kiers, 2005; Hutkins, 2006). O tempeh é extremamente interessante para os consumidores e nutricionistas devido à presença de vitamina B12 fisiologicamente ativa, cuja síntese se crê ser realizada por 2 bactérias presentes nos feijões de soja e na água de demolha, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii* (Steinkraus, 1996; Kovac e Raspor, 1997; Astuti *et al.*, 2000; Kuswanto, 2005; Nout e Kiers, 2005; Hutkins, 2006).

Após a fermentação dos feijões de soja, existe uma maior biodisponibilidade de minerais no tempeh, como o fósforo (240 mg/100 g tempeh), o cálcio (142 mg/100 g tempeh), o ferro (5 mg/100 g tempeh) e o zinco. Isto deve-se ao facto de haver degradação do fator anti nutricional ácido fítico (Astuti *et al.*, 2000; Hutkins, 2006), o qual tem a capacidade de formar quelantes com iões divalentes (como o cálcio e o magnésio), formando complexos solúveis resistentes ao trato intestinal que diminuem a disponibilidade de minerais (Benevides *et al.*, 2011), e formação de ácidos orgânicos (Hemalatha *et al.*, 2007). Astuti (1994) relatou que a quantidade de ferro disponível no tempeh torna-o um bom auxiliar no combate à anemia.

Para além do ácido fítico, existem outros fatores antinutricionais presentes naturalmente nos feijões de soja, os quais são removidos durante o processo de produção de tempeh, proporcionando um aumento do valor nutricional deste em relação à matéria-prima. Estes compostos são (Kovac e Raspor, 1997; Hutkins, 2006):

- Taninos – responsáveis pela redução da qualidade proteica, uma vez que se complexam às proteínas e precipitam;
- Inibidores de tripsina – classe de proteínas resistentes às enzimas digestivas do trato gastrointestinal que, conseqüentemente, interferem de forma negativa nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes (Benevides *et al.*, 2011);
- Goitrogénios – causadores de distúrbios metabólicos (Prinyawiwatkul *et al.*, 1996);
- Hemagluteninas – formadoras de coágulos no sangue;
- Oligossacáridos (estaquiose e rafinose) – responsáveis pelo problema de flatulência (Ruiz-Téran e Owens, 1999; Astuti *et al.*, 2000; Nassar *et al.*, 2008).

O tempeh é conhecido, ainda, pela sua elevada atividade antioxidante. Esta deve-se não só à presença da enzima superóxido dismutase (SOD) durante a fermentação, a qual protege as células contra a ação dos radicais livres responsáveis pela ocorrência de cancro, mas também ao seu teor em isoflavonas (McCord, 1971, cit. por: Astuti *et al.*, 2000; Babu *et al.*, 2009). As principais isoflavonas responsáveis pela atividade antioxidante do tempeh são a genisteína e a daidzeína (Murakami *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 2009). Em 1996, Esaki e colaboradores isolaram outro composto que provou ter igualmente elevado poder antioxidante, o ácido 3-hidroxiantranílico (HAA). Segundo Sheih e colaboradores (2000), as isoflavonas são responsáveis por um terço da atividade antioxidante do tempeh e os oligopéptidos provenientes da proteólise são responsáveis pelos restantes dois terços. Assim,

é devido a estes compostos que o tempeh previne contra o cancro do cólon, da próstata e da mama (Karyadi e Lukito, 1996; Astuti *et al.*, 2000; Badger *et al.*, 2005, cit. por: Babu *et al.*, 2009; Tamang e Kailasaphaty, 2010).

A par dos benefícios de saúde já mencionados, o tempeh poderá ajudar ainda na diminuição de problemas de saúde, como:

- Osteoporose – Messina e Messina (2000) relataram que as isoflavonas da soja aumentam o teor de minerais dos ossos em mulheres na pós-menopausa, diminuindo a possibilidade de aparecimento de osteoporose;
- Distúrbios digestivos (Babu *et al.*, 2009);
- Excesso de peso (Babu *et al.*, 2009);
- Sintomas de menopausa (Karyadi e Lukito, 1996; Alekel *et al.*, 2000, cit. por: Babu *et al.*, 2009).

2.2.8. Conservação

A vida útil do tempeh à temperatura ambiente é curta devido ao crescimento contínuo de fungos e bactérias, sendo que termina quando *Rhizopus oligosporus* começa a esporular e a produzir esporângios coloridos (Hutkins, 2006). A higiene adequada e a competição causada pelo fungo e as bactérias ácido-lácticas em combinação com temperaturas de armazenamento baixas são essenciais para um armazenamento seguro (Lund *et al.*, 2000).

Desta forma, se o tempeh cru não for consumido dentro de 1 – 2 dias, para que se mantenha seguro para o consumidor, deve ser conservado de várias formas:

- Desidratado: no método tradicional é seco ao sol, enquanto no moderno pode ser seco em secadores de ar quente circulante e colocado em sacos de plástico selados (Steinkraus, 1996);
- Congelado (Hutkins, 2006);
- Cozido (Hutkins, 2006) ou bem frito antes da refrigeração (Steinkraus, 1996);
- Embalado a vácuo em sacos de plásticos impermeáveis ao oxigénio (o que é feito, por exemplo, nos EUA) (Hutkins, 2006);
- E, ainda, pode ser transformado em vários alimentos processados, como alimentos vegetarianos substitutos da carne (Hutkins, 2006).

2.3. Parâmetros físicos do tempeh

2.3.1. Textura

A textura é uma propriedade que envolve vários atributos e cuja definição é complexa. De acordo com a norma ISO 11036 a textura é definida como sendo “todas as propriedades

mecânicas, geométricas ou superficiais de um produto perceptíveis através de recetores mecânicos, tácteis e, quando apropriado, visuais e auditivos”. As propriedades mecânicas estão relacionadas com a reação do produto à tensão, sendo divididas em 5 características primárias: dureza, coesividade, viscosidade, elasticidade e adesividade. As propriedades geométricas são aquelas relacionadas com o tamanho, forma e arranjo das partículas no produto, enquanto as propriedades superficiais estão relacionados com as sensações produzidas pelo teor de água e/ou gordura na boca.

A textura é particularmente importante no caso dos alimentos sólidos e é determinada pela estrutura interna do produto que, por sua vez, depende da sua composição e do processamento a que foi sujeito. Esta propriedade sensorial é, muitas vezes, fundamental na qualidade do produto e pode ser determinante na sua aceitabilidade pelo consumidor (Fellows, 2006; Sousa, 2001). Desta forma, a aceitação do tempeh por parte do consumidor está diretamente relacionada com o processamento aplicado às leguminosas, ou seja, a fermentação pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, uma vez que este vai ser o principal responsável pela textura sólida desejável do produto.

As propriedades texturais dos alimentos podem ser avaliadas através de análise sensorial, ou por métodos instrumentais, que estão relacionados com a avaliação da estrutura dos alimentos e a determinação da sua composição química. Nos métodos instrumentais, nomeadamente, a partir da utilização de um texturómetro, o principal objetivo é o contacto de uma sonda com a amostra, sendo aplicada uma força que vai deformar ou perfurar essa mesma amostra (Brennan, 1988). O texturómetro (Figura 6) é um aparelho constituído por um dinamómetro que fornece energia mecânica a velocidade constante. Daqui, resulta uma curva de força *versus* tempo ou de força *versus* distância onde se registam, de acordo com a geometria usada no ensaio, as medições dos parâmetros de textura (Sousa, 2001).

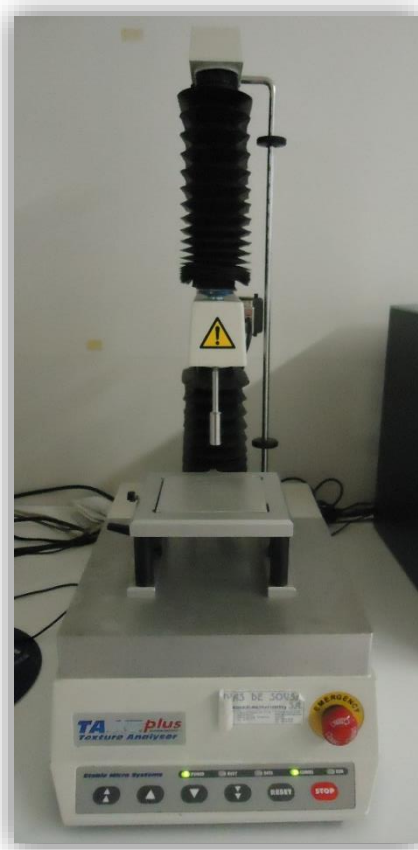


Figura 6 - Texturómetro TA.XT.Plus Texture Analyser.

Análise de perfil de textura

A análise de perfil de textura (TPA – *Texture Profile Analysis*) é um ensaio muito divulgado e trata-se de um teste imitativo pois reproduz as condições nas quais os alimentos são submetidos durante o processo de mastigação. A TPA envolve duas penetrações ou compressões pela sonda, com um tempo de espera (que permite avaliar a recuperação do material) entre elas, simulando a ação de duas dentadas no alimento, por isso, também se designa por teste das duas dentadas (*two bites*) (Sousa, 2001; Raymundo, 2003). Este teste imitativo é uma particularização dos testes empíricos e, por esta razão, todas as condições de análise deverão ser especificadas, nomeadamente as dimensões da sonda, do recipiente de análise, as dimensões da amostra a distância e a velocidade de penetração (Raymundo, 2003).

A curva típica de perfil de textura obtida está representada na figura 7.

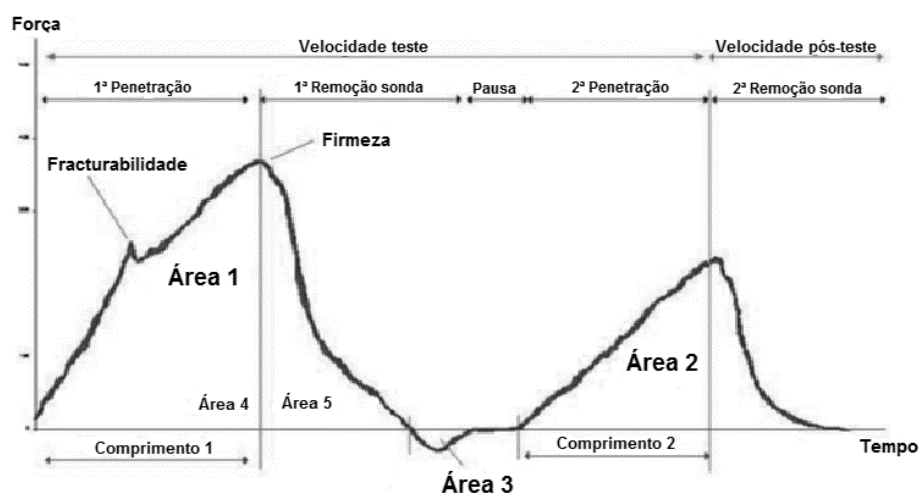


Figura 7 - Exemplo de um texturograma obtido numa análise de perfil de textura.

Adaptado de: Pereira e Sousa, 2010

A partir desta curva podem retirar-se diretamente os parâmetros primários de textura e, a partir destes, podem calcular-se os parâmetros secundários (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros característicos de textura.

	Parâmetros de textura	Definição	Termo Popular	A partir da figura 7
Primários	Dureza ou Firmeza (N ou kgf)	Força necessária para comprimir os alimentos entre os molares. Força máxima registada no 1º ciclo de penetração no texturómetro.	Macio a firme a duro	Altura do pico mais alto
	Fraturabilidade (N ou kgf)	Força à qual o material fratura. Força registada no 1º pico quando se obtêm 2 picos no 1º ciclo de penetração. Apenas existe em alguns alimentos.	Farelento, crocante, quebradiço	Altura do 1º pico
	Coesividade (Adimensional)	Forças exercidas pelas ligações internas do alimento.		Área 2/Área 1
	Adesividade (N.s ⁻¹)	Trabalho necessário para puxar o alimento a partir da superfície. É uma medida de esforço do material para que a sonda seja retirada do alimento. É dada pela área negativa do texturograma. Apenas existe em alguns alimentos.	Pegajoso	Área 3
	Elasticidade (Adimensional)	Extensão necessária para que o alimento volte ao tamanho original quando a força for removida. Está relacionada com a capacidade de recuperação do material entre o 1º e o 2º ciclos.	Plástico, elástico	Comprimento 1/Comprimento 2
Secundários	Mastigabilidade (N)	Força necessária para mastigar o alimento. É dada pela gomosidade x elasticidade.	Tenro, mastigável, duro	
	Gomosidade (N)	Força necessária para mastigar um alimento semissólido. É dada pela dureza x coesividade x 100.	Curto, farinhento, pastoso, borrachudo	

Fonte: Rao e Skinner, 1986; Brennan, 1988; Raymundo, 2003; Pereira e Sousa, 2010

2.3.2. Cor

A cor é um atributo de extrema importância na indústria alimentar. Antes de qualquer outro sentido humano, paladar, olfato ou tato, a visão é aquela que primeiro se relaciona com os alimentos e, por isso, é a base da opção de compra para o consumidor, sendo a cor

responsável por 80% do fator de consumo dos alimentos (Moritz, 2014). A cor está muitas vezes associada às condições de deterioração e, por esta razão, pode traduzir a qualidade do produto alimentar (MacDougall, 1988).

No tempeh, tal como acontece no atributo da textura, é a fermentação realizada pelo fungo *R. oligosporus* que tem o papel determinante na formação da cor, pois é o micélio fúngico que dá a cor branca característica do tempeh. Desta forma, qualquer outra cor que o tempeh aparenta à superfície poderá deixar reticente o consumidor no ato da sua compra.

A interpretação dos resultados instrumentais da cor pode ser diferente dependendo da perceção de cada indivíduo ou da condição que o mesmo se encontra em diferentes comparações visuais. Assim, a *Comission International de l'Éclairage* (CIE) definiu padrões cujo objetivo consistiu em permitir a definição da cor independentemente dos periféricos utilizados (Moritz, 2014). Para tal, elaborou, no ano de 1931, o sistema colorimétrico XYZ que representa as cores de acordo com a sua cromaticidade (eixos x e y) e a sua luminosidade (eixo Y) (Moritz, 2014). Desde então, a CIE tem vindo a modernizar as escalas e o controlo colorimétrico e, atualmente, a escala tridimensional mais utilizada, descritora dos diferentes componentes da cor, é a $L^*a^*b^*$, definida em 1976 (Francis, 1987; MacDougall, 1988; Mabon, 1993; Moritz, 2014). Na figura 8 está representado o sistema CIELab.

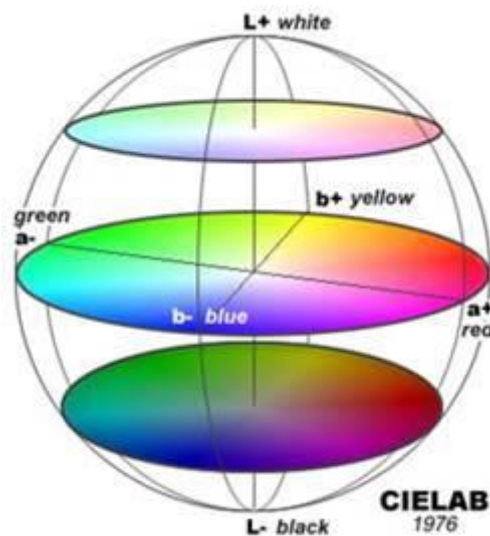


Figura 8 - Sistema CIELab.

Fonte: <http://blogs.ua.es/verduzet70/2010/11/11/retroalimentacion-ii-medida-y-especificacion-numerica-y-grafica-de-colores/>

O sistema CIELab é descrito por um diagrama tridimensional onde o espaço é definido pelas coordenadas retangulares luminosidade (L^*), componente a^* e componente b^* , e pelas coordenadas cilíndricas cromática (C^*) e tonalidade cromática (H^*). A luminosidade varia de escuro (0) a claro (100), a componente a^* varia entre verde (-60) e vermelho (+60) e a

componente b^* varia entre azul (-60) e amarelo (+60) (Francis, 1987; Mabon, 1993; Oliveira et al., 2003; Moritz, 2014).

Avaliação instrumental da cor

Os instrumentos de avaliação da cor são ferramentas efetivas na identificação dos atributos, inconsistências ou desvios da cor em relação a um padrão. Existem 2 principais tipos de instrumentos de avaliação da cor: o colorímetro e o espectrofotômetro (Konica Minolta, 2006).

O colorímetro avalia a cor de um produto através da intensidade da luz refletida, utilizando um filtro baseado no método triestímulos que mede os três componentes primários da luz – vermelho, azul e verde – correspondentes à percepção da cor pelo olho humano (Konica Minolta, 2006; Portero, 2010; Santos, 2014). Utiliza iluminantes normalizados que simulam a luz do dia: iluminante C (sem a região de comprimentos de onda UV), iluminante D65 (inclui a região de comprimentos de onda UV) e A (luz incandescente). É utilizado em produtos sólidos mas também pode medir líquidos (Santos, 2014).

Atualmente a avaliação instrumental da cor é feita por colorímetros, pois são instrumentos que, para além da fácil utilização, são portáteis, o que permite o seu uso fácil e generalizado.

2.4. Utilização de métodos instrumentais para avaliação da influência da fermentação nas propriedades físicas de produtos alimentares

O recurso a métodos instrumentais para acompanhar o processo fermentativo e estudar a sua influência nas propriedades físicas de produtos alimentares é ainda uma aplicação relativamente recente, estando os primeiros trabalhos referidos a partir do início deste século. Estas metodologias permitem avaliar o efeito de parâmetros como a temperatura de fermentação (Hayta *et al.* 2001; Haque *et al.*, 2001; Kristo *et al.*, 2003) nas propriedades reológicas de forma a estabelecer um padrão de comportamento através do qual se possa acompanhar a fermentação e/ou estabelecer o tempo e temperatura ótimos de fermentação. São exemplos disso, os trabalhos realizados por Nagaraju *et al.* (2000) e Hayta *et al.* (2001), utilizando o viscosímetro *Brookfield* para medir o índice de escoamento (n) e a consistência durante a fermentação de *idli* e de boza, e os trabalhos de Haque *et al.* (2001) e Kristo *et al.* (2003) que acompanharam a fermentação láctica avaliando a influência da temperatura na taxa de gelificação e no grau de consistência do iogurte.

No caso concreto do tempeh, embora o efeito da fermentação por *R. oligosporus* em propriedades estruturais e reológicas ainda não tenha sido amplamente estudado, Handoyo e Morita (2006) avaliaram instrumentalmente a textura (firmeza e módulo de elasticidade)

após 24 h, 48 h e 72 h de fermentação (30 °C) dos feijões de soja para produção de tempeh, tendo referido maiores valores de firmeza às 48 horas de fermentação e uma redução do módulo de elasticidade a partir das 72 horas, que atribuíram ao enfraquecimento da rede micelial e perda da capacidade de regenerar mais micélio. Este trabalho permitiu ainda comprovar a viabilidade da aplicação de métodos instrumentais para acompanhamento de fermentações sólidas como as que ocorrem durante a produção de tempeh e de outros alimentos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Neste trabalho utilizou-se um inóculo importado diretamente da Indonésia, mantido a uma temperatura de refrigeração entre 6 e 8 °C, o qual continha esporos de *Rhizopus oligosporus* misturados com farinha de arroz.

Para obtenção da cultura-mãe, utilizou-se o meio de cultura sólido MEA (*Malt Extract Agar*) (Anexo II), o qual foi anteriormente testado e comprovado ser aquele onde se obtém um crescimento e uma esporulação abundantes de *R. oligosporus*, em comparação com o meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Cruz, 2013).

Para a preparação do inóculo para produção de tempeh utilizaram-se como suporte de crescimento do fungo farinhas de trinca de arroz carolino, arroz agulha e arroz vaporizado cedidas pela empresa do sector do descasque Novarroz, e farinhas de trigo, milho e centeio, adquiridas no comércio local.

Como substrato para a produção de tempeh adquiriram-se feijão de soja seco e ervilha seca da marca PróVida nas lojas Celeiro, e tremoço cozido em salmoura num mercado local.

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos de contagem de esporos

Método de contagem de esporos em suspensão

Para se determinar a quantidade de suspensão de esporos a inocular nas farinhas, procedeu-se à contagem de esporos existentes em cada quarto de placa inoculada em suspensão, com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*, ou hemocitómetro (Anexo III). Os cálculos foram efetuados tendo em conta que o volume de suspensão na câmara de contagem é de 0,1 mm³.

Método de contagem de esporos existentes na farinha inoculada

Para a contagem de esporos existentes em 250 g de cada farinha inoculada, após trituração num copo liquidificador, suspendeu-se 0,1 g da farinha de trinca de arroz vaporizado em 1 mL de água desmineralizada estéril, 0,1 g das farinhas de trigo, trinca de arroz carolino e milho em 10 mL. Fizeram-se diluições seriadas destas até 10⁻⁸, inocularam-se 100 µL das diluições de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ em placas de Petri com meio MEA e incubaram-se em estufa a 28 °C. Quanto à farinha de trinca de arroz agulha e à farinha de centeio, suspendeu-se a mesma quantidade em 100 mL de água desmineralizada estéril, inocularam-se 100 µL das diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ em meio MEA e incubaram-se, igualmente, a 28 °C. Procedeu-se à contagem

do número de colónias em cada placa 3 dias após incubação, realizando-se os cálculos para determinar o número de UFC/g de farinha.

3.2.2. Preparação do inóculo para produção do tempeh

Preparação da “cultura-mãe”

Para preparar a cultura-mãe, aquela a partir da qual se irão reproduzir novas culturas do fungo *Rhizopus oligosporus*, suspenderam-se aproximadamente 1,7 g do inóculo importado da Indonésia em 500 mL de água desmineralizada estéril em balões de Erlenmeyer de 500 mL, fizeram-se diluições até 10^{-8} , inocularam-se (em duplicado), com o auxílio de uma pipeta 20:200, as placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio sólido MEA com 0,1 mL de suspensão cada uma, e incubaram-se em estufa à temperatura de 28 °C. Após 9 dias de incubação o fungo estava suficientemente bem esporulado nas placas. Desta forma, considerou-se como cultura-mãe a placa em que se obteve maior esporulação, a partir da qual se reproduziram mais culturas de *Rhizopus oligosporus* necessárias para a preparação da suspensão de esporos.

Produção e manutenção do inóculo

Após a replicação da cultura-mãe obtida, procedeu-se à suspensão de $\frac{1}{4}$ de micélio de uma placa seguida da contagem de esporos, de acordo com o descrito em 3.2.1. Consoante a contagem, determinada quantidade de suspensão foi inoculada nas farinhas.

Preparação das suspensões de esporos

Para preparar as suspensões de esporos utilizou-se uma placa com “cultura-mãe” que apresentava uma esporulação abundante de *R. oligosporus*. Com o auxílio de um bisturi e de uma pinça estéreis cortou-se o micélio dessa placa em 4 partes iguais e colocaram-se 3 dessas partes em tubos de polipropileno de 50 mL, separadamente. Suspendeu-se cada parte em 30 mL de água desmineralizada estéril, agitaram-se os tubos no vórtex durante 2 minutos e procedeu-se à contagem dos esporos existentes em cada suspensão utilizando-se um hemocitómetro.

De forma a otimizar a inoculação das suspensões nas diferentes farinhas, alterou-se a quantidade de água em que foi colocada cada parte do micélio em suspensão para 50 mL, bem como o método de agitação, que passou a ser manual pois, tendo-se uma maior quantidade de água, a agitação manual mostrou ser mais eficiente na homogeneização dos esporos na suspensão comparativamente à agitação no vórtex.

Preparação e conservação do inóculo

No presente trabalho, o fungo não foi inoculado diretamente na matéria-prima (soja, tremço e ervilha) mas sim em 6 tipos de farinhas previamente esterilizadas em autoclave durante 20 minutos a 121 °C, secas e colocadas em cristalizadores de 18 cm de diâmetro e

4,5 cm de altura, igualmente esterilizados. Posteriormente as farinhas foram incubadas em estufa com temperatura controlada.

Após a obtenção das 3 suspensões de esporos e a contagem do número de esporos existentes em cada uma, inoculou-se cada 250 g de farinha com um volume de suspensão de forma a obter aproximadamente 1×10^4 esporos/g para cada um dos vários tipos de farinha testada (farinhas de trinca de arroz agulha, arroz carolino e arroz vaporizado, e farinhas de milho, trigo e centeio). Esses volumes de suspensão inoculados foram pulverizados sobre a superfície das farinhas com uma pipeta de 5000, evitando o humedecimento excessivo, e, posteriormente, as placas foram tapadas e colocadas a incubar entre 28 e 30 °C, até se observar crescimento visível do micélio.

Terminado o período de incubação procedeu-se à secagem das farinhas numa estufa com circulação de ar (modelo *Memmert*) à temperatura de 50 °C durante 48 h.

De forma a otimizar a produção do inóculo este método sofreu, posteriormente, algumas alterações, nomeadamente no que diz respeito ao material onde foram colocadas as farinhas, à quantidade de água adicionada, ao tempo de incubação e à secagem das farinhas. A farinha com esporos inicialmente obtida foi triturada, tendo-se efetuado a contagem dos esporos existentes na mesma. Após a contagem misturaram-se 50 g de farinha “pré-inóculo” a 200 g de farinha estéril de forma a obter 10^7 esporos/g de farinha. Homogeneizou-se num copo liquidificador, de modo a tornar uniforme a distribuição do fungo pela farinha e eliminar os grãos maiores, e usou-se este triturado como inóculo.

Para a manutenção da sua viabilidade, os vários inóculos de 250 g foram colocados em sacos selados a vácuo e submetidos ao método de congelação até ser necessária a sua utilização.

3.2.3. Preparação da matéria-prima para produção do tempeh

Tanto o feijão de soja como a ervilha seca partilharam dos mesmos passos, a demolha, a cozedura e o descasque. O tremoço, uma vez que foi comprado já cozido, apenas foi necessário demolhar e descascar.

Os tremoços foram demolhados em quantidade de água suficiente para que ficassem totalmente cobertos. Durante a demolha foram efetuadas regulares mudanças de água com o objetivo de se remover o máximo de quantidade de sal, uma vez que este poderia afetar negativamente o crescimento do fungo durante a fermentação.

Os feijões de soja e as ervilhas secas foram demolhados também em água da torneira, sendo esta o dobro das quantidades de leguminosas, de forma a garantir a existência de água suficiente a ser absorvida pelas mesmas.

Nos 3 casos a demolha ocorreu à temperatura ambiente durante 48 h.

Após a demolha, procedeu-se à cozedura do feijão de soja e da ervilha, tendo-se escorrido a água de demolha e colocado novamente água pura. O objetivo da cozedura foi cozer as leguminosas em água a ferver, mas não em demasia, ou seja, ficarem relativamente firmes, de forma a facilitar o acesso do fungo aos substratos, bem como a hidratação e remoção da casca. Ambas as leguminosas foram cozidas apenas em água, separadamente, e não foram sujeitas a qualquer pressão, uma vez que Kumar *et al.* (2012) demonstraram que a cozedura sob pressão proporciona uma maior perda do valor nutricional da soja quando comparada com a cozedura à pressão atmosférica. Apenas houve diferença no tempo de cozedura, o qual foi de 1h30m no caso dos feijões de soja e 45 minutos no caso das ervilhas.

Após a etapa de cozedura, escoou-se a água de cozedura do feijão de soja e da ervilha e deixou-se arrefecer as leguminosas até a uma temperatura próxima da temperatura ambiente. Posteriormente, as 3 leguminosas foram descascadas manualmente.

Finda a etapa de descasque, as leguminosas foram acondicionadas em sacos *zip* herméticos e colocadas no frigorífico até à sua utilização.

3.2.4. Preparação do tempeh

Para a produção de tempeh utilizaram-se aros cilíndricos em aço inoxidável de 8 cm de diâmetro e 4 cm de altura, sacos de plástico e atilhos.

Tendo preparados a matéria-prima e o inóculo, bem como disponíveis todos os materiais necessários, procedeu-se a um primeiro método de preparação do tempeh. Neste, testaram-se 2 formas de embalagem, a quantidade de leguminosa e inóculo utilizados para cada aro e a forma de inoculação das leguminosas. Assim, pesaram-se 280 g de cada leguminosa, secaram-se e colocaram-se em sacos de plástico, separadamente e, de seguida, inoculou-se 28 g do inóculo em cada saco, de acordo com o descrito em Cruz (2013). O grão inoculado foi depois dividido ao meio e colocado em formas circulares: 1) diretamente no saco e dentro do aro; e 2) o aro dentro do saco e, posteriormente, a leguminosa inoculada. Após o embalagem, fecharam-se os sacos com atilhos e fizeram-se pequenos furos com um garfo de modo a permitir o arejamento da cultura de *Rhizopus oligosporus*. Por fim, incubaram-se os 6 tempehs preparados numa estufa a 29 °C.

Após o resultado deste método otimizou-se o tipo e a quantidade de inóculo utilizado, a forma de inoculação, a temperatura de incubação, o utensílio de perfuração para arejamento e adicionou-se, ainda, vinagre de sidra.

3.2.5. Conservação do tempeh

Após a fermentação recolheu-se o produto e conservou-se no frigorífico a uma temperatura entre 6 e 8 °C durante um período máximo de 4 semanas, por forma a seguir a evolução ao longo do armazenamento.

3.2.6. Caracterização física do tempeh

Determinação da textura

Na determinação dos parâmetros de textura para os 3 tipos de tempeh foram realizados testes de análise de perfil de textura, em penetrometria, durante 6 (no caso da ervilha) e 7 (no caso da soja e do tremço) fases de desenvolvimento da fermentação, e, ainda, após 3 tempos de conservação à temperatura de refrigeração, sendo eles 1 semana, 2 semanas e 1 mês. Para tal, utilizou-se o texturómetro *TA.XT.Plus Texture Analyser* (*Stable Micro Systems*, U.K.) com uma célula de carga de 30 kg e uma sonda cilíndrica de 11 mm de diâmetro. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: velocidade pré-teste = 2,00 mm/s, velocidade de teste = 1,00 mm/s, velocidade pós-teste = 2,00 mm/s e distância de penetração = 15 mm. Em cada fase efetuaram-se leituras dos atributos de textura em 3 amostras cilíndricas com 8 cm de diâmetro e cerca de 3 cm de altura de cada tipo de leguminosa, sendo que se realizaram 4 replicados em cada amostra.

A partir da curva obtida (força vs tempo) foi possível determinar os parâmetros primários de TPA, sendo que os mais discriminatórios, ou seja, os de maior interesse para avaliação da textura do tempeh são a firmeza e a coesividade. Na figura 9 está representado um texturograma típico do tempeh, onde se indica o pico referente ao valor da firmeza.

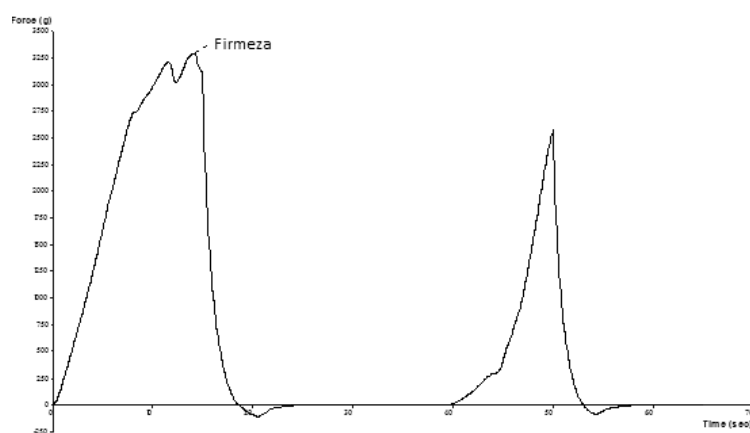


Figura 9 - Texturograma de um teste de perfil de textura de um tempeh de soja (representação do pico de firmeza).

A partir dos resultados obtidos calculou-se a média, o desvio-padrão e a percentagem de erro em cada fase de desenvolvimento e, posteriormente, procedeu-se a uma avaliação estatística dos mesmos, como explicado mais à frente em 3.2.7.

Determinação da cor

Os parâmetros de cor foram determinados nas mesmas amostras em que foram efetuados os testes de perfil de textura. Assim, para a medição dos parâmetros CIE L*a*b* utilizou-se o colorímetro MINOLTA (Modelo CR-300, Japão) (Figura 10), com uma fonte de iluminação padrão D65. Realizaram-se 8 leituras em diferentes pontos de cada amostra das diferentes fases de fermentação e conservação, incluindo a parte lateral quando a compactação da mesma assim o permitia.

Todas as leituras foram efetuadas em condições de iluminação idênticas, tendo-se usado como calibrador um padrão branco.



Figura 10 - Colorímetro MINOLTA CR-300.

A partir dos resultados obtidos calculou-se a média, o desvio-padrão e a percentagem de erro em cada fase de desenvolvimento e, posteriormente, procedeu-se a uma avaliação estatística dos mesmos, como explicado de seguida em 3.2.7.

3.2.7. Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos para os parâmetros físicos de firmeza e coesividade e para os parâmetros de cor (L*, a* e b*) nos tempes de soja, ervilha e tremçoço foi efetuado no *software* Action, acoplado ao programa Microsoft® Office Excel 2013, tendo-se efetuado a análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, o teste de Tukey para comparação dos valores médios obtidos. Os resultados dos testes foram calculados com um nível de significância de 5 % de probabilidade de erro, e considerou-se significativa a diferença entre as várias fases avaliadas sempre que $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

O presente trabalho teve como objetivos produzir um inóculo seguro, padronizado e simples de utilizar no fabrico de tempeh, com base na valorização de subprodutos da indústria alimentar, e produzir tempeh de forma padronizada e segura e com propriedades organolépticas desejáveis, através da utilização de duas leguminosas regularmente consumidas em Portugal, ervilha e tremçoço, em comparação com a matéria-prima original (feijão de soja). Posteriormente, o grande objetivo foi avaliar a influência das várias fases de fermentação e de conservação do tempeh nos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L^* , a^* e b^*) por intermédio de métodos instrumentais.

4.1. Otimização do processo de obtenção do inóculo para produção de tempeh

Numa primeira fase e no seguimento do trabalho já efetuado no laboratório de Bioenergética, procurou-se otimizar o inóculo de *R. oligosporus*, utilizando na sua produção as farinhas de trinca de arroz agulha, arroz carolino e arroz vaporizado e as farinhas de trigo, milho e centeio, partindo de uma cultura pura de *R. oligosporus* em placa de MEA. Durante esta otimização alterou-se o tipo de recipiente utilizado para colocação das farinhas e o teor de humidade das mesmas, bem como os parâmetros tempo e temperatura de incubação, de forma a obter-se um inóculo seguro e viável.

4.1.1. Obtenção da cultura de *Rhizopus oligosporus*

O primeiro passo do processo de obtenção do inóculo para produção de tempeh foi o desenvolvimento da cultura-mãe de *Rhizopus oligosporus* para posterior utilização. Pretendeu-se obter um micélio fortemente esporulado e, para tal, inoculou-se *R. oligosporus* em placas de Petri com meio MEA, e incubou-se a 28 °C.

O crescimento de hifas fúngicas, detetado pela coloração branca presente na superfície do meio em placas, começou a ser visível 4 dias depois da incubação. Após 7 dias, já se verificava uma razoável esporulação do fungo, no entanto, foram necessários mais 2 dias para que houvesse um micélio suficientemente bem esporulado e a cobrir totalmente a superfície do meio (Figura 11).

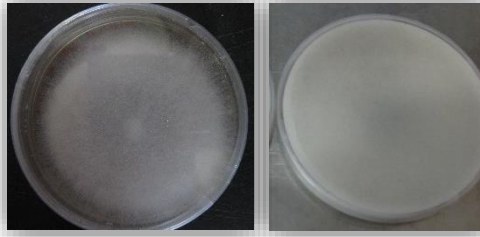


Figura 11 - Aspecto do micélio de *R. oligosporus* após 3 (esq.) e 7 (dir.) dias de incubação.

De acordo com Cruz (2013), após 7 dias o fungo já apresentava um micélio bem desenvolvido e esporulado, por isso, pode afirmar-se que este resultado foi diferente daquele que se esperava. O mesmo pode ser justificado pelo facto de terem sido utilizadas estirpes diferentes como inóculo, já que Cruz terá usado um inóculo fornecido pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação conservado a uma temperatura de -80°C .

4.1.2. Metodologia para obtenção do inóculo de *Rhizopus oligosporus*

Para obtenção de tempeh, as matérias-primas podem ser inoculadas diretamente com esporos de *R. oligosporus* (Kuswanto, 2005, Hutkins, 2006) ou com uma mistura de esporos e micélio cultivados num suporte sólido tipo farinha, que é triturada e usada posteriormente como inóculo (Rusmin e Ko, 1974; Thann e Nout, 2004; Kuswanto, 2005). Este último método apresenta enormes vantagens relativamente ao primeiro pois o facto de se utilizarem quantidades maiores torna mais fácil o manuseamento, a distribuição e a pesagem do inóculo, não exigindo equipamentos de precisão tão elevada, permitindo também uma distribuição homogénea do inóculo pela matéria-prima, o que evita a existência de zonas sem ou com um menor número de esporos, que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de processos fermentativos menos eficazes, detetados pela observação de zonas com menor densidade micelial e menor agregação da matéria-prima (Cruz, 2013).

Assim, obtida a “cultura-mãe” de *Rhizopus oligosporus* (de modo a ter-se sempre placas com culturas frescas de fungo), procedeu-se à otimização do método de inoculação em suporte sólido em pó tipo farinha, tal como anteriormente descrito por Cruz (2013). Para além da farinha de trigo, comumente utilizada, procurou-se testar outras farinhas e avaliar a eficiência de produção de esporos. As farinhas são uma boa opção pois são constituídas por cerca de 75% de hidratos de carbono e 9% de proteínas (Guerreiro *et al.*, 2008), fornecendo o azoto e a energia em quantidades favoráveis ao desenvolvimento do fungo.

Para o desenvolvimento do primeiro método, primeiramente colocaram-se 250 g de cada farinha previamente esterilizada e seca em cristalizadores de 18 cm de diâmetro e 4,5 cm de altura, tendo-se o cuidado de deixar um espaço de cabeça suficiente para promover o

crescimento superficial do fungo (até sensivelmente metade da altura da placa). As farinhas foram inoculadas com 1×10^4 esporos/g a partir das suspensões de esporos e hifas.

Passados 4 dias de incubação a 28 °C observou-se um ligeiro crescimento do fungo à superfície das farinhas. No entanto, ao décimo dia de incubação, não se registaram alterações significativas nas farinhas. A fim de verificar se o problema do baixo crescimento do fungo residia no baixo teor de humidade inicial, colocou-se em cada placa 40 mL de água desmineralizada estéril, tendo-se observado, 2 dias depois desta adição de água, um crescimento abundante do fungo na superfície das farinhas de trinca de arroz (agulha, carolino e vaporizado) e a farinha de centeio. No caso das farinhas de milho e trigo, o crescimento significativo do micélio e dos esporos só foi observado 7 dias após o aumento de humidade à superfície. Ao fim de 5 dias (farinhas de trinca de arroz e farinha de centeio) e ao fim de 7 dias (farinhas de trigo e milho), sendo o crescimento significativo, colocaram-se as placas de cristalização em estufa a 50 °C de forma a secar a farinha, inibindo o crescimento do fungo.

Após a secagem em estufa procedeu-se à contagem do número de esporos viáveis de acordo com o descrito em 3.2.1., verificando-se a perda total da viabilidade pela ausência de qualquer crescimento em placa.

Apesar de a temperatura de secagem das farinhas ter sido entre 50 – 55 °C, o facto de o tempo de secagem ter sido elevado (até 10 dias) esteve, provavelmente, na origem da perda de viabilidade dos esporos.

No segundo método aumentou-se a quantidade de água de cada suspensão de esporos para 50 mL (Figura 12), bem como a quantidade de suspensão inoculada nas farinhas. Assim, sobre a superfície de cada farinha inocularam-se 25 mL de suspensão e, posteriormente, adicionaram-se 50 mL de água desmineralizada estéril.

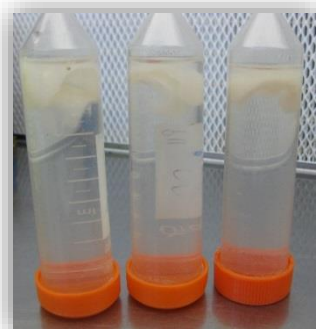


Figura 12 - Suspensões de esporos preparadas em 50 mL de água desmineralizada estéril.

Ao longo do tempo de incubação (a 28 °C) procedeu-se à limpeza da humidade criada nas tampas das placas devido à atividade metabólica do fungo, de modo a diminuir o tempo de secagem após a incubação. Assim, ao fim de 6 dias de incubação aquelas que apresentaram uma maior esporulação foram, respetivamente, as farinhas de centeio, milho e

de trinca de arroz vaporizado (Figura 13), tendo sido, de seguida, colocadas na estufa a cerca de 40 °C durante 2 dias e, posteriormente, trituradas. Já as farinhas de trigo, de trinca de arroz carolino e de arroz agulha apenas apresentaram uma boa esporulação fúngica à superfície passados 9 dias de incubação. Ao contrário das primeiras 3 estas foram imediatamente trituradas, ou seja, não foram sujeitas à etapa seguinte de secagem pois crê-se que a mesma leve à perda da viabilidade dos esporos.

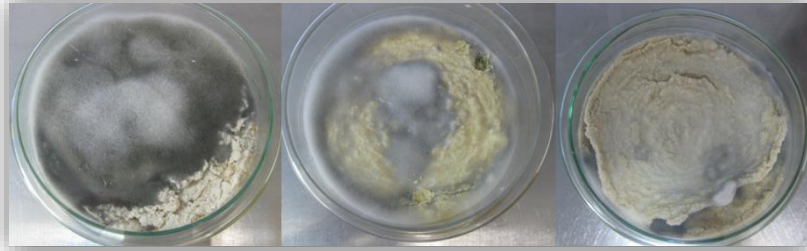


Figura 13 - Farinhas de centeio (esq.), milho e de trinca de arroz vaporizado (dir.) inoculadas com *R. oligosporus*, após 6 dias de incubação a 28 °C.

Na tentativa de reduzir o tempo de incubação e de aumentar a esporulação do fungo, introduziu-se uma nova alteração na metodologia, optando-se por colocar as farinhas não em cristalizadores mas diretamente em copos de 500 e 600 mL tapados com rolhas de algodão (Figura 14).

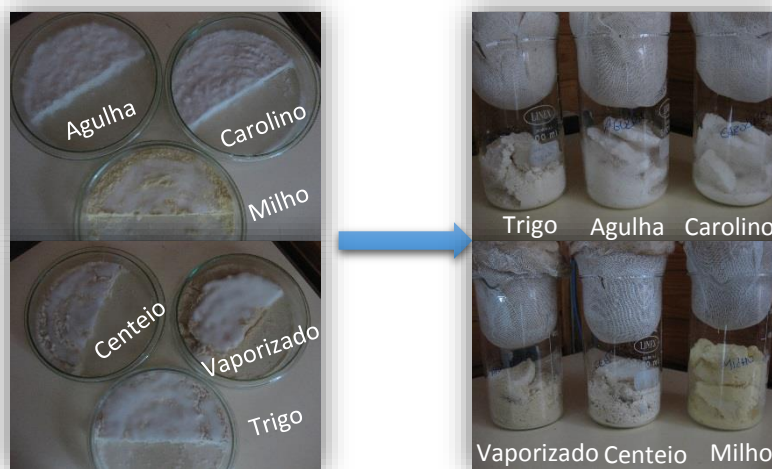


Figura 14 - Transferência de metade das farinhas dos cristalizadores para os copos.

Inoculou-se cada farinha com 25 mL da suspensão de esporos e não se adicionou água pois, sendo menor a área superficial nos copos, a superfície das farinhas iria ficar excessivamente húmida o que poderia comprometer o crescimento do fungo. De seguida taparam-se os copos com rolhas de algodão e incubaram-se a 28 °C. Desta forma, passados 5 dias de incubação retiraram-se os copos da estufa uma vez que as farinhas apresentavam uma superfície com uma boa esporulação. As farinhas que apresentaram maior esporulação foram a de centeio, seguida da de trinca de arroz carolino e de arroz agulha, e a de menor esporulação foi a de trinca de arroz vaporizado (Figura 15), o que contraria o que havia

sucedido anteriormente, em que esta foi a terceira farinha a evidenciar uma maior esporulação. O facto de o arroz vaporizado ser sujeito a um tratamento térmico severo que, provavelmente, destrói parte da sua flora microbiana nativa poderá justificar a menor esporulação do fungo registada.



Figura 15 - Farinhas de milho (esq.), trigo, centeio, trinca de arroz carolino, trinca de arroz agulha e trinca de arroz vaporizado (dir.), após 5 dias de incubação a 28 °C.

Seguidamente, as farinhas foram trituradas e prepararam-se os inóculos propriamente ditos como referido anteriormente em 3.2.2, cuja viabilidade foi testada posteriormente na produção de tempeh.

4.2. Otimização do processo fermentativo de tempeh

Numa primeira fase de otimização do processo fermentativo de tempeh começou por se testar a viabilidade do inóculo obtido em 4.1.2, bem como a forma de embalagem e a quantidade de leguminosa utilizada por cada aro inoxidável, de forma a obter-se um produto com forma e peso padrão. Procedeu-se à preparação e incubação do tempeh, utilizando-se como matéria-prima as 3 leguminosas, como descrito em 3.2.4. Seria de esperar que, ao fim de 48 h os tempehs estivessem formados. No entanto, após 4 dias à temperatura de 29 °C não se verificou qualquer aparecimento de micélio fúngico (Figura 16). As leguminosas aparentavam uma maior compactação que, provavelmente, estaria associada à excessiva quantidade de leguminosa por aro. Por sua vez, a quantidade de leguminosa utilizada por aro não terá deixado espaço livre suficiente para o crescimento micelial.



Figura 16 - Tempehs após 4 dias de fermentação a 29 °C.

Desta fase do trabalho, retirou-se que: i) o melhor método de embalagem seria colocar as leguminosas diretamente no saco e este dentro do aro; ii) as perfurações deveriam ser feitas com uma agulha pois o garfo proporciona furos com um diâmetro demasiado grande, o que poderia levar a uma esporulação prematura indesejável, como referido anteriormente em 2.2.6.; e iii) a quantidade de leguminosa por aro deveria diminuir para 140 g. Optou-se, ainda, pela adição de cerca de 15 mL de vinagre de sidra, cujo objetivo foi evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Apesar das modificações introduzidas, o tempo de desenvolvimento do fungo na leguminosa foi demasiado elevado para o pretendido, em resultado de uma provável perda de viabilidade dos esporos, sendo necessário adicionar menor porção de farinha estéril por farinha inoculada, de modo a obter-se uma quantidade de esporos/g de farinha suficiente para a produção de tempeh com as características pretendidas durante o tempo previsto por outros autores (Steinkraus, 1996; Kuswanto, 2005).

Paralelamente à utilização do inóculo produzido em laboratório, de forma a obter tempeh em tempo útil para prosseguir o trabalho, optou-se por preparar um inóculo diferente: adicionou-se cerca de 1,7 g de inóculo industrial importado da Indonésia a 40 g de farinha estéril disponível (milho, trigo e trinca de arroz agulha) e misturou-se muito bem. Adicionaram-se 10 g da mistura a 140 g de cada leguminosa, fizeram-se perfurações com uma agulha, e incubaram-se a 29 °C. Passadas 48 h, obteve-se um tempeh de soja compacto, com bom aspeto (Figura 17b), embora tenha ocorrido um pouco de esporulação, visível pelas zonas escuras (Figura 17a), associada ao excessivo arejamento. Isto deverá estar relacionado com o facto de, neste método, não se ter adicionado vinagre. No caso dos tempehs de tremço e ervilha, ao fim de 48 h não apresentaram evolução, não se observando crescimento de água, o que foi atribuído à menor humidade relativa presente, que é necessária ao desenvolvimento do fungo.



Figura 17 - Tempeh de soja após 48 h de fermentação a 29 °C:
a) Parte superior, (b) Parte lateral.

Tendo em conta estes resultados, fizeram-se alterações em relação ao inóculo, tendo-se procedido das seguintes formas:

- 1) A 140 g de cada leguminosa adicionaram-se 2 g de inóculo da Indonésia;

2) A 140 g de cada leguminosa adicionaram-se 2 g de inóculo da Indonésia mais 2 g de farinha esteril disponível.

Nas duas formas adicionaram-se 15 mL de vinagre, fizeram-se perfurações com uma agulha e incubaram-se a 29 °C.

Estabelecida a relação 2) entre inóculo e farinha esteril para a produção de tempeh, procedeu-se à otimização das condições e tempo de incubação, que foram diferentes consoante a leguminosa em causa.

Uma vez que a farinha de trinca de arroz tinha sido aquela em que se obteve maior crescimento do fungo, nos passos seguintes utilizou-se esta farinha.

Tempeh de soja

Para produção de tempeh de soja, no método seguinte juntou-se a cada quatro chávenas de leguminosa (\approx 140 g cada chávena) 30 mL de vinagre, 2 g de inóculo industrial importado da Indonésia e 2 g de farinha de trinca de arroz agulha, misturando-se tudo muito bem. Posteriormente, distribuiu-se cada chávena por saco, embalou-se nos aros, fizeram-se perfurações com uma agulha e incubou-se novamente a 29 °C.

Às 24 h de fermentação, já era visível o aparecimento de hifas fúngicas, como se pode observar na figura 18.



Figura 18 - Tempeh de soja após 24 h de fermentação a 29 °C.

E, ao fim de 48 h, o micélio branco estava homogeneamente e completamente desenvolvido (Figura 19), tendo-se obtido tempehs com uma textura consistente, e providos de *flavour* e cor desejáveis.



Figura 19 - Tempeh de soja após 48 h de fermentação a 29 °C.

Seguidamente, testou-se a produção de tempeh de soja a 37 °C. Às 24 h de fermentação não se verificou qualquer aparecimento de hifas (Figura 20a), ao contrário do que havia sucedido quando colocado a fermentar a 29 °C. E, 48 h de fermentação volvidas, os feijões de soja apresentavam-se bastante secos e soltos, e sem qualquer micélio branco visível, como se pode observar na figura 20b. Isto vai de encontro ao que Cruz (2013) avaliou, onde concluiu que a 37 °C o fungo crescia muito lentamente, de forma heterogênea, produzindo-se um tempeh seco, pouco compacto e com grãos soltos.

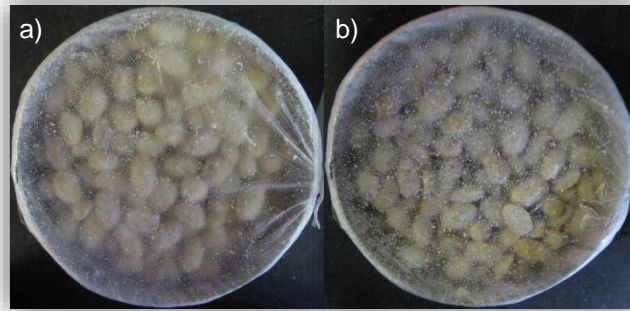


Figura 20 - Tempeh de soja após 24 h (a) e 48 h (b) de fermentação a 37 °C.

Assim, o melhor tempeh de soja foi produzido quando se misturaram 140 g de leguminosa, 2 g de inóculo e 7,5 mL de vinagre, embalaram-se em sacos perfurados com uma agulha, e colocaram-se a fermentar à temperatura de 29 °C durante 48 h.

Tempeh de ervilha

Dando continuidade à otimização do processo fermentativo de tempeh de ervilha, reiterou-se o procedimento relatado para o tempeh de soja. No entanto, ao fim de 48 h de fermentação não se observou qualquer alteração em termos de crescimento fúngico. Colocou-se a hipótese de, neste caso, ser necessário aumentar a temperatura para 37 °C, verificando-se, a esta temperatura, a existência de hifas (Figura 21).



Figura 21 - Tempeh de ervilha após 2 dias a 29 °C seguidos de 4 dias a 37 °C.

Tendo em conta os resultados obtidos, decidiu-se:

i) aumentar tanto a quantidade de inóculo como a quantidade de farinha de trinca de arroz agulha para cerca de 2,6 g, uma vez que o inóculo e a farinha estéril são adicionados sempre na mesma proporção; e,

ii) alterar a temperatura de incubação para os 37 °C.

Dado o aumento da temperatura de incubação, seria natural que ocorresse uma secagem rápida da humidade da leguminosa e, por esta razão, antes da adição do inóculo e da farinha à ervilha, pulverizou-se a ervilha com água suficiente de forma a não comprometer o crescimento fúngico.

Ao fim de 20 h de fermentação era já visível um ligeiro crescimento micelial em torno das ervilhas (Figura 22a), e às 24 h esse crescimento tornou-se mais homogéneo e abundante (Figura 22b). Comprovou-se, então, que uma temperatura mais elevada proporciona uma maior rapidez de desenvolvimento do fungo na ervilha, tal como já havia sido descrito por Martinelli e Hesseltine (1964), citado por Kuswanto (2005). Não obstante, foram necessárias, tal como no tempeh de soja, 48 h para que toda a ervilha estivesse envolvida e coberta pela camada micelial branca, formando um produto compacto e de textura consistente desejável, como mostra a figura 22c.

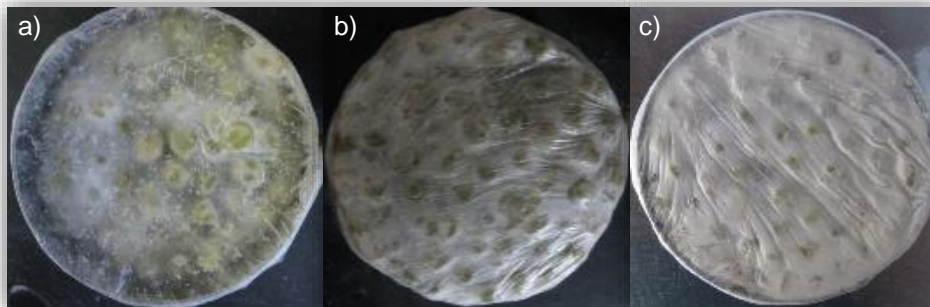


Figura 22 - Tempeh de ervilha ao fim de 20 h (a), 24 h (b) e 48 h (c) de fermentação a 37 °C.

Portanto, conseguiu-se produzir um tempeh de ervilha com cor, *flavour* e consistência expectáveis utilizando maior quantidade de inóculo ($\approx 2,6$ g) e humidade, e uma temperatura de incubação mais elevada (37 °C) do que aquela necessária na produção de tempeh de soja.

Tempeh de tremçoço

Na continuação de otimização da fermentação de tempeh de tremçoço, as alterações subsequentes foram as mesmas descritas anteriormente para os tempehs de soja e ervilha. E, de forma semelhante à que sucedeu com o tempeh de ervilha a 29 °C, ao fim de 48 h não se verificou qualquer desenvolvimento fúngico, como se pode constatar na figura 23a.

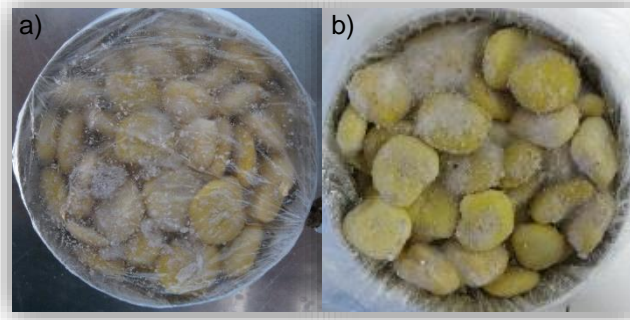


Figura 23 - Tempeh de tremço após 48 h de fermentação a 29 °C (a) e a 37 °C (b).

Perante esta situação, decidiu-se alterar a temperatura de incubação para 37 °C bem como a quantidade de humidade do tremço, tendo-se procedido à pulverização com água previamente à inoculação. Este procedimento de pulverização repetiu-se ao fim de 24 h pois o tremço mostrou estar bastante mais seco quando comparado com a ervilha nas mesmas condições, facto que estaria a comprometer o crescimento do fungo. Por conseguinte, após 48 h de fermentação, finalmente, foi possível observar-se um ligeiro crescimento de hifas fúngicas (Figura 23b). Não se tendo, ainda, obtido o resultado pretendido no tempo previsto, voltou a pulverizar-se os tremços e colocaram-se novamente a 37 °C. Volvidas 65 h de fermentação, foi possível visualizar uma boa quantidade de micélio em volta dos tremços (Figura 24a) e, passadas 72 h de fermentação observou-se o envolvimento total dos tremços pelo micélio branco (Figura 24b), dando-se por terminada a fermentação.

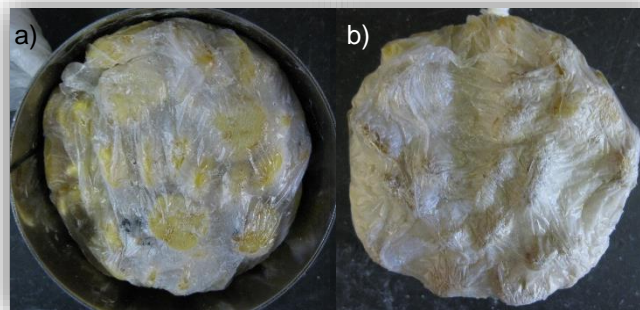


Figura 24 - Tempeh de tremço após 65 h (a) e 72 h (b) de fermentação a 37 °C.

Embora o procedimento anterior tenha permitido a produção de um tempeh de tremço com um aspeto e consistência razoáveis, constatou-se que o desenvolvimento inicial do fungo foi lento e, conseqüentemente, foram necessárias mais 24 h de fermentação em comparação com o tempo de produção dos tempehs de soja e ervilha. Por esta razão, e com o objetivo de acelerar a produção do tempeh de tremço, optou-se por aumentar a quantidade de inóculo para cerca de 2,6 g de inóculo e a quantidade de farinha estéril na mesma proporção, mantendo-se, em relação ao método anteriormente descrito, a pulverização dos tremços com água (inicialmente e após 24 h de fermentação) e a temperatura de incubação de 37 °C. O desenvolvimento do micélio foi semelhante ao ocorrido no procedimento anterior, contudo, às 65 h de fermentação a quantidade de micélio que circundava os tremços era muito maior

(Figura 25a). Ainda assim, manteve-se o tempeh a 37 °C até às 72 h de fermentação de forma a consolidar a sua textura, pois a quantidade de micélio em torno dos tremoços não teve uma diferença significativa em relação ao observado às 65 h de fermentação, como se pode verificar na figura 25b.

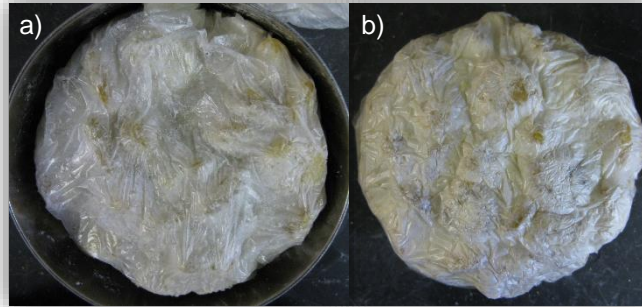


Figura 25 - Tempeh de tremoço, inoculado com $\approx 2,6$ g de inóculo, após 65 h (a) e 72 h (b) de fermentação a 37 °C.

Com estes resultados, comprovou-se que, de forma semelhante ao sucedido com a ervilha, também o tremoço permitiu uma melhor fermentação à temperatura de 37 °C, no entanto, o início do crescimento de hifas fúngicas foi mais moroso e, conseqüentemente, o tempo necessário à obtenção de um tempeh de tremoço com as características desejáveis foi maior (72 h). Este acontecimento pode ser justificado pelo facto de o tipo de proteínas presentes nos tremoços ser mais dificilmente digerível pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, e pela presença de resíduos de salmoura que inibam parcialmente o seu desenvolvimento.

4.3. Avaliação dos parâmetros físicos do tempeh

A textura e a cor são dois parâmetros bastante importantes que condicionam a aceitabilidade de um produto por parte do consumidor. No caso do tempeh, o resultado final destes 2 parâmetros físicos são essencialmente da responsabilidade da fermentação levada a cabo pelo fungo. Assim, utilizaram-se testes que permitem determinar parâmetros de textura e de cor a fim de monitorizar, com base em parâmetros mensuráveis, o desenvolvimento do tempo de fermentação. As determinações da textura e da cor também foram determinantes para avaliar a evolução do produto ao longo do processo de conservação.

O teste imitativo de análise de perfil de textura (TPA) simula movimentos mecânicos, a partir dos quais se podem avaliar parâmetros de textura que se correlacionam com as propriedades físicas percebidas sensorialmente, como consequência da estrutura interna do material (Pereira e Sousa, 2010).

Tal como descrito em 3.2.6., os parâmetros de textura mais discriminatórios no tempeh são a firmeza e a coesividade, por isso foi nestes que se centrou a avaliação da textura deste trabalho. A firmeza é a força requerida para comprimir os alimentos entre os molares e corresponde à força máxima registada no texturómetro. A coesividade está relacionada com

as forças exercidas pelas ligações internas do alimento e, no texturograma, é dada pela razão entre o trabalho realizado no 2º ciclo e o trabalho realizado no 1º ciclo (Brennan, 1988; Pereira e Sousa, 2010).

4.3.1. Avaliação da textura e da cor do tempeh ao longo da fermentação

4.3.1.1. Tempeh de soja

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempeh de soja foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h e 48 h.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 7), a figura 26 mostra o aspeto do tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.

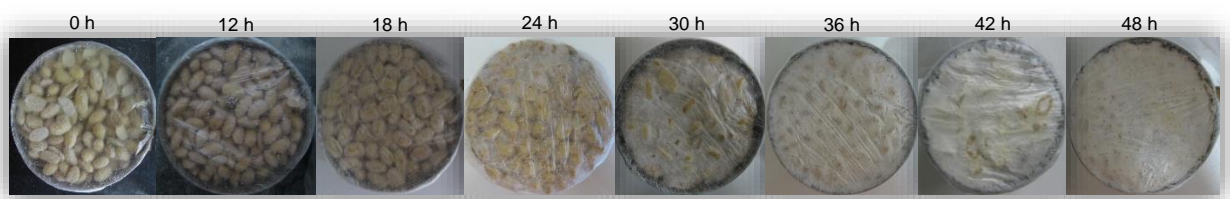


Figura 26 - Aspeto evolutivo do tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.

A figura 27 representa a evolução da firmeza do tempeh de soja ao longo da fermentação. É visível o aumento gradual da compactação que se traduz pelo aumento da firmeza, tendo-se atingido o valor máximo às 48 h, quando terminou o processo de fermentação. Este resultado justifica-se pelo facto de o fungo produzir o micélio branco, o qual vai desenvolvendo ligações entre os feijões de soja que, por sua vez, podem sofrer penetração das hifas fúngicas até 2 mm em 40 h de fermentação (Varzakas, 1998). Desta forma, cria-se uma rede micelial forte, como se pode observar na figura acima representada, responsável pelo valor de firmeza máximo obtido (25,23 N). Isto vai de encontro com o resultado obtido por Handoyo e Morita (2006) quando avaliaram a firmeza do tempeh às 24 h, 48 h e 72 h de fermentação a 30 °C, com a única diferença de que o valor máximo de firmeza obtido por estes autores foi inferior. Esta diferença poderá estar relacionada com o facto de o método instrumental utilizado pelos autores mencionados ter sido diferente, sendo a velocidade de teste de 6 mm/s, a distância de penetração 98 % da espessura da amostra e a amostra utilizada de forma cúbica (1 x 1 x 1 cm³).

Ainda assim, é de notar que a firmeza às 36 h, 42 h e 48 h não apresentou diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), o que corresponde a uma estabilização da mesma ao fim de 36 h de fermentação.

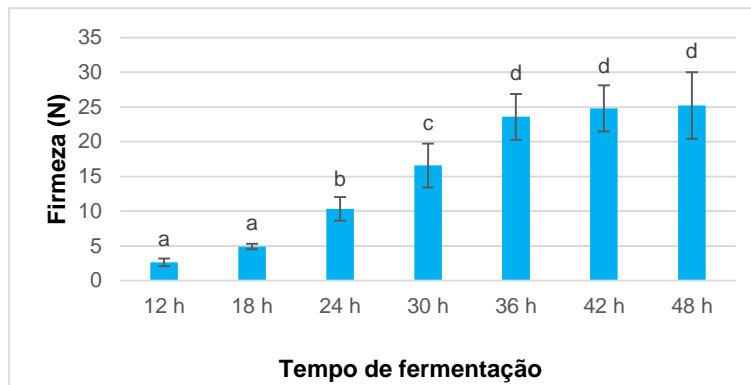


Figura 27 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Através da figura 28 pode avaliar-se a evolução da coesividade no tempeh de soja nos 7 tempos de fermentação. Tal como a firmeza, também a coesividade tende a aumentar até às 48 h de fermentação, onde atinge o valor máximo (0,33), o qual é estatisticamente diferente para os restantes tempos de fermentação ($p < 0,05$). Mais uma vez, esta evolução resultará da perda de força entre as ligações internas, ou seja, entre as ligações entre a rede micelial e os feijões de soja.

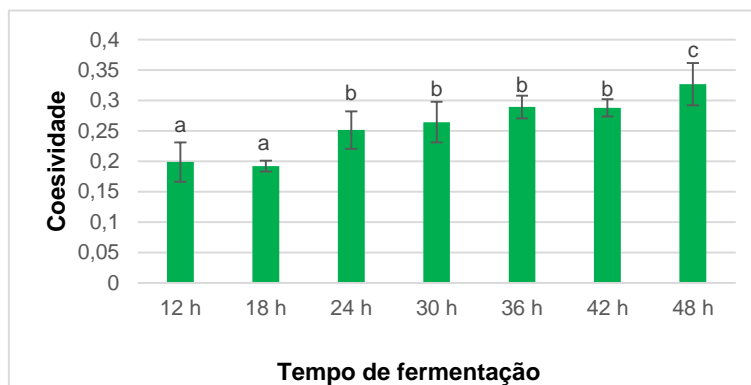


Figura 28 - Coesividade obtida para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No que diz respeito à análise instrumental da cor, esta pode ser avaliada através dos resultados dos parâmetros de luminosidade (L^*) e cromaticidade (a^* e b^*) representados no gráfico da figura 29.

Através da análise dos dados da tabela 7 do anexo IV e da observação do gráfico 29, verifica-se que entre as 12 h e as 24 h os valores de L^* não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), tal como acontece com os valores entre as 36 h e as 48 h, o que significa que a cor final do tempeh começa a estabilizar às 36 h de fermentação. Este resultado pode justificar-se através da observação da figura 28, onde nos primeiros tempos o aparecimento de hifas fúngicas para o conseqüente desenvolvimento do micélio ainda não é

visível, enquanto nos últimos tempos o desenvolvimento micelial já está bastante avançado. Sendo que o valor de L^* dá conta da variação escuro – claro da cor, é de notar a tonalidade clara no avanço da fermentação, devida à formação do micélio fúngico.

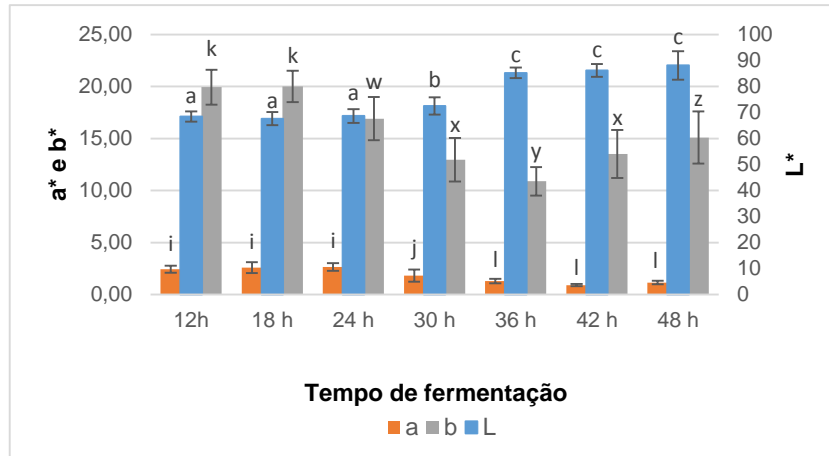


Figura 29 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de soja ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto aos valores de cromaticidade (a^* e b^*), verifica-se que tendem a diminuir até às 36 h (b^*) e 42 h (a^*), altura em que atingem o valor mínimo, coincidindo com o início da estabilização da luminosidade. Isto significa que, no final da fermentação, as amostras se apresentam nas regiões do vermelho (a^*) e do amarelo (b^*) pois, em termos instrumentais da cor, estas são características de valores positivos.

4.3.1.2. Tempeh de ervilha

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempeh de ervilha foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 12 h, 20 h, 24 h, 30 h, 44 h e 48 h.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 8), a figura 30 mostra o aspeto do tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação.

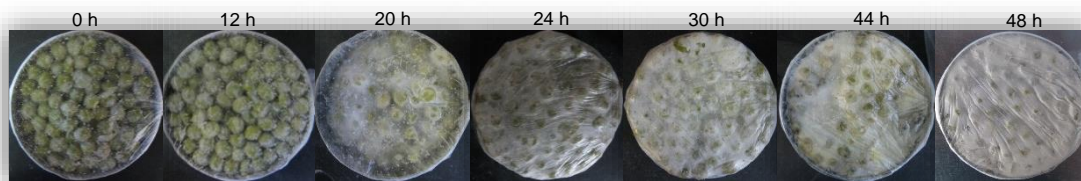


Figura 30 - Aspeto evolutivo do tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação.

A figura 31 revela a evolução da firmeza do tempeh de ervilha ao longo da fermentação. A tendência é igualmente crescente, sendo o valor máximo de firmeza 20,08 N ao fim de 48 h de fermentação total significativamente elevado ($p < 0,05$) em relação aos restantes tempos. Entre as 12 h e as 20 h observa-se uma subida significativa da firmeza, a qual é justificada pelo bom desenvolvimento do micélio, visível na figura 30. De realçar que apenas os tempos

24 h e 30 h não apresentam valores de firmeza estatisticamente diferentes, podendo relacionar-se com a variação contínua do micélio até ao final da fermentação, bastante perceptível na figura 30.

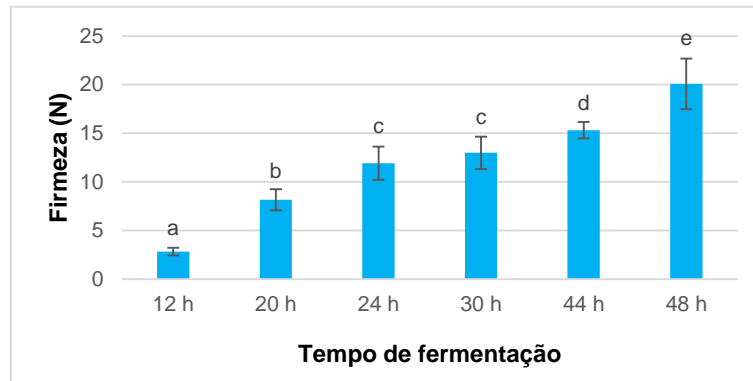


Figura 31 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Relativamente à coesividade, analisando o gráfico da figura 32 observa-se uma oscilação entre as 12 h e as 24 h, no entanto, a partir deste último tempo a coesividade aumenta, sendo o valor significativamente mais elevado ($p < 0,05$) às 48 h (0,36). Mais uma vez, analogamente ao que sucede com o tempeh de soja, o valor mais elevado de coesividade coincide com o maior valor de firmeza, ou seja, com o desenvolvimento máximo do micélio fúngico.

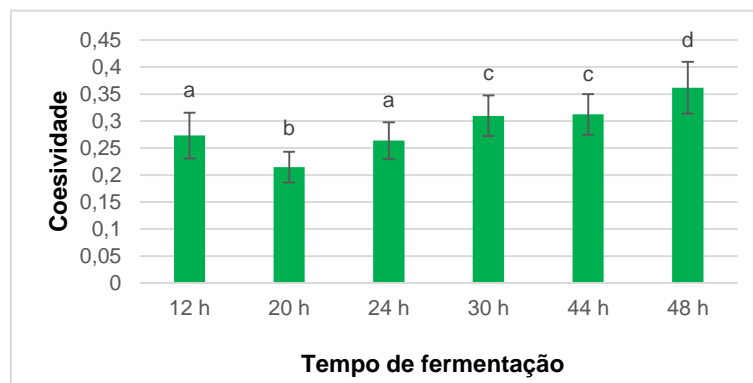


Figura 32 - Coesividade obtida para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No que concerne aos parâmetros instrumentais de cor, de acordo com a figura 33 o primeiro aumento da luminosidade ocorre quando se observa pela primeira vez o desenvolvimento de hifas, perceptível na figura 30, tal como acontece no tempeh de soja. A luminosidade aumenta de forma semelhante à do tempeh de soja, atingindo o máximo (83,58) no final da fermentação, não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre este valor e os

valores obtidos às 30 h e 44 h. Assim, pode afirmar-se que é às 48 h (fermentação completa) que o tempeh de ervilha apresenta uma cor mais clara, tal como acontece no tempeh de soja.

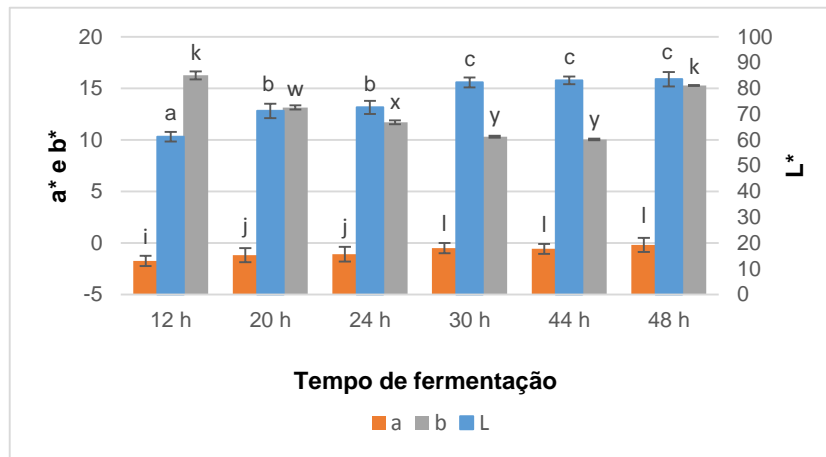


Figura 33 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de ervilha ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores negativos iniciais referentes ao parâmetro a^* tendem para a cor verde, o que seria de esperar, uma vez que nesses momentos ainda existem espaços livres de micélio, prevalecendo a cor verde da ervilha. No entanto, apesar de prevalecer negativa, a componente a^* tem uma tendência crescente ao longo da fermentação, aproximando-se do valor neutro (-0,18). Note-se que às 30 h, 44 h e 48 h de fermentação os valores de a^* não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), o que significa uma estabilização desta componente em simultâneo com a luminosidade às 30 h. Já o parâmetro b^* , embora se mantenha na região do amarelo, tende a diminuir até às 44 h, onde apresenta o valor mínimo (10,04), e sofre uma subida abrupta na última fase da fermentação.

4.3.1.3. Tempeh de tremçoço

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempeh de tremçoço foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 48 h, 65 h e 72 h.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 9), a figura 34 mostra o aspeto do tempeh de tremçoço ao longo dos tempos de fermentação.

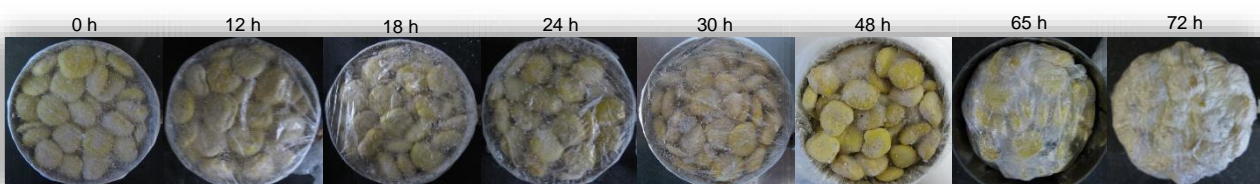


Figura 34 - Aspeto evolutivo do tempeh de tremçoço ao longo dos tempos de fermentação.

A figura 35 representa graficamente os valores da firmeza do tempeh de tremoço ao longo da fermentação. Verifica-se que a evolução é um pouco diferente daquela que ocorre nos tempehs de soja e de ervilha. Entre as 12 h e as 30 h existe uma clara oscilação de firmeza, a qual poderá estar relacionada com o facto de, durante a fermentação, o produto ter sido várias vezes pulverizado com água de modo a haver sempre disponível humidade suficiente para o crescimento do fungo, como foi referido anteriormente no subcapítulo 4.2. Por esta razão, o teor de humidade do tremoço varia bastante enquanto não começa o desenvolvimento do fungo, fazendo variar a firmeza obtida. Entre as 30 h e as 48 h há um aumento na firmeza, coincidente com o início do desenvolvimento fúngico, como se pode ver na figura 34. O valor máximo de firmeza (17,4 N) ocorre no final da fermentação, às 72 h, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos restantes valores.

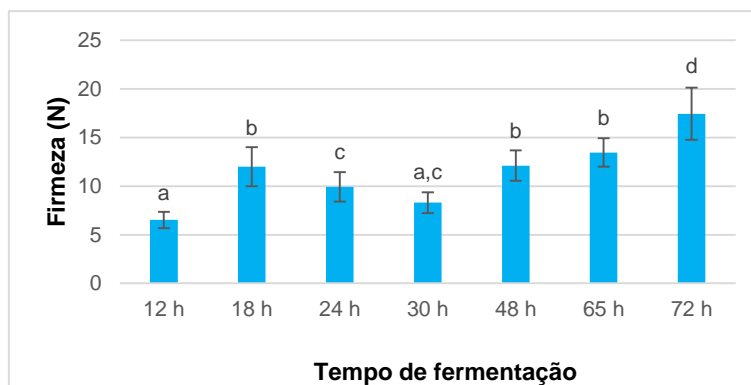


Figura 35 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de tremoço ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores obtidos para o parâmetro de coesividade estão graficamente representados na figura 36. Pode observar-se que, ao longo da fermentação, apenas os valores mínimo e máximo são significativamente diferentes dos restantes ($p < 0,05$), os quais se registaram às 24 h e às 72 h de fermentação, respetivamente. De forma geral, a coesividade tende a aumentar, apresentando o valor mais elevado quando termina a fermentação, ou seja, quando o tempeh apresenta maior compactação, tal como sucede nos tempehs de soja e de ervilha.

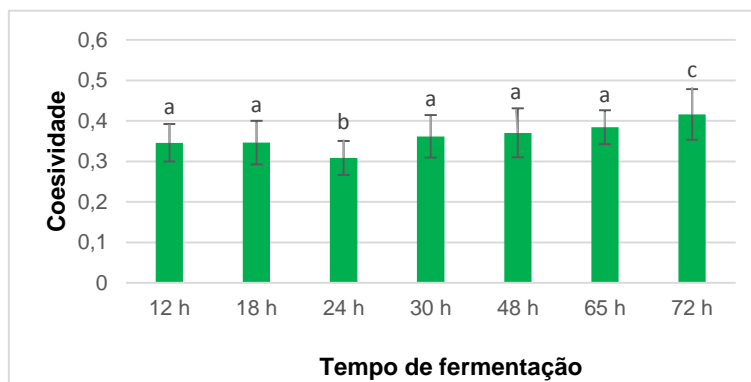


Figura 36 - Coesividade obtida para o tempeh de tremoço ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Para avaliar os resultados obtidos para os parâmetros instrumentais de cor L^* , a^* e b^* , pode observar-se a figura 37. Verifica-se a tendência crescente do valor de L^* , ou seja, tendência para a cor clara durante a fermentação, no entanto, os valores de L^* entre as 30 h e as 48 h não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Ainda assim, tal como acontece para os tempehs de soja e de ervilha, o valor máximo continua a ser no final da fermentação, o qual corresponde, neste caso, às 72 h.

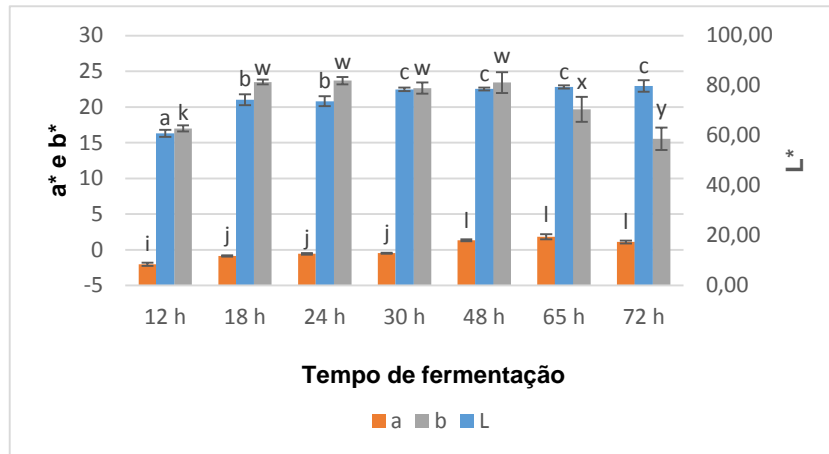


Figura 37 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de tremço ao longo dos tempos de fermentação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto aos valores de a^* , pode realçar-se a tendência crescente ao longo da fermentação, partindo de valores negativos característicos da região verde, e chegando a valores positivos da região do vermelho. Contrariamente ao que acontece nos tempehs de soja e de ervilha, a componente b^* tende a aumentar até às 48h, e posteriormente diminui até ao final da fermentação.

4.3.2. Avaliação da textura e da cor do tempeh ao longo do processo de conservação

4.3.2.1. Tempeh de soja

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempeh de soja foram registados ao fim de 1 semana, 2 semanas e 1 mês de conservação à temperatura de refrigeração.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 7), a figura 38 mostra o aspeto do tempeh de soja ao longo do processo de conservação. A semana 0 corresponde ao final da fermentação.

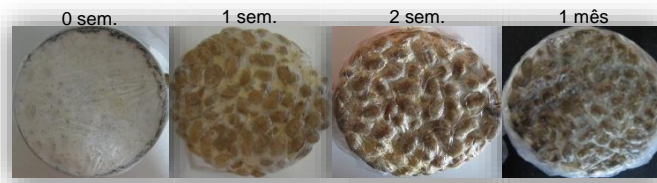


Figura 38 - Aspeto evolutivo do tempeh de soja ao longo do processo de conservação.

Durante o período de conservação a 6 – 8 °C, foi clara a perda de firmeza ao longo do tempo, sendo mais significativa ao fim de 2 semanas, como se pode observar na figura 39. Esta perda acontece porque as ligações criadas entre o micélio e os feijões de soja tornam-se cada vez mais fracas e o fungo é incapaz de regenerar micélio àquela temperatura.

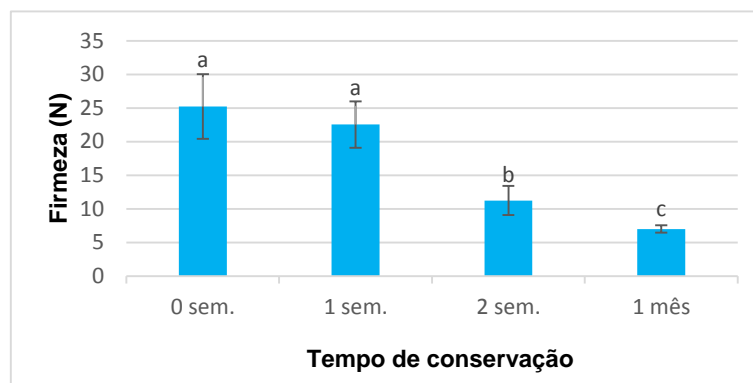


Figura 39 - Firmeza (N) obtida para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto à coesividade, a figura 40 demonstra uma diminuição pouco acentuada ao longo da refrigeração, sendo que entre as 2 semanas de refrigeração e 1 mês os valores não diferem significativamente ($p < 0,05$).

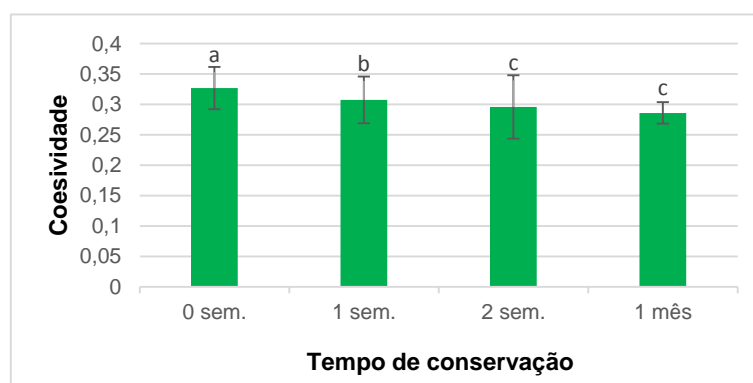


Figura 40 – Coesividade obtida para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Relativamente aos três parâmetros de cor, a sua evolução é completamente contrária à que sucede durante a fermentação (Figura 41), tal como seria de esperar. A luminosidade (L^*)

diminui bastante até atingir um mínimo de 55,25 ao fim de 1 mês de conservação, ou seja, vai aproximando-se da região escura, uma vez que o micélio vai escurecendo, como visível na figura 38. No entanto, verifica-se a maior perda de luminosidade entre a primeira e a segunda semanas de refrigeração. Já os parâmetros a^* e b^* seguem uma tendência crescente, sendo o maior aumento na primeira semana de refrigeração. Assim, o tempeh de soja tende a ser cada vez mais escuro e com um tom amarelado, como se pode verificar através da visualização da figura 38.

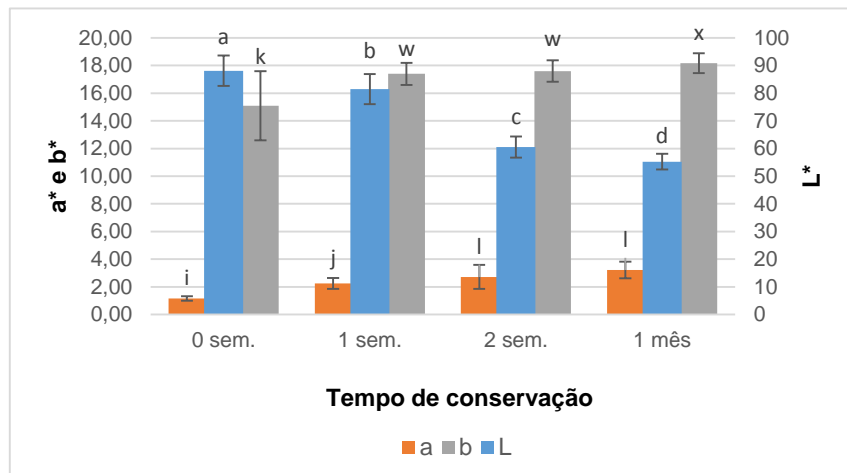


Figura 41 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de soja ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.3.2.2. Tempeh de ervilha

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempeh de ervilha foram registados ao fim de 1 semana, 2 semanas e 1 mês de conservação à temperatura de refrigeração.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 8), a figura 42 mostra o aspeto do tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação. A semana 0 corresponde ao final da fermentação.

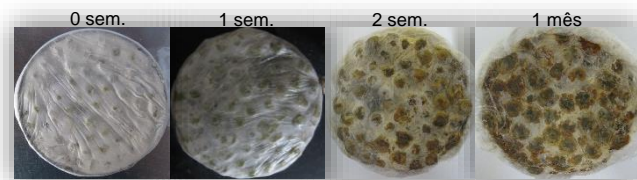


Figura 42 - Aspeto evolutivo do tempeh de ervilha ao longo do processo de conservação.

A figura 43 representa o comportamento da firmeza ao longo do processo de conservação. Como seria de esperar, também o tempeh de ervilha, quando sujeito a temperaturas de refrigeração, sofre perda de firmeza. É de realçar que na primeira semana

ocorre uma diminuição acentuada da firmeza, não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o valor registado ao fim de 2 semanas.

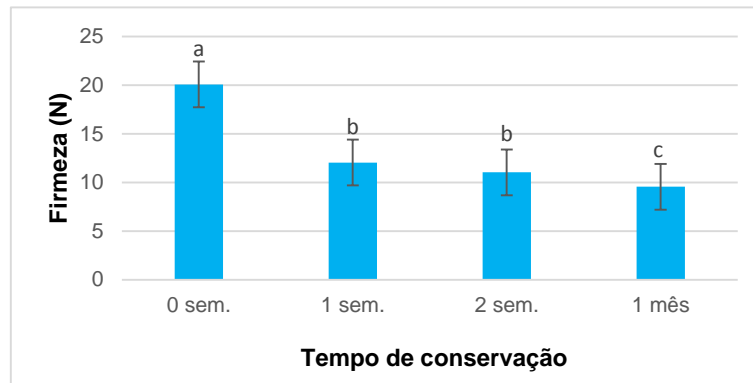


Figura 43 – Firmeza (N) obtida para o tempoh de ervilha ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Durante a refrigeração, também a coesividade do tempoh de ervilha tende a diminuir, como se pode ver na figura 44. Verifica-se que até às 2 semanas a diminuição vai sendo gradual, e ao fim de 1 mês o valor da coesividade não é significativamente diferente do valor obtido ao fim de 2 semanas.

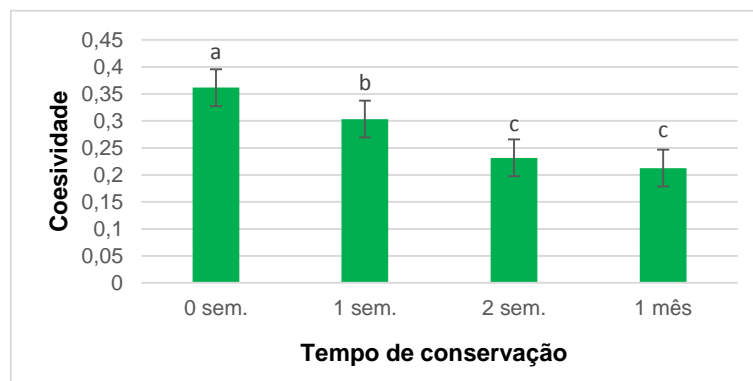


Figura 44 – Coesividade obtida para o tempoh de ervilha ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Como é possível retirar da figura 45, durante a conservação, a luminosidade do tempoh de ervilha diminui, o parâmetro a^* continua a ter tendência crescente (como havia sido observado ao longo da fermentação), enquanto b^* tem o comportamento contrário ao registado na fermentação, apresentando um aumento até ao final da conservação. De notar que, analogamente ao que sucede no tempoh de soja sujeito às mesmas condições, a diminuição mais acentuada de L^* ocorre após 2 semanas, o que se comprova pelo escurecimento acentuado visível na figura 42. De realçar, ainda, que durante a primeira semana o valor de a^* apresenta o aumento mais significativo, e que os valores de b^* entre a primeira semana e 1 mês não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

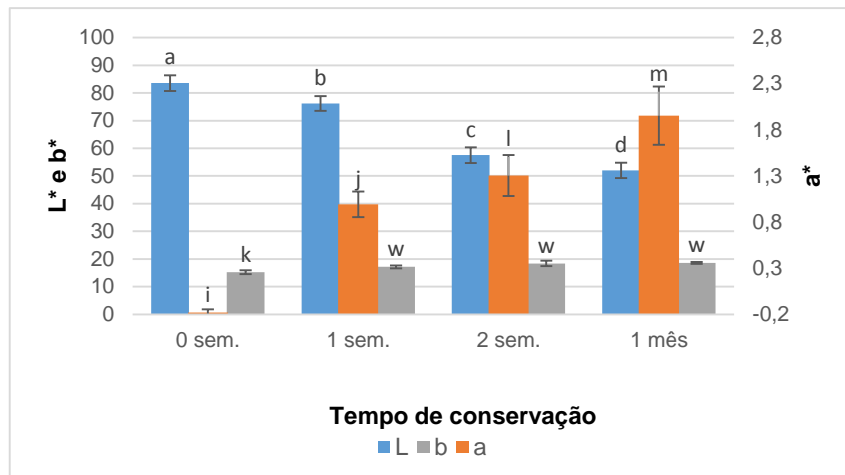


Figura 45 - Parâmetros de cor obtidos para o tempheh de ervilha ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.3.2.3. Tempheh de tremçoço

A firmeza, a coesividade e os parâmetros de avaliação da cor no tempheh de tremçoço foram registados ao fim de 1 semana, 2 semanas e 1 mês de conservação à temperatura de refrigeração.

Para uma melhor avaliação e compreensão dos resultados obtidos (Anexo IV, tabela 8), a figura 46 mostra o aspeto do tempheh de tremçoço ao longo do processo de conservação. A semana 0 corresponde ao final da fermentação.



Figura 46 - Aspeto evolutivo do tempheh de tremçoço ao longo do processo de conservação.

Durante a conservação, da mesma forma que acontece nos temphehs de soja e de ervilha, a firmeza do tempheh de tremçoço vai diminuindo, como mostra a figura 47. Os valores nos 4 tempos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre si.

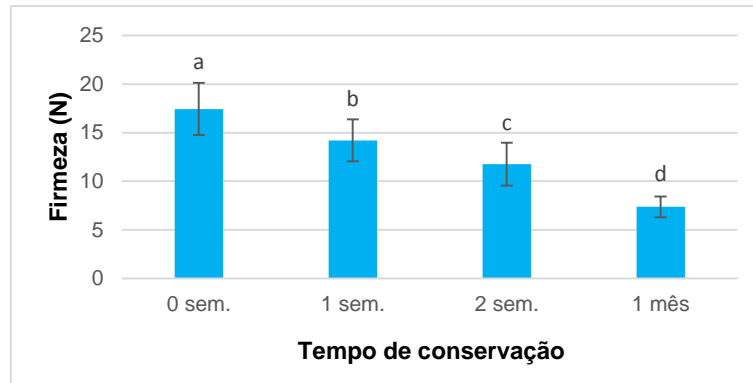


Figura 47 - Firmeza (N) obtida para o tempem de tremoço ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No que diz respeito à coesividade, o comportamento é diferente do registado nos outros 2 tipos de tempem em estudo. Observando a figura 48, verifica-se uma diminuição acentuada da coesividade durante a primeira semana e, de seguida, uma ligeira subida (na segunda semana), não sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) do valor registado ao final de 1 mês. Constatou-se que, ao longo do processo de conservação, as ligações entre os tremoços e o micélio enfraqueceram e o tempem tornou-se pegajoso, o que pode justificar o aumento de coesividade detetado.

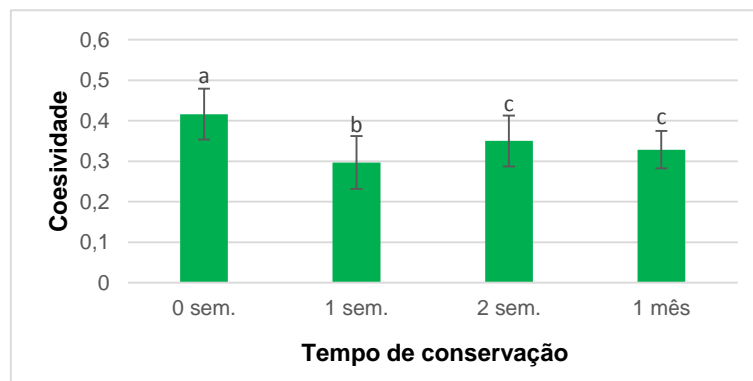


Figura 48 - Coesividade obtida para o tempem de tremoço ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto aos parâmetros de cor, como seria esperado, o comportamento é idêntico ao observado nos tempems de soja e de ervilha, isto é, a luminosidade diminui (tendendo para a zona do escuro) e os valores de a^* e b^* aumentam, apresentando-se sempre na região positiva (vermelho e amarelo, respetivamente).

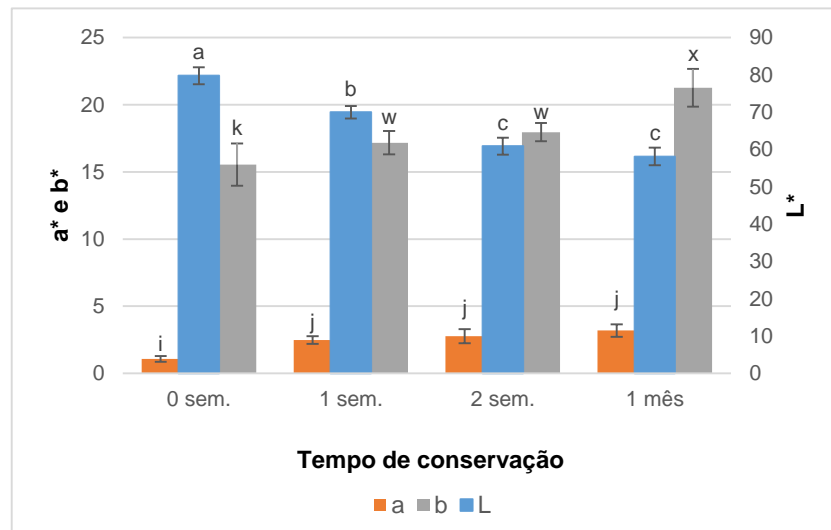


Figura 49 - Parâmetros de cor obtidos para o tempeh de tremço ao longo do processo de conservação.

*Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Analisando a figura 46 em conjunto com a figura 49, comprova-se que ocorre o escurecimento do tempeh de tremço ao longo da conservação, havendo, para o valor de L^* , uma diferença pouco significativa ($p < 0,05$) entre os últimos dois tempos estudados.

Assim, tal como aos restantes tempehs, a conservação à temperatura de refrigeração leva a que o tempeh de tremço obtenha uma cor amarelada.

5. Considerações Finais e Perspetivas Futuras

Tendo em conta o conjunto de objetivos que se pretendiam atingir durante este trabalho, retiraram-se diversas conclusões relevantes no que respeita à produção do inóculo para tempeh, ao processo fermentativo de tempeh com utilização de soja, ervilha e tremoço como matéria-primas, e às características texturais e de cor dos tempehs produzidos.

Quanto à otimização do processo de obtenção do inóculo de *Rhizopus oligosporus* para produção de tempeh baseada na valorização de subprodutos da indústria alimentar (farinhas de trinca de arroz, e farinhas de trigo, milho e centeio) constatou-se que, quando colocadas as farinhas inoculadas em copos de vidro estéreis com tampa de algodão, foram necessários 5 dias de incubação a 29 °C para se obter uma esporulação abundante do fungo nas farinhas. As farinhas de centeio, trinca de arroz carolino e trinca de arroz agulha foram aquelas que proporcionaram um maior desenvolvimento de esporos, enquanto a farinha de trinca de arroz vaporizado foi aquela em que houve menor esporulação. O arroz vaporizado é sujeito a um tratamento térmico severo que, provavelmente, destrói parte da sua flora microbiana nativa. Tal facto poderá ter condicionado de modo negativo o desenvolvimento do inóculo.

Em relação à viabilidade dos esporos produzidos verificou-se uma acentuada perda de viabilidade exigindo a adição de uma quantidade de farinha com esporos demasiado elevada por 100 g de leguminosa.

De forma a otimizar este ponto, dever-se-ia testar uma maior quantidade de inóculo inicial viável, garantindo assim uma maior probabilidade de existirem esporos viáveis no final da preparação do inóculo.

Uma outra estratégia possível seria o enriquecimento da farinha suporte do crescimento com extrato de malte por forma a promover um crescimento inicial do micélio mais abundante, dando posteriormente origem a um maior número de esporos.

Relativamente à otimização do processo fermentativo de tempeh propriamente dita, obtiveram-se diferentes resultados na produção de tempeh de soja, de ervilha e de tremoço. O tempeh de soja apresentou as características de textura, cor e *flavour* desejáveis após 48 horas de fermentação a 29 °C. Por outro lado, não se conseguiu produzir tempeh de soja à temperatura de 37 °C. Já o tempeh de ervilha apenas foi obtido a 37 °C, o que implicou um maior teor de humidade da leguminosa, tendo a consistência pretendida sido igualmente obtida ao fim de 48 horas de fermentação. Sendo a dureza do grão mais elevada, dificultando a penetração do micélio, a produção de tempeh de tremoço tornou-se mais difícil, uma vez que apenas se conseguiu obter fermentação a 37 °C, tendo necessitado de maior teor de humidade, comparativamente ao tempeh de ervilha, e de 72 horas de incubação para obter a consistência e a cor desejáveis.

Em relação à avaliação do parâmetro de qualidade firmeza ao longo da fermentação, notou-se que houve uma tendência geral de aumento da firmeza nos tempes de soja e ervilha, enquanto no tempes de tremoço já se observou uma maior oscilação. No entanto, todos eles atingiram o máximo de firmeza no final da fermentação, a qual ocorreu às 48 h nos tempes de soja e de ervilha e às 72 h no tempes de tremoço. O tempes de soja foi aquele que obteve maior valor de firmeza (25,23 N), mostrando ser o de maior consistência, seguido do tempes de ervilha (20,08 N) e, por fim, o tempes de tremoço (17,44 N).

Ao longo da fermentação, a coesividade, em ambos os tempes de soja e de ervilha, apresentou uma tendência crescente, sendo que o valor máximo foi atingido às 48 h (0,33 no tempes de soja e 0,36 no de ervilha). Já no tempes de tremoço o comportamento foi diferente, uma vez que não se registaram diferenças significativas entre os 7 tempos, apenas tendo os valores às 24 h e às 72 h (onde foi atingido o valor máximo de 0,42) diferido dos restantes.

Quanto à evolução dos parâmetros de cor ao longo da fermentação, verificou-se uma tendência crescente da luminosidade nos 3 tempes, ou seja, um aumento da cor clara, tendo o máximo sido atingido no final da fermentação. No tempes de soja, os parâmetros a^* e b^* tenderam a diminuir, enquanto nos tempes de ervilha e de tremoço, a^* aumentou e b^* diminuiu, sendo que todos apresentaram valores na região do vermelho (a^*) e do amarelo (b^*) no final da fermentação. No entanto, como seria de esperar, no início da fermentação de tempes de ervilha obtiveram-se valores negativos para o parâmetro a^* , característicos da região verde do espaço CIELab.

Durante o período de conservação a uma temperatura de refrigeração entre 6 e 8 °C, os 3 tipos de tempes testados apresentaram perda considerável de firmeza, devido ao facto de as ligações entre o micélio e as leguminosas se tornarem mais fracas, não sendo o fungo capaz de regenerar micélio àquela temperatura. Enquanto no tempes de soja a diminuição mais acentuada ocorreu logo na primeira semana de refrigeração, nos tempes de ervilha e de tremoço ocorreu entre a primeira e a segunda semana. O tempes de soja foi o que sofreu a maior perda total de firmeza durante a refrigeração.

A coesividade ao longo da refrigeração registou comportamentos ligeiramente diferentes entre os 3 tempes. No tempes de soja ocorreu uma diminuição pouco acentuada, enquanto no de ervilha a diminuição foi gradual até que às 2 semanas estabilizou, não tendo sido o valor significativamente diferente do registado ao fim de 1 mês. Já no tempes de tremoço existiu uma perda inicial de coesividade, seguida de um aumento entre a primeira e a segunda semana, justificada pelo facto de as ligações entre os tremoços e o micélio enfraquecerem durante o período considerado tornando o tempes pegajoso. Comparando os 3 tipos de tempes, concluiu-se que o de ervilha foi o que perdeu mais coesividade (0,15) entre o final da fermentação e o final da conservação, enquanto o de soja foi o que menos coesividade perdeu (0,04).

No decorrer da conservação os parâmetros de cor registaram um comportamento geral idêntico nos 3 tipos de tempehs, ou seja, L^* diminuiu e a^* e b^* aumentaram. Este resultado comprovou-se pelo escurecimento e pelo tom amarelado que os tempehs de soja, ervilha e tremçoço demonstraram no final do período de conservação.

Todos os resultados obtidos relativamente aos parâmetros de textura e de cor estão diretamente relacionados com o desenvolvimento/comportamento do micélio fúngico ao longo da fermentação, bem como durante a conservação, refletindo o desenvolvimento micelial, pelo que poderá constituir um procedimento adequado para avaliar uma fermentação sólida, como é o caso da ocorrida ao longo da produção de tempeh por *R. oligosporus*.

Por forma a completar o trabalho desenvolvido, um aspeto que teria sido interessante abordar seria a aceitabilidade por parte do consumidor deste produto diferente das formas tradicionais de consumo de leguminosas em Portugal. Muito embora este não tenha sido realizado, foi feita uma primeira abordagem durante a participação do CBAA (Centro de Botânica Aplicada à Agricultura) na Noite dos Investigadores, em que foram dados a provar ao público os 3 tempehs produzidos, tendo estes sido bem aceites.

Por outro lado, seria igualmente interessante a análise nutricional dos produtos obtidos (a_w , teor em ácidos gordos e aminoácidos essenciais, teor em vitaminas e quais as vitaminas presentes ou produzidas durante a fermentação), avaliando quer a sua evolução ao longo da fermentação quer no produto final e durante o período de conservação. Estes resultados permitiriam sustentar a ideia de que o tempeh é um produto extremamente rico nutricionalmente, facilitando a sua promoção enquanto alimento saudável junto do consumidor, aquando da introdução no mercado português de tempeh produzido utilizando-se como matérias-primas a ervilha e o tremçoço, ou outras leguminosas bastante apreciadas no país, como o feijão e o grão.

Referências Bibliográficas

Adams, M.R., e Moss, M.O. 1995. Food Microbiology. United Kingdom. The Royal Society of Chemistry. 398 p.

Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Stewart, J.W., e Toda, T. 2000. Isoflavones-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3):844–852. Cit. por: Babu P.D., Bhakayaraj, R., e Vidhyalakshmi, R. 2009. A Low Cost Nutritious Food “Tempeh” – A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 (1):22–27.

Alves, R., e Santos, B. 2008. Fruta e Legumes. 1ª ed. Alemanha. Teubner. 318 p.

Amarowicz, R., e Pegg, R.B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110:865–878.

Anderson, J.W. 2003. Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62:135–142. Cit. por: Tamang, J.P., e Kailasaphaty, K. 2010. Fermented Foods and Beverages of the World. CRC Press. New York. 434 p.

Angulo-Bejarano, P.I., Verdugo-Montoya, N.M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J, Mora-Escobedo, R., Lopez-Valenzuela, J.A., Garzón-Tiznado, J.A., e Reyes-Moreno, C. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 106:106–112.

Arcot, J., Wong, S. e Shreshta, A.K. 2002. Comparison of folate losses in soybean during the preparation of tempeh and soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:1365–1368.

Astuti, M., Meliala, A., Dalais, F.S., e Wahlqvist, M.L. 2000. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 9(4):322–325.

Australian Government. 2013. The Biology of *Lupinus* L. (lupin or lupine). *Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator*. 66 p.

Babu, P.D., Bhakayaraj, R., e Vidhyalakshmi, R. 2009. A Low Cost Nutritious Food “Tempeh” – A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 (1):22–27.

Badger, T.M., Ronis, J.J.M., Simmen, C.M.R., e Simmen, F.A. 2005. Soy Protein Isolate and Protection against Cancer. Cit. por: Babu, P.D., Bhakayaraj, R., e Vidhyalakshmi, R. 2009. A Low Cost Nutritious Food “Tempeh” – A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 (1):22–27.

Baht, R., e Karim, A.A. 2009. Exploring the Nutritional Potential of Wild and Underutilized Legumes. *Institute of Food Technologists*, 8:305–331.

- Battcock, M., e Azam-Ali, S. 1998. Fermented fruits and vegetables: A global perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Baxter, N. 2011. Lupin qualities promoted to food industry. Disponível em: <https://www.grdc.com.au/Media-Centre/Ground-Cover/Ground-Cover-Issue-94-September-October-2011/Lupin-qualities-promoted-to-food-industry>. Acesso em: 07/02/2014.
- Benevides, C.M.J., Souza, M.V., Souza, R.D.B., e Lopes, M.V. 2011. Fatores Antinutricionais em Alimentos: Revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 18(2):67–79.
- Bisping, B., Hering, L., Baumann, U., Denter, J., Keuth, K., e Rehm, H.J. 1993. Tempe fermentation: some aspects of formation of gamma-linolenic acid, proteases and vitamins. *Biotechnology Advances*, 11:481–493.
- Brennan, J.G. 1988. Texture Perception and Measurement. *In: Piggot, J.R. Sensory Analysis of Food*. Elsevier Applied Science. United Kingdom. 69–101 p.
- Caplice, E., e Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50:131–149.
- Casey, A., e Walsh, G. 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110:313–322.
- Chang, C.T., Hsu, C.K., Chou, S.T, Chen, Y.C, Huang, F.S., e Chung, Y.C. 2009. Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:799–806.
- Cruz, I.L. 2013. *Desenvolvimento de um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a produção de tempeh em pequena escala a partir de diferentes leguminosas*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. 83 p.
- Cubero, J.I., e Moreno, M.T. 1983. Leguminosas de grano. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 359 p.
- Duranti, M. 2005. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77:67–82.
- El, S.N., e Simsek, S. 2012. Food Technological Applications for Optimal Nutrition: Na Overview of Opportunities for the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11:2–12.
- Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S., e Osawa, T. 1996. New Antioxidant Isolated from Tempeh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:696–700.

- Fellows, P.J. 2006. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática. 2ª ed. Brasil. Artmed Editora. 602 p.
- Ferreira, F. A. G. 1983. Nutrição Humana. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. 1291 p.
- Ferreira, W.F.C., e Sousa, J.C.F. 1998. Microbiologia. Lisboa. LIDEL – Edições Técnicas, lda. 360 p.
- Francis, F.J. 1987. Food Colorimetry: Measurement and Interpretation. *In*: Jowitt, R., Escher, F., Kent, M., McKenna, B., e Roques, M. *Physical Properties of Foods 2*. Elsevier Applied Science. USA. 237–249 p.
- Gallo, V. 2010. Alimentos Funcionais e Fermentados. 4 p.
- Guerreiro, I., Rolim, C., e Ramos, M.P. 2008. O Grande Livro dos Alimentos. 7301ª ed. Rio de Mouro. Printer Portuguesa – Ind. Gráfica, Lda. 383 p.
- Hachmeister, K.A., e Fung, D.Y. 1993. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University, Manhattan*, 19(3):137–188.
- Handoyo, T., e Morita, N. 2006. Structural and Functional Properties of Fermented Soybean (Tempeh) by Using *Rhizopus Oligosporus*. *International Journal of Food Properties*. 9(2):347–355.
- Haque, A., Richardson, R.K., e Morris, E.R. 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, 15:5937–602.
- Hayta, M., Alpaslan, M., e Köse, E. 2001. The effect of fermentation on viscosity and protein solubility of boza, a traditional cereal-based fermented Turkish beverage. *European Food Research and Technology*, 213:3357–337.
- Head, R.J., Record, I.R., e King, R.A. 1996. Functional Foods: Approaches to Definition and Substantion. *Nutrition Reviews*, 54(11):S17–S20.
- Hedger, J.N. 1982. Production of Tempe, an Indonesian Fermented Food. *The Society for General Microbiology*, 597–602 p.
- Hering, L., Bisping, B, e Rehm, H.J.1991. Patterns and Formation of Fatty Acids at Tempe Fermentation by Several Strains of *Rhizopus Sp*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 93(8):303–308.
- Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. 1ª ed. USA. Blackwell Publishing Professional. 473 p.

- Ibrahim, S.S., Habiba, T.A., Shatta, A.A., e Embaby, H.E. 2002. Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. *Nahrung/Food*, 46(2):92–95.
- ISO 11036. 1994. Sensory Analysis – Methodology – Texture Profile. International Organization for Standardization Technical Committee Agricultural Food Products. 14 p.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology. 7^a ed. Springer Science + Business Media, Inc. New York. 790 p.
- Jiménez-Martínez, C., Hernández-Sánchez, H., e Dávila-Ortiz, G. 2007. Diminution of quinolizidine alkaloids oligosaccharides and phenolic compounds from two species of Lupinus and soybean seeds by the effect of *Rhizopus oligosporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1315–1322.
- Jin, B, Leeuwen, H.J.V., Patel, B., Doelle, H.W., e Yu, Q. 1999. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. *Process Biochemistry*, 34:59–65.
- Karyadi, D.H., e Hermana, H. 1995. Potensi tempe untuk Gizi dan Kesehatan. *Symposium Nasional Pengembangan tempe dalam Industri Pangan Modern*. Cit. por: Kuswanto, 2005. Industrialization of Tempe Fermentation. In: Steinkraus, K. H., *Industrialization of Indigenous Fermented Food*. Marcel Dekker Inc. New York. 587–635 p.
- Karyadi, D., e Lukito, W. 1996. Beneficial Effects of Tempeh in Disease Prevention and Treatment. *Nutrition Reviews*, 54(11):S94–S98.
- Katz, S.E. 2003. Wild Fermentation: The Flavor, Nutrition and Craft of Live-Culture Foods. Vermont. Chelsea Green Publishing Company. 187 p.
- Kay, D.E. 1979. Food Legumes. London. Tropical Products Institute. 435 p.
- Konica Minolta. Avaliação de cor instrumental. 2006. Disponível em: <http://sensing.konicaminolta.com.br/2014/01/avaliacao-de-cor-instrumental/>. Acesso em: 15/12/2014.
- Kovac, B., e Raspor, P. 1997. The Use of the Mould *Rhizopus Oligosporus* in Food Production. *Food Technology and Biotechnology*, 35(1):69–73.
- Kristo, E., Biliaderis, C.G., e Tzanetakis, N. 2003. Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter cultures using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83:437–446.
- Kumar, V., Chauhan, G.S, Rani, A., Raghvanshi, M., e Jatav, R. 2012. Effect of boiling treatments on biochemical constituents of vegetable-type soybean. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36:393–400.

- Kuswanto, K. R. 2005. Industrialization of Tempe Fermentation. *In: Steinkraus, K. H., Industrialization of Indigenous Fermented Food*. Marcel Dekker Inc. New York. 587–635 p.
- Lambert, C. 2014. The unlikely new medicine... pickled cabbage: New research reveals it may help with allergies, coughs, colds and more. Disponível em: <http://www.dailymail.co.uk/health/article-2556298/The-unlikely-new-medicine-pickled-cabbage-New-research-reveals-help-allergies-coughs-colds-more.html>. Acesso em: 26/05/2014.
- Lindsay, S.H., e Claywell, L.G. 1998. Considering Soy: Its Estrogenic Effects May Protect Women. *Lifelines*, 2(1):41–44.
- Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., e Gould, G.W. 2000. The Microbiological Safety and Quality Food. Gaithersburg, Maryland. Aspen Publishers, Inc. 972 p.
- Mabon, T.J. 1993. Colour Measurement of Food. *Cereal Foods World*, 38: 21–25.
- MacDougall, D.B. 1988. Colour Vision and Appearance Measurement. *In: Piggot, J.R. Sensory Analysis of Food*. Elsevier Applied Science. United Kingdom. 103–130 p.
- Mann, G.V., e Spoerry, A. 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *American Journal of Clinical Nutrition*, 27:464–469. Cit. por: Tamang, J.P., e Kailasaphaty, K. 2010. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press. New York. 434 p.
- Martinelli, A.F., e Hesseltine, C.W. 1964. Tempeh fermentation: Package and tray fermentation. *Journal of Food Technology*, 18:167–171. Cit. por: Kuswanto, K. R. 2005. Industrialization of Tempe Fermentation. *In: Steinkraus, K. H., Industrialization of Indigenous Fermented Food*. Marcel Dekker Inc. New York. 587–635 p.
- Martins, F., Pinho, O., e Ferreira, I. 2004. Alimentos Funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. *Alimentação Humana*, 10(2):67–78.
- McCord, J.M. 1971. Superoxide dismutase. Na enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244:6049–6055. Cit. por: Astuti, M., Meliala, A., Dalais, F.S., e Wahlqvist, M.L. 2000. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 9(4):322–325.
- Mello, S.C.M., Reis, A., e Silva, J.B.T. 2011. Manual de curadores de Germoplasma – Microrganismos: Fungos filamentosos. 1ª ed. Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 24 p.
- Messina, M, e Messina, V. 2000. Soy foods, soybean isoflavones and bone health: a brief overview. *Journal of Renal Nutrition*, 10:63–68. Cit. por: Babu, P.D., Bhakayaraj, R., e Vidhyalakshmi, R. 2009. A Low Cost Nutritious Food “Tempeh” – A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 (1):22–27.

- Moraes, A.M.L., Paes, R.L., e Holanda, V.L. 2010. Micologia. *In: Molinaro E.M., Caputo, L.F.G., e Amendoeira, M.R.R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.* Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 399–496 p.
- Moritz, A.R. 2014. A colorimetria aplicada em nossos dias: A importância da colorimetria em produtos alimentícios. 8 p. Disponível em: www.mundodacor.com.pt. Acesso em: 07/08/2014.
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Alison, M.S., Doull, J., Flamm, W.G., e Adlercreutz, H. 2003. Soy Isoflavones: A Safety Review. *Nutrition Reviews*, 61(1):1–33.
- Murakami, H., Asakawa, T., terão, J., e Matsushita, S. 1984. Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48:2971–2975.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M.M., Ciesiolka, D., Pilarski, R., e Gulewicz, K. 1999. Studies on the influence of diferente nitrogen forms on the chemical composition of various cultivars of *Lupinus albus* L. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40:2009–2027. Cit. por: Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., e Pedrosa, M.M. 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and nutritive actions. Implications for nutrition and health. *Pytochemistry Reviews*, 11:227–244.
- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., e Pedrosa, M.M. 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and nutritive actions. Implications for nutrition and health. *Pytochemistry Reviews*, 11:227–244.
- Nagaraju, V.D., e Manohar, B. 2000. Rheology and particle size changes during *Idli* fermentation. *Journal of Food Engineering*, 43:167–171.
- Nassar, A.G., Mubarak, A.E., e El-Belgaty, A.E. 2008. Nutritional potential and functional properties of tempe produced from mixtures of diferente legumes. 1: Chemical composition and nitrogenous constituent. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1754–1758.
- Nout, M.J.R., e Kiers, J.L. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98:789–805.
- Omoni, A.O., e Aluko, R.E. 2005. Soybean Foods and Their Benefits: Potential Mechanisms of Action. *Nutrition Reviews*, 63(8):272–283.
- Pampulha, M.E. 1998. Nutrição e Crescimento de Microrganismos. *In: Ferreira, W.F.C., e Sousa, J.C.F. Microbiologia.* LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa. 81–98 p.
- Pampulha, M.E., e Oliveira, A. 2009. Microbiologia. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

- Perdoncini, M.G. Morfologia dos fungos. 2012. 79 Diapositivos. Acessível em: 16/05/2014.
- Pereira, M.L., e Sousa, I. 2010. Protocolos e problemas para as aulas práticas de Reologia e Estrutura dos Alimentos. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 26 p.
- Poffo, F., e Silva, M.A.C. 2011. Caracterização taxonómica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2):303–307.
- Portero, P.P. 2010. Avaliação instrumental da correspondência de cor de resinas compostas em função de escala de referência, tonalidade, composição e espessura. Tese para obtenção do grau de doutoramento. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Odontologia de Araraquara. 136 p.
- Porto, A, e Oliveira, L. 2006. Tabela da Composição de Alimentos. Lisboa. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 355 p.
- Prinyawiwatkul, W., Eitenmiller, R.R., Buchat, L.R., McWatters, K.H., e Philipps, R.D. 1996. Cowpea Flour Vitamins and Trypsin Inhibitor Affected by Treatment and Fermentation with *Rhizopus microsporus*. *Journal of Food Science*, 61(5):1039–1042.
- Randhir, R, Lin, Y.T., e Shetty, K. 2004. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39:637–646.
- Rao, V.N.M, e Skinner, G.E. 1986. Rheological Properties of Solid Foods. *In*: Rao, M.A., e Rizvi, S.S.H. Engineering Properties of Foods. Marcel Dekker, Inc.. New York. 215–254 p.
- Raymundo, A. 2003. Emulsões Alimentares. *In*: Castro, A.G. *A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos*. Instituto Piaget. Lisboa. 91–117 p.
- Reu, J.C., Linssen, V.A.J.M., Rombouts, F.M., Nout, M.J.R. 1997. Consistency, Polysaccharidase Activities and Non-Starch Polyssacarides Content of Soya Beans During Tempe Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73:357–363.
- Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Barrón-Hoyos, J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum L.*) tempeh flour - Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:271–278.
- Rochfort, S., e Panozzo, K. 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 7981-7994. Cit. por Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., Pedrosa, M.M. 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and nutritive actions. Implications for nutrition and health. *Pytochemistry Reviews*, 11:227–244.

- Rodet, J.C.. 2006. Guia dos Alimentos Vegetais. 3ª ed. Lisboa. Gradiva. 243 p.
- Ross, R. P., Lyon Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79:3–16.
- Ruiz-Téran, F., e Owens, J.D. 1996. Chemical and Enzymic Changes during the Fermentation of Bacteria-Free Soya Bean Tempe. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 71:523–530.
- Ruiz-Téran, F., e Owens, J.D. 1999. Fate of oligossacarides during production of soya bean tempe. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79:249–252.
- Rusmin, S., e Ko, S.D. 1974. Rice-Grown *Rhizopus oligosporus* Inoculum for Tempeh Production. *Applied Microbiology*, 28:347–350.
- Santos, A.C.A. Importância e métodos físicos de avaliação da qualidade da matéria-prima. 2014. Universidade de Évora – Laboratório de Tecnologia e Pós-colheita. 30 Diapositivos. Acessível em: 15/12/2014.
- Sheih, I.C., Wu, H.Y., Lai, Y.J., e Lin, C.F. 2000. Preparation of high free radical scavenging tempeh by a newly isolated *Rhizopus* sp. R-69 from Indonesia. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 2:35–44. Cit. por: Chang, C.T., Hsu, C.K., Chou, S.T, Chen, Y.C, Huang, F.S., e Chung, Y.C. 2009. Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:799–806.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N., e Bawa, A.S. 2008. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7:14–28.
- Sousa, B.A.A. 2009. Funcionalidade dos extractos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 118 p.
- Sousa, I.M.N. 2001. A reologia dos produtos alimentares. In: Castro, A.G., Covas, J.A., e Diogo, A.C. *Reologia e suas aplicações industriais*. Instituto Piaget. Lisboa. 131-158 p.
- Spencer-Martins, I., Sá-Nogueira, I. 2003. Aplicações da Biotecnologia – Biotecnologia Microbiana. In: Lima, N., e Mota. *Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações.*, M. Lidel – Edições Técnicas, Lda. [S.l.]. 249-265 p.
- Steinkraus, K.H. 1996. Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd ed, rev. and exp. New York. Marcel Dekker, Inc. 792 p.
- Steinkraus, K.H. 2002. Fermentations in World Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1:23–32.

Stodolak, B., e Starzynska-Janiszewska, A. 2008. The influence of tempeh fermentation and conventional cooking on anti-nutrient level and protein bioavailability (*in vitro* test) of grass-pea seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:2265–2270.

Tamang, J.P., e Kailasaphaty, K. 2010. *Fermented Foods and Beverages of the World*. New York. CRC Press. 434 p.

Thann, N.V., e Nout, M.J.R. 2004. Dormancy, activation and viability of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. *International Journal of Food Microbiology*, 92:171–179.

The Jakarta Post. 2010. Australia offers soybean substitute for tempeh production. Disponível em: <http://www.thejakartapost.com/news/2010/04/12/australia-offers-soybean-substitute-tempeh-production.html>. Acesso em: 07/02/2014.

Truswell, A. 2002. Cereal grains and coronary heart disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56:1–14. Cit. por: Tamang, J.P., e Kailasaphaty, K. 2010. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press. New York. 434 p.

Tsuruda, A.Y., Filho, M.L.M., Busanello, M., Guergoletto, K.B., Baú, T.R., Ida, E.I., e Garcia, S. 2013. Different Foods for Consumers with New Demands. *In: Food Industry*. [s.n.]. [S.l.]. 163–190 p.

Varzakas, T. 1998. *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. *Process Biochemistry*, 33(7):741–747.

Wadud, S., Ara, A., e Kosar, S. 1986. Studies on the preparation of tempeh and tempeh kababs. *Pakistan Journal of Science and Industrial Research*, 29:222–226. Cit. por: Steinkraus, K.H. 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2nd ed, rev. and exp. Marcel Dekker, Inc. New York. 792 p.

Walker, P.M.B. 1988. *Chambers Science and Technology Dictionary*. Cit. por: Battcock, M., e Azam-Ali, S. 1998. *Fermented fruits and vegetables: A global perspective*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Anexos

Anexo I – Diversos processos de produção de tempeh

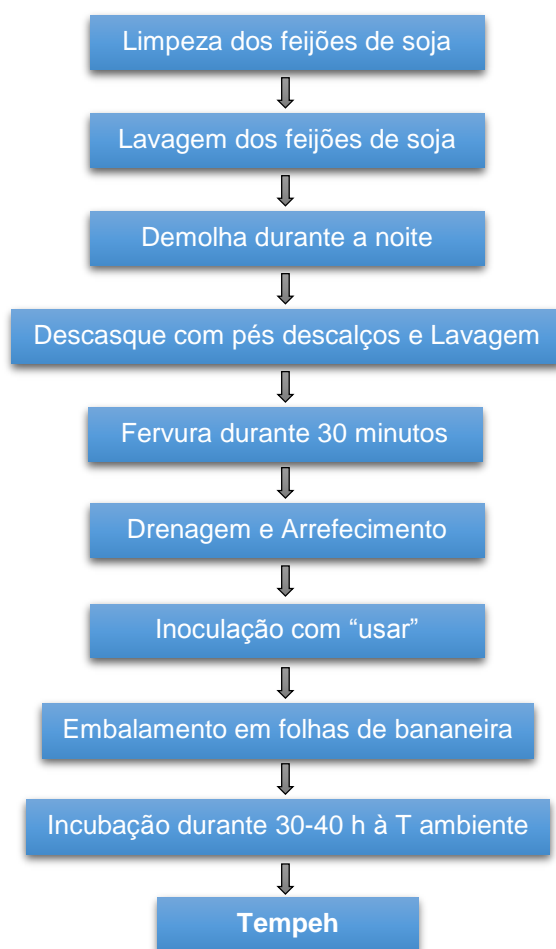


Figura 50 - Diagrama de produção de tempeh, em pequena escala (Indonésia).

Adaptado de: Kuswanto, 2005

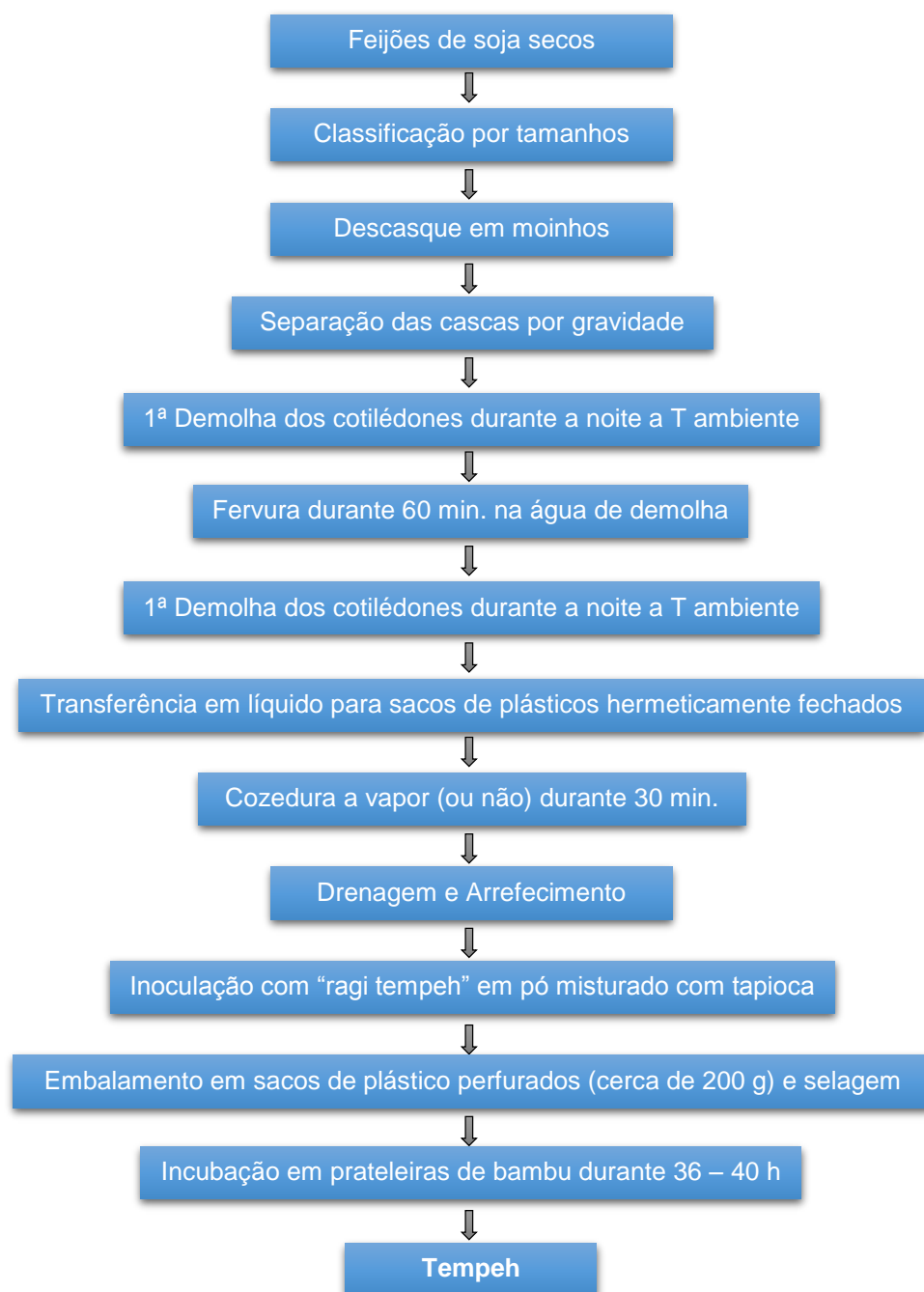


Figura 51 - Diagrama de produção moderna de tempeh de soja numa fábrica na Indonésia.

Adaptado de: Kuswanto, 2005

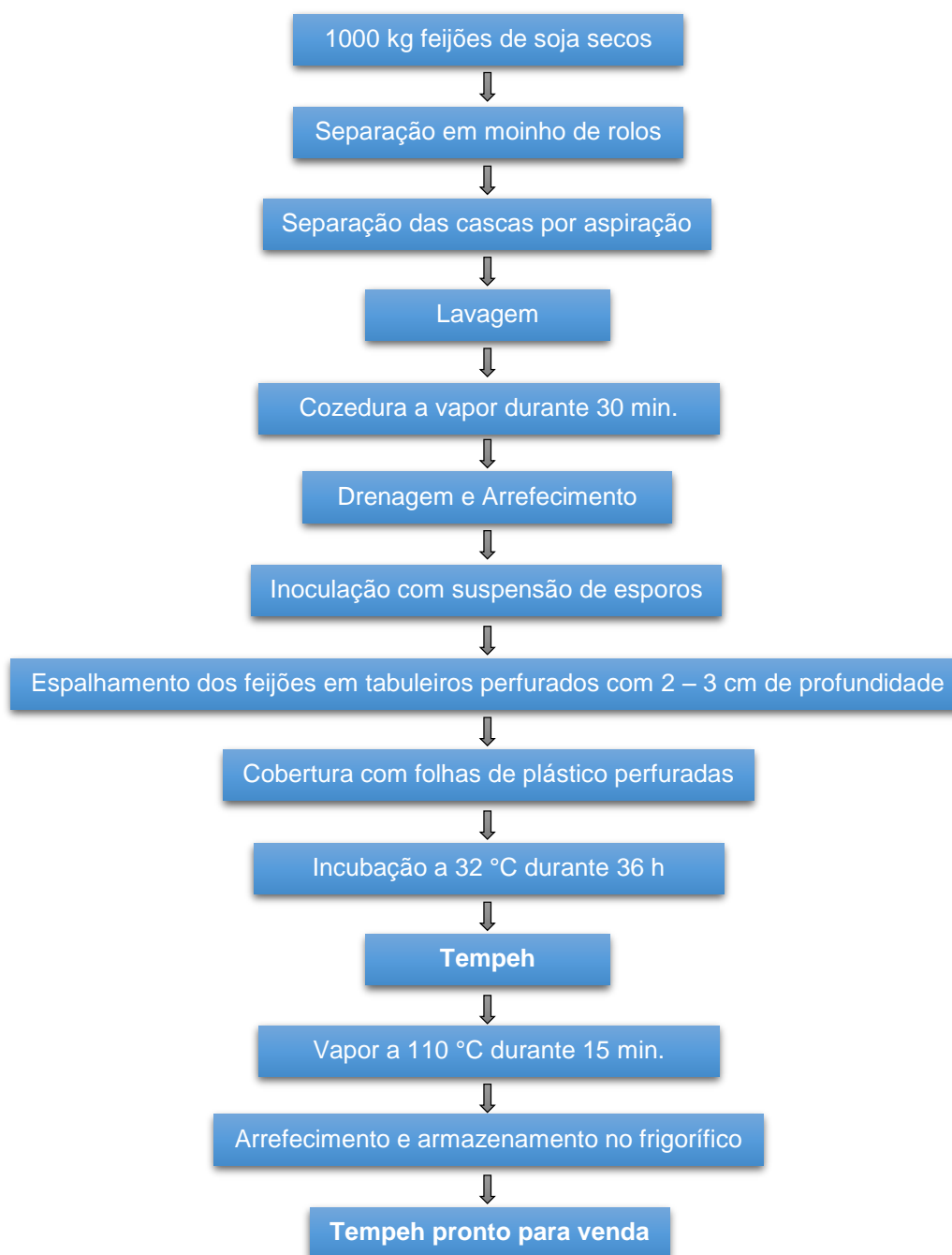


Figura 52 - Diagrama de produção de tempeh de soja, em larga escala (*Maruzan Ai Company, Japão*).

Adaptado de: Kuswanto, 2005

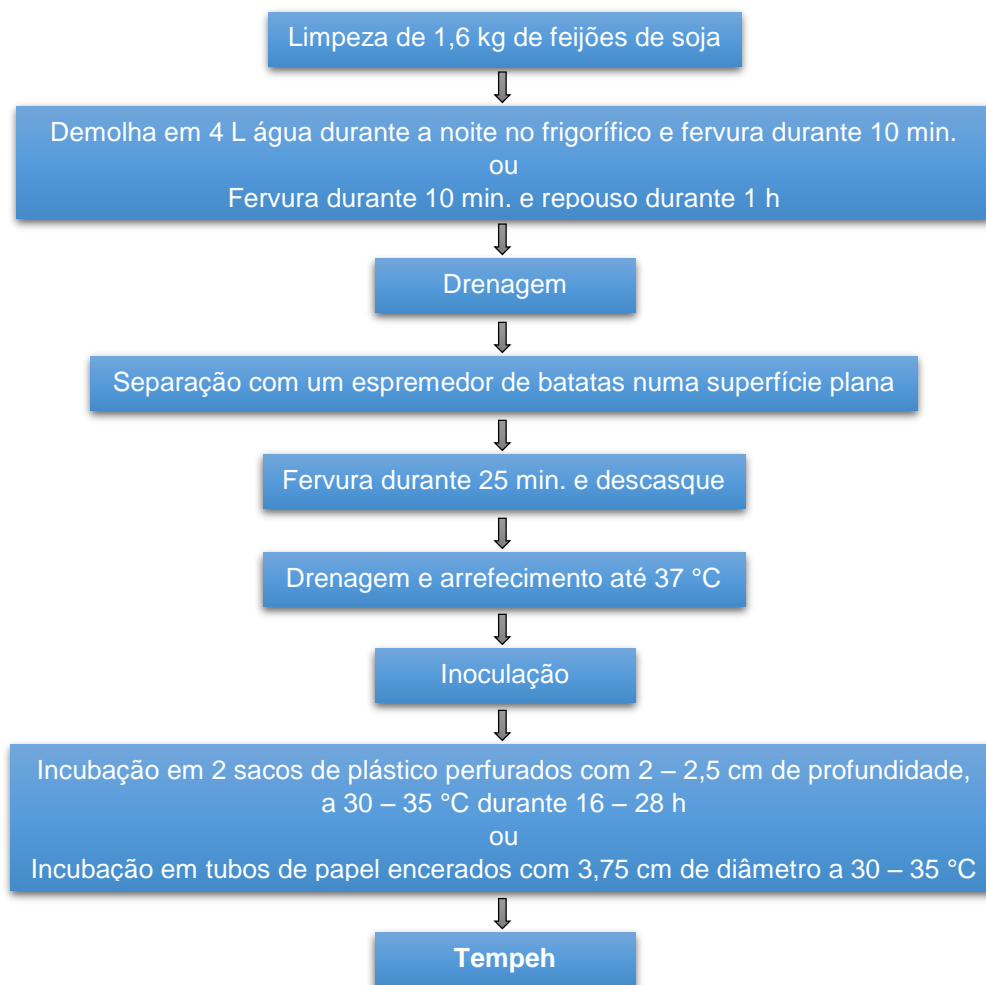


Figura 53 - Diagrama de produção de tempeh de soja, em pequena escala
(*The Farm, Summertown, Tennessee*).

Adaptado de: Kuswanto, 2005

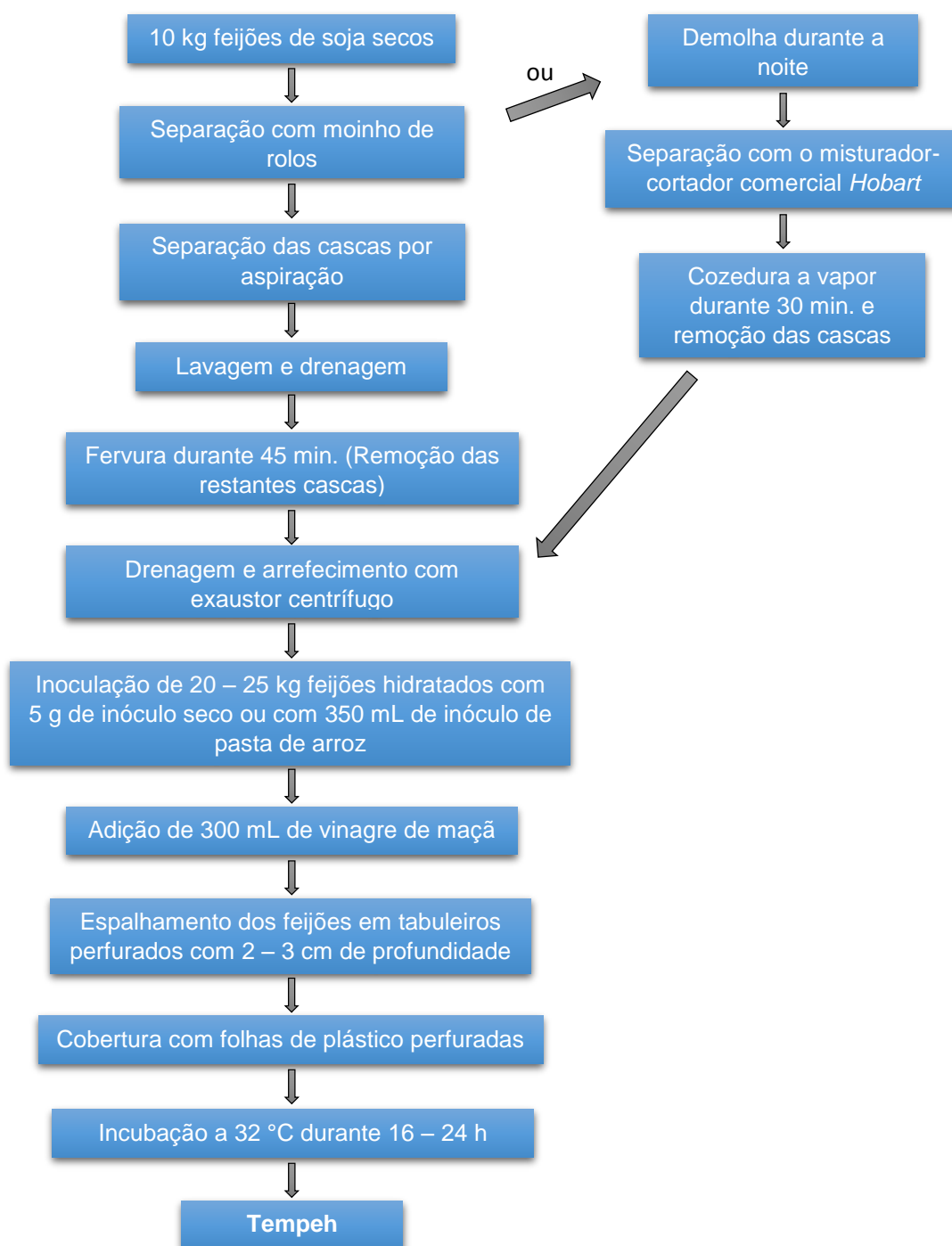


Figura 54 - Diagrama de produção de tempeh de soja, em larga escala (*The Farm, Summertown, Tennessee*).

Adaptado de: Kuswanto, 2005

Anexo II – Meio de cultura (MEA)

Malt Extract Agar (MEA) é um meio de cultura sólido bastante utilizado para isolar, cultivar e permitir a contagem de células de leveduras e fungos. Este contém maltose como fonte de energia, dextrose e glicerol como fontes de carbono e peptona como fonte de azoto, para o crescimento dos microrganismos (*Malt Extract Agar/Malt Extract Broth*). O agar, um polissacárido extraído de algas vermelhas e que tem a propriedade de permanecer líquido até que a temperatura desça aos 40-42 °C (temperatura que não afeta a maioria dos microrganismos), não sendo degradado pelos microrganismos, é utilizado como agente solidificante, permitindo o crescimento das colónias de microrganismos numa superfície firme (Ferreira e Sousa, 1998).

Neste trabalho utilizaram-se as seguintes proporções na preparação do meio de cultura (Cruz, 2013):

- 30 g/L de extracto de malte;
- 5 g/L de peptona;
- 15 g/L de agar.

Anexo III – Câmara de contagem de esporos

A câmara de *Neubauer*, também conhecida por hemocitómetro (Figura 55), é uma lâmina de vidro mais alta do que uma lâmina comum, dividida em quadrículas de área e profundidade conhecidas que delimitam volumes precisos da amostra, com lamínula especial, para a contagem de esporos. Tendo em conta esse volume e a diluição da amostra, assim se determina o número de microrganismos por mililitro da amostra inicial (Mello *et al.*, 2011; Ferreira e Sousa, 1998).

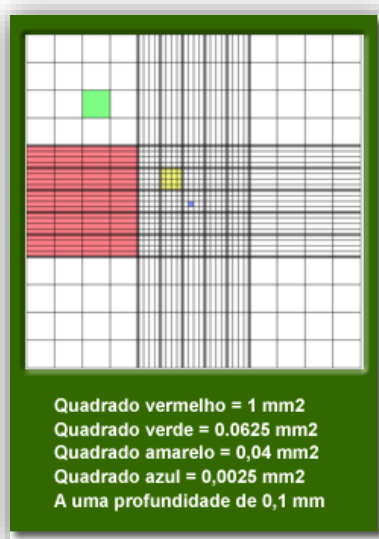


Figura 55 - Câmara de *Neubauer*.

Fonte: <http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/camara-de-neubauer/>

Anexo IV – Registo dos valores dos parâmetros de textura e cor dos 3 tipos de tempeh

Tabela 7 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de soja.

	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h	1 sem.	2 sem.	1 mês
Firmeza (N)	2,62	4,90	10,32	16,58	23,59	24,79	25,23	22,55	11,25	7,00
Coesividade	0,20	0,19	0,25	0,26	0,29	0,29	0,33	0,31	0,30	0,29
L*	68,45	67,64	68,65	72,50	85,25	86,19	88,11	81,46	60,53	55,25
a*	2,43	2,58	2,65	1,82	1,29	0,91	1,16	2,24	2,71	3,21
b*	19,93	20,01	18,03	14,43	10,88	14,04	16,73	17,40	17,60	18,18

Tabela 8 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de ervilha.

	12 h	20 h	24 h	30 h	44 h	48 h	1 sem.	2 sem.	1 mês
Firmeza (N)	2,83	8,15	11,92	12,99	15,32	20,08	12,05	11,04	9,56
Coesividade	0,27	0,21	0,26	0,31	0,31	0,36	0,30	0,23	0,21
L*	61,26	71,27	72,66	82,32	83,13	83,58	76,20	57,54	52,04
a*	-1,74	-1,18	-1,09	-0,50	-0,57	-0,18	0,99	1,31	1,95
b*	16,27	13,15	11,72	10,31	10,04	15,27	17,15	18,40	18,58

Tabela 9 - Valores dos parâmetros de textura (firmeza e coesividade) e de cor (L*, a* e b*) obtidos para o tempeh de tremçoço.

	12 h	18 h	24 h	30 h	48 h	65 h	72 h	1 sem.	2 sem.	1 mês
Firmeza (N)	6,53	12,01	9,92	8,30	12,11	13,47	17,44	14,21	11,77	7,36
Coesividade	0,35	0,35	0,31	0,36	0,37	0,38	0,42	0,30	0,35	0,33
L*	60,90	74,37	73,75	78,48	78,66	79,47	79,81	70,02	60,94	58,14
a*	-2,04	-0,86	-0,57	-0,49	1,33	1,83	1,09	2,48	2,76	3,19
b*	17,00	23,50	23,69	22,65	23,42	19,68	15,54	17,18	17,97	21,26

Anexo V – Abstract do XII Encontro de Química dos Alimentos (Instituto Superior de Agronomia – Lisboa)

12^o Encontro de Química dos Alimentos



Acompanhamento do processo fermentativo da produção de alimentos funcionais inovadores à base de tremçoço e ervilha com base no método de produção de tempé de soja

Inês Naia^{*a}, *Anabela Raymundo*^a, *Catarina Prista*^a

^aInstituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal

[*inespnaia@gmail.com](mailto:inespnaia@gmail.com)

Os alimentos fermentados estão entre os primeiros alimentos processados produzidos e consumidos pelo ser humano. Embora ancestralmente um dos principais objectivos da produção deste tipo de alimentos fosse a conservação, atualmente, a produção e o elevado consumo de alimentos fermentados estão diretamente relacionados com as suas características organolépticas, o seu valor nutricional e a sua funcionalidade, correspondendo a uma crescente procura de alimentos saudáveis, variados e organolepticamente agradáveis^[1].

O tempé é um produto originalmente obtido a partir de feijões de soja fermentados pelo fungo *Rhizopus oligosporus*. Após a fermentação completa, os feijões de soja estão cobertos por um micélio branco produzido pelo fungo, resultando num “bolo” com uma textura compacta e firme, o tempé. Este alimento fermentado originário da ilha de Java, na Indonésia^[2], tem inúmeras vantagens nutricionais: (i) é uma excelente fonte proteica e de cálcio, (ii) tem um baixo teor de sódio e gordura saturada e (iii) tem um elevado teor de ácidos gordos essenciais, vitaminas do complexo B, nomeadamente vitamina B12, e fibra alimentar solúvel. A maior parte destas características nutricionais resultam de alterações que ocorrem durante a fermentação^[3].

Rhizopus oligosporus é responsável pela maior digestibilidade e valor nutricional do tempé face ao feijão de soja, uma vez que (i) produz enzimas proteolíticas que vão hidrolisar as proteínas complexas da soja, (ii) aumenta a disponibilidade de minerais (nomeadamente cálcio, ferro e zinco) devido à degradação do factor anti-nutricional ácido fítico em fosfatos inorgânicos e (iii) reduz o teor em açúcares não-metabolizáveis (rafinose e estaquiose), que originam problemas de flatulência^[4]. Para além disso, durante a fermentação produzem-se substâncias bioativas, nomeadamente antioxidantes (vitaminas lipossolúveis, isoflavonas, ácidos gordos insaturados), vitaminas do complexo B (por ex: vitamina B12) e compostos antibacterianos (inibem o crescimento de bactérias indesejáveis) que o tornam num alimento funcional de elevado interesse^[5].

Tendo presente o conceito de diversidade alimentar e a importância que, hoje em dia, este tem para o consumidor, bem como a necessidade de desenvolver produtos a partir de fontes proteicas vegetais, neste projeto apostou-se na utilização de outros substratos de elevado teor proteico para além dos feijões de soja, como o tremçoço e a ervilha, para a produção de tempé.

Numa primeira fase, optimizou-se o processo de produção de inóculo (*Rhizopus oligosporus*), tendo como base o aproveitamento de subprodutos da indústria alimentar, nomeadamente 6 farinhas de 4 tipos de cereais, arroz (vaporizado, agulha e carolino), milho, trigo e centeio, tendo-se estabelecido um procedimento padrão para a produção do fungo. De entre os substratos utilizados, o arroz carolino e o centeio permitiram um crescimento mais rápido e uma maior esporulação do fungo.

Numa segunda fase, procedeu-se à optimização do processo de fermentação variando a quantidade de inóculo e as condições e tempo de incubação. Após esta etapa, a evolução do processo fermentativo foi acompanhada com base em parâmetros físicos (propriedades de textura – firmeza e parâmetros instrumentais de cor) bem como em parâmetros químicos, permitindo estabelecer procedimentos controlados para a produção de tempé a partir de tremçoço e ervilha.

Referências:

- [1] R Hutkins, Microbiology and Fermentation of Fermented Foods, 1st ed, 2006, Blackwell Publishing, USA.
- [2] M Nout, J Kiers, Journal of applied Microbiology, 2005, 98, 789-805.
- [3] P Babu, R Bhagyaraj, R Vidhyalakshmi, World Journal of Dairy & Food Sciences, 2009, 4 (1), 22-27.
- [4] T Handoyo, N Morita, International Journal of Food Properties, 2006, 9:2, 347-355.
- [5] K Steinkraus, Industrialization of Indigenous Fermented Foods, 2nd ed, 2004, Marcel Dekker Inc., Nova Iorque.