



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIENCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNA OLIVEIRA BRITO

**FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DA SOJA POR *Rhizopus oligosporus* PARA A
OBTENÇÃO DE TEMPEH**

IMPERATRIZ – MA

2013

BRUNA OLIVEIRA BRITO

**FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DA SOJA POR *Rhizopus oligosporus* PARA A
OBTENÇÃO DE TEMPEH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia, da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para a conclusão de curso e obtenção do grau em Bacharel em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profª Dra. Adriana Crispim de Freitas

IMPERATRIZ – MA

2013

Brito, Bruna Oliveira.

Fermentação semi-sólida por *Rhizopus oligosporus* para obtenção de tempeh / Bruna Oliveira Brito.
- Imperatriz, 2013.

49f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Crispim de Freitas.

Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia de Imperatriz Maranhão (CCSST) / Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2013.

1. Soja 2 Tempeh - alimento fermentado 3 Fermentação Semi-Sólida (FSS) 4 *Rhizopus oligosporus* I. Título.

CDU 633.34:663.15

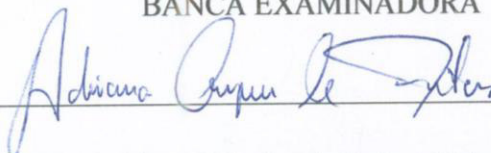
B862f

BRUNA OLIVEIRA BRITO

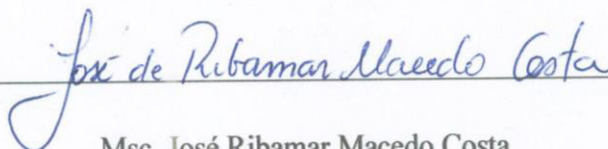
**FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DA SOJA POR *Rhizopus oligosporus* PARA A
OBTENÇÃO DE TEMPEH**

Aprovada em 06/03/2013

BANCA EXAMINADORA



Dra. Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Msc. José Ribamar Macedo Costa
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof.ª Msc. Maria Alves Fontenele
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi nada fácil. Se hoje comemoro uma conquista, esta se deve àqueles que estiveram ao meu lado em todos os momentos, que fizeram dos meus sonhos seus sonhos.

...A Jesus Cristo, amigo sempre presente, sem o qual nada teria feito.

... Ao meu Pai, ao qual dedico tudo que conquistei e sinto-me honrada em ser chamada de sua filha. “Não há nada para comparar nem para poder explicar o quanto é GRANDE O MEU AMOR ”.

... A minha Mãe que por muitas vezes usei como escudo, em que despejei minhas frustrações, mas o amor sempre foi maior, arrebatador e no momento seguinte ela estava lá para me reerguer.

... Agradeço também, Luiz Fernando Berto, que sempre incentivou meus sonhos e estive sempre ao meu lado tornando meus dias mais Felizes.

... Aos meus irmãos Lucas e Diego, que sempre estiveram presentes.

...As minhas avós.

...Aos meus tios e tias. Tia Nacilene, tia Raimundinha, tia Eleusa e tio Deusdete, aos quais tenho um grande apresso.

...Aos meus queridos amigos Amanda Araujo, Flávia Loiola, Davi Sales e Tássia Costa.

...As minhas estrelinhas: Mônica, Sendy, Sâmmara, Luana, Reginária e Raissa, pela amizade e companheirismo que recebi.

...A minha orientadora, Adriana Crispim, pelo apoio, incentivo que me acompanhou, transmitindo-me tranquilidade, agradeço imensamente... Não poderia ser outra!

...Aos meus colegas de laboratório de Iago Hudson e Francisca Célia.

...A banca examinadora deste trabalho.

E especialmente, a minha tia Ednei, que sempre esteve comigo. Viver no coração dos que aqui ficam não é partir.

E a todos que direta ou indiretamente, estiveram presentes durante esses cinco anos.

Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

Tempeh é um alimento fermentado a base de soja, tradicional produto da Indonésia, seu processamento se dar pela Fermentação em estado sólido do fungo, *Rhizopus oligosporus*. Produto apreciado pelos vegetarianos, por ser uma grande fonte de proteínas. A Fermentação semi-sólida é um processo no qual o crescimento do micro-organismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre. Objetivou-se neste trabalho o cultivo semi-sólido do fungo filamentoso, em soja, para determinação de uma formulação adequada do tempeh. Pelos resultados obtidos, observou-se que a melhor condição de preparo do tempeh foi de volume de inóculo de 4mL/100 g de substrato incubado em sacos plásticos perfurados, durante 24 horas a 30°C, resultando em uma massa branca compacta, envolvida de micélios do fungo *Rhizopus oligosporus*, obtendo-se um alimento rico em nutrientes, com altos níveis de atividade enzimática, proteínas e lipídios.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação semi-sólida; soja; *Rhizopus oligosporus*; determinações analíticas.

ABSTRACT

Tempeh is a fermented food based on soy, traditional product of Indonesia, its processing occur by solid state fermentation of the fungus, *Rhizopus oligosporus*. Product appreciated by vegetarians, for being a great source of protein. The solid state fermentation is a process in which growth of the microorganism and the formation of products occur on the surface of the solid substrate near absence of free water. The objective of this work semisolid cultivation of filamentous fungi in soybean for determining a suitable formulation of tempeh. From the results, it was observed quean best condition for preparation of tempeh was inoculum volume: 4mL/100 g of substrate incubated in perforated plastic bags for 24 hours at 30 ° C, resulting in a compact white mass, involved in *Rhizopus oligosporus* mycelia of the fungus, obtaining a food rich in nutrients, with high levels of enzyme activity, protein and lipids.

KEY-WORDS: Solid state fermentation, soy, *Rhizopus oligosporus*; analytical determinations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - a) Etapa de ativação do <i>Rhizopus oligosporus</i> ; b) Etapa de esporulação <i>Rhizopus oligosporus</i>	23
Figura 2 - Fluxograma das etapas para preparação da soja.	24
Figura 3 - Condição1: Soja fermentada com volume de inóculo de 1,5 mL para 40 g de soja, em Erlenmeyer de 250 mL, por 120 horas.	31
Figura 4 - Soja fermentada nas concentrações de 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5ml/ 100 g de substrato – amostras avaliadas com 24 h de incubados.	32
Figura 5 - a) Soja fermentada nas de concentrações de 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5 mL/ 100 g de substrato – amostras retiradas com 48h de incubados.	33
Figura 6 - a) Soja fermentada nas de concentrações 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5 mL/ 100 g de substrato – amostras retiradas com 72 h de incubados. ...	33
Figura 7 - Soja fermentada nas concentrações de a) 2mL/100 g de substrato ; b) 4 mL/100 g de substrato; c) 6 mL/100 g de substrato - amostras retiradas com 24 h de incubados.	34
Figura 8 - a) Soja fermentada incubada por 24 horas em concentração de 4mL/100 g de substrato; b) Soja fermentada, incubado por 48 horas, em concentração de 4 mL/100 g de substrato.	35
Figura 9 - Soja fermentada incubado por 24 horas em concentração de: a) 4mL/100 g de substrato; b) 4 mL/ 200 g de substrato.	36
Figura 10 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de: 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.	37
Figura 11 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de: 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.	37
Figura 12 - Soja fermentada, cortada na transversal: a) 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.	38
Figura 13 - Ilustração de tempeh refrigerados pronto para o consumo.	38
Figura 14 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de 3mL/100 g de substrato;b) 4 mL/100 g de substrato; c) 6 mL/200 g de substrato.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do tempeh – valores convertidos para 100 g de tempeh.....	40
Tabela 2 - pH, Atividade de água (A_w), Umidade e atividade proteolítica (U/g) do Tempeh de que mais se enquadrou nas perspectivas esperadas.	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 O objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos foram:	14
3. REFERENCIAL TEORICO	15
3.1 Alimentos ricos em proteínas.....	15
3.1.1 <i>Vegetarianos</i>	16
3.2 Soja.....	16
3.3. Fermentação Semi-sólida (FSS).....	17
3.3.1 <i>Micro-organismos</i>	18
3.4 Tempeh.....	19
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Matéria-Prima	22
4.2. Micro-organismo.....	22
4.2.1 <i>Conservação e ativação da linhagem</i>	22
4.2.2 <i>Preparo do inóculo em arroz</i>	22
4.3 Inóculo para Fermentação semi-sólida.....	23
4.4 Meio de Fermentação para obtenção do tempeh	23
4.4.1 <i>Parâmetros avaliados</i>	25
4.4.1.1 <i>Avaliação de diferentes formulações para obtenção do tempeh</i>	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Avaliação das condições estudadas.....	31
5.1.1 <i>Condição 1</i>	31
5.1.2 <i>Condição 2</i>	31
5.1.3 <i>Condição 3</i>	34
5.1.4 <i>Condição 4</i>	35
5.1.5 <i>Condição 5</i>	35
5.1.6 <i>Condição 6</i>	36
5.1.7 <i>Condição 7</i>	37
5.1.8 <i>Condição 8</i>	38
5.2 Caracterização físico-química - Condição 7	39
6. CONCLUSÕES.....	41
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	43

REFERENCIAS	44
ANEXO	49

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das culturas de grande importância na econômica. Apresenta-se como a oleaginosa mais cultivada em escala mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor. Porém, apesar do Brasil ser um grande produtor desta oleaginosa, esta é pouco utilizada como alimento pela população brasileira, provavelmente decorrente da falta de hábito e/ou de informação em relação aos benefícios que o seu consumo proporcionaria ao organismo. Nos países orientais, a produção de alimentos à base de soja é um segmento que apresenta um forte crescimento (HIRAOKA, 2008).

O número de características da soja tem feito desta oleaginosa uma cultura agrícola atrativa no contexto globalizado. A soja tem baixo conteúdo de água, alto valor nutritivo e a capacidade de produzir uma grande variedade de produtos para alimentação humana e animal, assim como óleo e derivados industriais. Estas características reduzem sua vulnerabilidade às flutuações de mercado, reduz os custos de estocagem e transporte, o que tem contribuído para sua rápida expansão. Além disso, o aumento na demanda mundial por soja tem resultado em aumento no investimento em pesquisa científica e desenvolvimento de tecnologias e novos produtos (ROSA et al, 2009).

A fermentação é considerada como um dos mais antigos e mais econômicos métodos para a produção e preservação de alimentos. O processo de fermentação de vegetais pode apresentar: 1) aumento da digestibilidade e biodisponibilidade de proteínas, carboidratos, lipídios e minerais, 2) aumento do valor nutricional, quanto ao teor de vitaminas (FENG, 2006).

A fermentação de alimentos por diferentes micro-organismos é responsável pela síntese de enzimas, que hidrolisam os componentes do substrato. O processo fermentativo da soja utilizando os fungos como agentes de fermentação contribuem para o desenvolvimento de uma desejável textura, aroma e sabor. A hidrólise enzimática, também pode diminuir ou eliminar componentes antinutricionais e, conseqüentemente, melhorar a qualidade nutricional do produto fermentado (AZEKE et al, 2007).

O tempeh é um alimento originário da Indonésia, produto feito a partir dos grãos de soja cozidos fermentada, utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus*. Desta fermentação nasce a pasta chamada tempeh. No processo de fabricação não se perde nenhum nutriente do grão, o que o torna um alimento mais rico se comparados e outros derivados da soja. O fermentado é uma ótima fonte de proteínas, não possui gorduras saturadas e não possui colesterol (GUIMARÃES, 2011). Tais propriedades fazem do tempeh um alimento apreciado

pelos vegetarianos, que buscam uma fonte alternativa de proteínas ao excluírem a carne da alimentação.

O tempeh pode ser preparado com adição de temperos para elaboração de pratos culinários ou pode ser consumido no seu estado bruto. Possíveis aplicações do tempeh são: recheio de pizza, elaboração de estrogonofe, formulação de hambúrguer, espetinho de tempeh, ou substituir as proteínas nas mais diversas receitas. Sendo utilizado cortado em tiras ou cubinhos, cozido, tostado na chapa ou refogado (LOTUS, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 O objetivo geral

Estudo de diferentes formulações de meio para produção de tempeh por Fermentação semi-sólida da soja por *Rhizopus oligosporus* NRRL 1526.

2.2 Objetivos específicos foram:

- Testar diferentes formulações de meio para produção do Tempeh;
- Avaliar a influência da quantidade de inóculo;
- Avaliar o tempo de fermentação na elaboração do tempeh;
- Avaliar a influência da quantidade de matéria prima na elaboração do tempeh;
- Realizar a Caracterização físico-química do tempeh;
- Determinar a atividade proteolítica do fermentado.

3. REFERENCIAL TEORICO

3.1 Alimentos ricos em proteínas

As proteínas são compostos orgânicos complexos, essenciais aos organismos animal e humano. Exercem importantes papéis no organismo, como carreadores de íons e moléculas, hormônios, células de defesa, fonte energética e estrutural. Fornecem ao organismo quantidades adequadas de aminoácidos para a síntese e manutenção dos tecidos corporais. A qualidade protéica é um aspecto importante de grande consideração de necessidade humana. Portanto, torna-se importante não somente a quantidade, como o tipo de proteína ingerida, a matriz alimentar em que a proteína é consumida e o estado fisiológico do indivíduo que a recebe (MENDES et al, 2009) .

A soja constitui excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal. Os grãos se caracterizam por conter muito pouco ou nenhum amido, cerca de 20% de óleo e 40% de proteína, que são de elevado valor nutritivo. Vários estudos têm demonstrado que o consumo dos grãos ou produtos derivados de soja está frequentemente associado com a redução do risco de inúmeras doenças, tais como câncer de esôfago, pulmão, próstata, mama e cólon/reto, doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e sintomas da menopausa e isso fez com que o consumo da soja na alimentação humana quadruplicasse nos últimos cinco anos atingindo hoje 4% do total produzido no Brasil (TOLEDO et al., 2007).

Dessa forma, há evidências de que nos últimos anos vem intensificando a inclusão de produtos à base de soja na alimentação humana, visto que esse grão é um dos alimentos mais completos em relação às proteínas. A soja é considerada um alimento funcional, fornece nutrientes ao organismo, trazendo benefícios para a saúde quando consumida como parte de uma dieta saudável. Hoje se encontra no mercado uma razoável quantidade de produtos feitos à base de soja, como por exemplo, extratos de soja utilizados em bebidas e substitutos de produtos cárneos, tais como hambúrgueres e empanados (BERNO et al., 2007).

A proteína de soja, contendo todos os aminoácidos essenciais em adequada proporção, é a única do reino vegetal, produzida em grande escala, que pode substituir razoavelmente bem as proteínas animais sob o ponto de vista nutricional. Os problemas de saúde causados pela má nutrição constituem a realidade do dia a dia para boa parte da população brasileira (CANTO e TURATTI, 1989).

3.1.1 Vegetarianos

Segundo a Sociedade Vegetariana Brasileira, é considerado vegetariano todo aquele que exclui de sua alimentação todos os tipos de carne, aves e peixes e seus derivados, podendo ou não utilizar laticínios ou ovos. O vegetarianismo inclui o veganismo, que é a prática de não utilizar produtos oriundos do reino animal para nenhum fim (alimentar, higiênico, de vestuário etc.) (SBV, 2012).

Existe uma série de fatores que levam uma pessoa a ser vegetariana, desde o simples fato de não simpatizarem com o sabor das carnes até a sensibilidade da pessoa para com os animais, que acabam sendo contra a morte dos animais para seu consumo. Para uma pessoa se tornar vegetariana é necessário ter um cuidado a mais com sua alimentação, pois há alguns nutrientes que estão presentes na carne como Ferro e Proteína principalmente que se não forem retirados de outros alimentos, pode ter um efeito negativo na saúde do indivíduo (PEREIRA, 2012).

As dietas vegetarianas são dietas principalmente com base no consumo de vegetais, no entanto, alguns adeptos a esse tipo de alimentação consomem produtos de origem animal como, ovos e leite.

Alimentos a base de soja podem ser fermentados, que em geral, são alimentos tradicionais orientais como o missô, shoyu, tempeh, natto ou não fermentado, entre os quais os mais populares são leite de soja e tofu. Tem sido consumido por vegetarianos e não vegetarianos para substituir o consumo de carne (BAVIA et al., 2012).

Se considerarmos que uma dieta nutricionalmente vegetariana ela pode ser caracterizada por aumento da ingestão de hidratos de carbono complexos, fibras, proteínas vegetais, gorduras poli-insaturadas, antioxidantes e ácido fólico, com uma diminuição na ingestão de calorias totais de proteína, animais, purinas, gordura total, gordura saturada, açúcares, sódio, colesterol e refinado, poderia melhorar prevenir o aparecimento ou reduzir os sintomas de doenças (ROMÁN e CASTAÑO, 2007).

3.2 Soja

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882. Gustavo Dutra, então professor da Escola de Agronomia da Bahia, realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares introduzidas daquele país. Em 1891, testes de adaptação de cultivares semelhantes aos conduzidos por Dutra na Bahia foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas,

Estado de São Paulo (SP). Assim como nos EUA, a soja no Brasil dessa época era estudada mais como cultura forrageira - eventualmente também produzindo grãos para consumo de animais da propriedade - do que como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais (EMBRAPA, 2013).

É uma leguminosa herbácea anual cujo alto teor protéico de seus grãos (38%) e sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima e fotoperíodo, devido a suas inúmeras variedades a colocam entre as principais oleaginosas do mundo, sendo entre elas a mais cultivada. (BARRETO, 2003).

A exploração dessa oleaginosa iniciou-se no sul do país e hoje já é encontrada nos mais diferentes ambientes, retratado pelo avanço do cultivo em áreas de Cerrado. Nos anos 80, a soja liderou a implantação de uma nova civilização no Brasil Central (principalmente nos estados de Goiás e Mato Grosso), levando o progresso e o desenvolvimento para regiões despovoadas e desvalorizadas. A expansão continua em novos territórios do bioma cerrado, estabelecendo uma nova fronteira agrícola chamada de Mapitoba – Maranhão, Piauí, Tocantins e Bahia, no Norte e Nordeste do país (FREITAS, 2011).

O valor nutricional da soja (*Glycinemax* (L.) Merrill), prende-se ao seu alto teor de proteínas de fácil digestão, rica em aminoácidos essenciais, e ao seu teor de óleo. A soja contém aproximadamente 40% de proteínas, 20% de lipídeos, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibras e 6% de cinza (matéria seca) (VIEIRA, 2007).

Como o consumo de soja enfrenta dificuldades por vários segmentos populacionais, a fermentação é uma alternativa que pode tornar o produto mais aceito, com vantagens como: hidrólise de lipídeos, proteínas, aumento de vitaminas do complexo B, produção de enzimas desejáveis, etc (TAVARES e KIYAN, 2002).

3.3. Fermentação semi-sólida (FSS)

A FSS é definida como qualquer processo de fermentação realizada sobre um material não solúvel, que atua como o suporte físico e fonte de nutrientes, na ausência de líquido de fluxo livre. O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de micro-organismos, principalmente de leveduras e fungos, embora algumas bactérias também têm sido utilizadas (PANDEY, 1992).

A natureza do substrato sólido utilizado é um fator muito importante, que afeta os processos de FSS e sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados com

custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de vários resíduos agroindustriais. No processo FSS o substrato sólido, não só fornece os nutrientes para da cultura, mas também serve como um ponto de ancoragem para as células microbianas. Entre os vários fatores, que são importantes para o crescimento microbiano e da atividade de um substrato especial, a umidade e atividade de água são os mais críticos (SANTOS, 2007).

A Fermentação Semi-Sólida é definida como sendo uma fermentação envolvendo substratos sólidos com teor de umidade suficiente para o crescimento e metabolismo dos micro-organismos. No estudo de processos fermentativos, a otimização das variáveis, principalmente parâmetros físicos e químicos, são de extrema importância devido ao seu impacto na economia e viabilidade técnica do processo (SANTOS, 2006).

De um modo geral a FSS é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Estes materiais sólidos podem ser biodegradáveis ou não. Para a FSS, é necessário que os micro-organismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface líquido-sólido (SANTOS ET AL., 2006).

3.3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos vêm desempenhando um papel importante na produção de alimentos. Os vários produtos de fermentação microbiana também são incorporados em alimentos como aditivos e suplementos (antioxidantes, sabores, corantes, conservantes, adoçantes) (COUTO e SANROMAN, 2006).

Muitas vezes os fungos foram comparados a vegetais, no entanto, são organismos que não possuem clorofila em suas células e, portanto não realizam fotossíntese. Todos os fungos são eucariontes e podem ser unicelulares (leveduras, quitrídias), ou multicelulares. Normalmente possuem dois núcleos em suas células os quais podem ser visualizados pelo microscópio óptico empregando-se técnicas de coloração apropriadas.

Estima-se que hoje existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies. Infelizmente, devido à ação predatória do meio ambiente várias espécies de fungos estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo imensurável para o equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies. Foram agrupados em um reino a parte - Reino Fungi – por apresentarem características peculiares que os diferem tanto de animais como de vegetais, além do grande número de

espécies encontradas por todo o planeta. Os fungos utilizam uma variedade de substratos como fontes de carbono, entretanto, alguns grupos se especializaram em degradar substratos particulares, tornando-se mais competitivos perante outros micro-organismos. Por essa razão os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta. (SILVA e COELHO, 2006).

A fermentação de micro-organismos é uma atividade multidisciplinar que envolve a participação de microbiologistas, bioquímicos, orgânica químicos, técnicos de enzimologia e engenheiros com especialização em química, bioquímica, mecânica, civil e ambiental. O desenvolvimento de processos de fermentação microbiana envolve muitos passos, que foram agrupados em seis atividades: (a) o isolamento, rastreamento e seleção apropriada do micro-organismo, (b) a otimização das propriedades físico-químicas e os parâmetros nutricionais, bem como a padronização de operações unitárias de processos em um laboratório, (c) a escala de estudos de acompanhamento e, se necessário, o concepção e o estabelecimento da planta piloto, (d) geração de dados de engenharia e design e layout da planta comercial; (e) construção da usina e da resolução de dificuldades na operação da planta durante a etapa de incubação; (f) a operação regular da planta para a produção de metabolitos microbianos. Aumento de escala, por conseguinte, o elo crucial na transferência de escala de laboratório processar a produção em escala comercial (LONSANE et al., 1992).

O objetivo principal da fermentação de cereais e sementes não é tanto a sua preservação, mas a modificação das suas propriedades organolépticas e nutricionais. No Oriente, a tradicional arte de processamento da por fermentação resultou em vários alimentos deliciosos, fáceis de digerir, nutritivos e saudáveis.

As principais vantagens da fermentação de alimentos em relação a outros processos são a formação de flavor, especialmente importante em dietas vegetarianas a base de arroz, e a prevenção de contaminações microbianas indesejáveis (ROSA et al, 2009). Qualquer material vegetal disponível pode ser utilizado como um substrato, desde que se possa apoiar o crescimento de *Rhizopus* spp. e ser adequada para consumo humano após a fermentação (FENG, 2006).

3.4 Tempeh

Trata-se de um alimento não convencional, originário da Indonésia, produzido a partir da fermentação de grãos de soja descascados, cozidos e inoculados com o fungo *Rhizopus oligosporus* (TAVARES e KIYAN, 2002).

O tempeh é um fermentado que torna o grão mais leve e nutritivo produzido a partir da utilização dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus* ou *R. stolonifer*, e também com a participação, com menor relevância, de bactérias e outros fungos. O Tofu, também chamado de queijo de soja, é preparado a partir da fermentação da soja utilizando-se outros zigomicetos, como *Actinomucolegans* ou outras espécies do gênero *Mucor* e de *Rhizopus*. O oncom, uma comida típica da Indonésia, trata-se de uma pasta de amendoim fermentada pela espécie *Rhizopus oligosporus* (SILVA e COELHO, 2006).

A transformação da soja em tempeh através da fermentação com o fungo *Rhizopus oligosporus* que melhora a textura, sabor e aroma do produto. O tempeh tem uma textura macia, devido a ação do fungo e a matriz intercelular entre células vegetais. Um aroma leve de cogumelo é evidente no tempeh, como resultado da ação do micélio fúngico em proteínas e lipídios da soja (FEREEIRA et al, 2011).

A fermentação de alimentos visa acentuar o sabor e aroma e é muito apreciado pelos povos orientais, os quais têm como costume promover a fermentação de soja, arroz, trigo e outros cereais. Além da acentuação no sabor dos alimentos, tem-se a liberação de substâncias benéficas para o organismo humano, como muitas enzimas e polissacarídeos.

O tempeh é um alimento feito principalmente de soja, no entanto, pode ser feito a partir de uma variedade de leguminosas e sementes sendo que seu nome é dado a partir da matéria-prima utilizada. Este produto é distribuído em quatro etapas do processo de fabricação, imersão, fervura, inoculação microbiana e incubação. Produzido principalmente por indústrias de pequeno porte com uma produção de 10 kg á 4 toneladas por dia. Estima-se que há mais de 100 000 produtores de tempeh espalhados nas províncias da Indonésia. Populações urbanas e rurais, especialmente em Java, geralmente consomem tempeh como uma parte da sua alimentação diária. Devido sua grande quantidade de proteínas (ASTUTI et al., 2000).

Os fatores antinutricionais existentes nos alimentos podem desencadear efeitos fisiológicos não desejados, ou ainda, reduzir a biodisponibilidade e absorção de alguns nutrientes (SILVA e SILVA, 2000).

Os grãos de cereais contem varias fontes antinutricionais, tais como: 1) o acido fítico, 2) taminos, e 3) os polifenóis(SANDGERG e SVANGERG, 1991; SVANBERG et al, 1993; MATUSCHEK et al, 2001). Durante o processo de fermentação para obtenção do tempeh com *R. oligosporus* pode reduzir ou eliminar estes fatores anti-nutricionais (HACHMEISTER e FUNG, 1993; RODRIGUEZ-BÜRGER et al., 1998).

Com a produção do tempeh, a partir da fermentação semi-sólida da soja, pode-se aumentar a biodisponibilidade de proteínas, lipídios, hidratos de carbono e minerais, tais como ferro e zinco (STEINKRAUS et al, 1983;. NOUT & ROMBOUTS, 1990; HACHMEISTER & FUNG, 1993; RODRÍGUEZ-BÜRGER et al, 1998; ASTUTI et al, 2000).

Vitaminas, tais como a niacina (B3), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido pantoténico e tiamina, também podem ser produzidos pelo fungo *R. oligosporus*, durante a fermentação do tempeh (NOUT & ROMBOUTS, 1990; MUGULA, 1992; SHURTLEFF & AOYAGI, 2001; NOUT & KIERS, 2005).

O consumo de soja enfrenta dificuldades por vários seguimentos populacionais, a fermentação é uma alternativa que pode tornar o produto mais aceito, com vantagens como: hidrólise de lipídeos, proteínas, aumento no conteúdo de algumas proteínas do complexo B, produção de enzimas desejáveis etc. Há autores que dizem que a hidrólise de proteínas fornece 85% de aminoácidos livres, o que torna o tempeh um alimento favorável a indivíduos com alguma disfunção do trato gastrointestinal (TAVARES e KIAN, 2002).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de ensino e pesquisa na Universidade Federal do Maranhão, Campus II, no Centro de Ciência Sociais Saúde e Tecnologia, Imperatriz- MA.

4.1. Matéria-Prima

Utilizou-se a soja como matéria-prima para realizar as fermentações, adquirida no comércio da cidade de Imperatriz, Maranhão.

4.2. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado com agente de fermentação foi a linhagem do fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* NRRL 1526, que foi gentilmente cedido da coleção de micro-organismos de Northern Regional Research Laboratory (NRRL) dos Estados Unidos.

4.2.1 Conservação e ativação da linhagem

Os esporos de *Rhizopus oligosporus* NRRL 1526 liofilizados vieram armazenados em capsulas de vidro até a Universidade Federal do Maranhão, após o recebimento dos esporos, os mesmo foram reativados em duas etapas. Na primeira etapa realizou-se a transferência destes para tubo de ensaio rosqueados com meio ágar inclinado batata dextrose, cuja composição encontra-se detalhada no anexo A e incubada a 30 °C por 10 dias em estufa e posteriormente conservados a 4°C. A segunda etapa consistiu-se na transferência dos esporos do ágar da primeira etapa para novo ágar em placas de petri e incubada a 30 °C por 10 dias em estufa (Figura.1a).

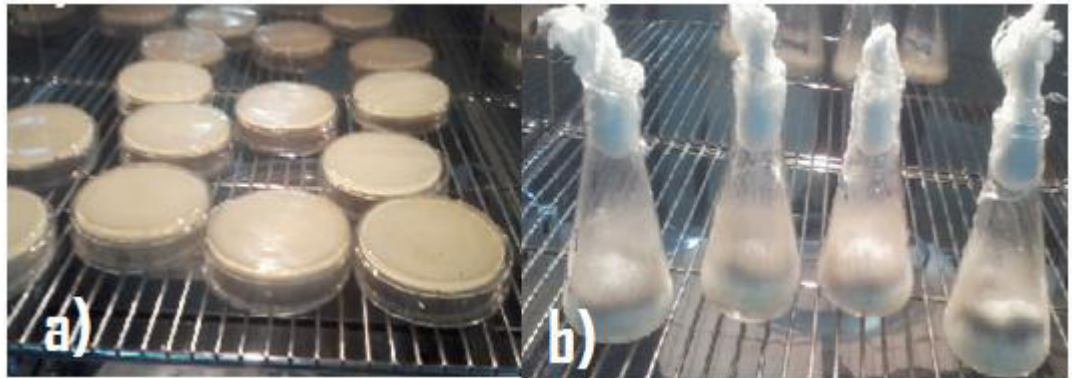
4.2.2 Preparo do inóculo em arroz

Os esporos da segunda etapa de ativação foram suspensos mediante a adição de 10 mL de água destilada estéril. O volume de 1mL da suspensão de esporos foi utilizado como inóculo em 20 g de meio de arroz em frascos Erlenmeyers de 125 mL, o meio inoculado foi incubado a 30 °C por 10 dias em estufa (Figura 1b).

Durante o período de incubação foram observados aspectos de coloração, esporulação e formação de micélio aéreo, sendo esta um indicativo de condições ambientais adversas, escassez de nutrientes, de água e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento

fúngico. Posteriormente, os frascos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C por, no máximo três meses, para serem utilizados como inóculo das fermentações.

Figura 1 - a) Etapa de ativação do *Rhizopus oligosporus*; b) Etapa de esporulação *Rhizopus oligosporus*.



Fonte: BRITO, 2013

4.3 Inóculo para fermentação semi-sólida

Foram adicionados 40 mL de água destilada estéril em cada Erlenmeyers contendo o arroz com os esporos. Com o auxílio de um bastão de vidro foi realizada a agitação manual dos frascos para promover a liberação dos esporos. Em seguida, a suspensão foi filtrada com gaze estéril e transferida para recipiente também estéril.

4.4 Meio de fermentação para obtenção do tempeh

O meio para a fermentação semi-sólida constiuu-se basicamente de soja. Foi necessário a realização de etapas de pré-tratamento para a utilização da soja nas fermentações. As etapas de preparação da soja foram: hidratação dos grãos, acidificação, cocção, retirada da casca, drenagem e arrefecimento, de acordo com o Fluxograma (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma das etapas para preparação da soja.



Fonte: BRITO, 2013

As etapas empregadas na preparação da soja foram:

Etapa 1: Pesou-se a quantidade de soja a ser fermentada, levando em consideração que os grãos absorverão grande quantidade de água.

Etapa 2: Os grãos de soja foram submetidos a uma hidratação por imersão em água fria durante um período de 8 a 12 horas.

Etapa 3: O ácido acético foi adicionado à 2 litros de água, são utilizados 25 mL desse. Este passo é executado para evitar o crescimento de indesejados micro-organismos.

Etapa 4: Todo o conteúdo foi transferido para uma panela, onde haverá o cozimento durante 30 minutos. Se necessário, adiciona-se água até que possa cobrir os grãos.

Etapa 5: Após o cozimento, as peles do grão foram removidos para promover uma melhor crescimento do micro-organismo. Este passo pode ser feito, friccionando os grãos juntos com as mãos, apertando-os com um movimento de amassar. Deve-se mexer delicadamente fazendo com que as cascas subam à superfície, em seguida jogar fora a água e

cascas em uma peneira. Adiciona-se água limpa e repete-se até que a maioria das cascas sejam removidas.

Etapa 6: Drenou-se toda água depois de executar a Etapa 5, com uma peneira.

Etapa 7: Os grão foram submetidos ao arrefecimento, procedimento em que a soja é levada para secagem em estufa ou deixar os grãos na panela em fogo brando, ambos até que os grãos fiquem secos.

4.4.1 Parâmetros avaliados

4.4.1.1 Avaliação de diferentes formulações para obtenção do tempeh

Condição 1: adaptada de Babu et al., (2009)

- Os grão de soja secos foram hidratados por imersão em água fria durante a noite, aproximadamente 12 horas;
- Adicionou-se 5mL de ácido acético;
- Friccionou-se os grãos juntos com as mãos, para que as cascas se desprendessem;
- Tempo de cozimento dos grãos de 90 minutos;
- Os grãos foram secos em temperatura de 60 °C durante 10 minutos;
- Após a secagem, os grãos foram deixados em descanso até que estejam a uma temperatura de 37-38 ° C, momento ideal para iniciar a inoculação;
- Volume de inóculo de 1,5 mL para 40g de soja, cozida e descascada em Erlemeyers de 250 mL;
- Após a adição do inóculo realizou-se a homogeneização com bastão de vidro, para aumentar a superfície de contato do micro-organismo com o substrato, em seguida o meio foi incubado a uma temperatura de 30 ° C por 5 dias;

Condição 2: adaptada de Ferreira et al., (2011)

- Tempo de cozimento de 10 minutos;
- Em seguida foram descascados;
- Depois os grãos de soja descascadas foram embebidos em água e deixados em repouso durante 17 horas à temperatura ambiente;
- Em seguida a água foi descartada e os cotilédones foram hidratados novamente para o cozimento durante 30 minutos;
- Após a cocção a água foi drenada e os cotilédones cozidos foram arrefecidos a temperatura ambiente;

- Em seguida adicionou-se volumes de diferentes quantidades de esporos do fungo *Rhizophus oligosporus* NRRL 1526, aos cotilédones cozidos e arrefecidos;

Avaliação de diferentes concentrações de inoculo: 0,5 mL ; 1,0 mL e 1,5 mL de *Rhizophus oligosporus* para 100 g de soja.

- Foram embalados em sacos de plásticos perfurados a uma temperatura de 30 °C.

- A cada 24 horas de incubação amostra foram retiradas para análise durante 72 horas;

Condição 3:

- Pesou-se 250 g de soja;

- Os grãos foram embebidos de 2 litros de água e deixados descansar durante 10 horas;

- A soja foi friccionada com a ajuda das mãos, para que os grãos fossem divididos com um movimento de amassar;

- Agitou-se suavemente para que as cascas subissem para superfície, em seguida decantar a água e os cascos em uma peneira;

- Em uma panela, a soja foi coberta de água e adicionando-a o vinagre, 25mL, e colocada para cozinhar durante 30 min;

- Retirou-se a água e continuou aquecendo-a na panela em fogo baixo até a secagem dos grãos;

- Volume de inóculo testados: 2mL, 4 mL e 6 mL/100 g e incubados a 30 °C em, em sacos plásticos perfurados por 24 horas.

Condição 4:

- Os grãos foram embebidos em água corrente durante 10 horas;

- Adicionou-se ácido 25 mL de ácido acético;

- Em seguida realizou-se a cocção da soja por 40 min;

- Os grãos foram colocados para descansar;

- Transferiu-se a soja para uma panela de alumínio, em fogo brando, mexendo-a com uma colher durante 10 minutos para a secagem da água;

- Logo após inoculou-se o micro-organismo nos grãos em um béquer de 500 mL; agitou-se com um bastão de vidro e transferiu-se a soja para sacos plásticos perfurados;

- Variação da quantidade de substrato em relação ao volume de inóculo: 4mL/100 g de substrato; 4 mL/ 200 g de substrato;

- Amostras retiradas a cada 24 horas, durante 48 horas;
- Incubou-se a 30 °C

- **Condição 5:**

- Nesta condição o micro-organismo foi inoculado, na soja, na sua forma vegetativa, utilizou-se o fungo com apenas cinco dias de incubação antes da esporulação do micro-organismo;

- Os grãos foram embebidos em água corrente durante 10 horas em seguida cozinhou-se a soja por 40 min;

- Descascou-se os grãos, colocou-se a soja em uma panela de alumínio, em fogo brando, mexendo-a com uma colher durante 10 minutos para a secagem da água;

- Logo após inoculou-se o micro-organismo nos grãos em um béquer de 500 mL, agitou-se com um bastão de vidro e transferiu-se a soja para sacos plásticos perfurados;

- Variação do volume de inóculo e quantidade de substrato: 4mL/100 g de substrato, 8 mL/200 g de substrato e 12 mL/300 g de substrato;

- Incubou-se a 30 °C por 24 horas.

- **Condição 6**

- Nesta condição não adicionou-se o ácido acético;

- Cozinhou-se a soja em panela de pressão.

- A soja foi embebida em água por 12 horas;

- Cocção da soja por 10 min em panela de pressão;

- Friccionou-se os grãos juntos com as mãos, para que as cascas se desprendam;

- Variação do volume de inóculo e quantidade de substrato: 4mL/100 g de substrato, 8 mL/200 g de substrato e 12 mL/300 g de substrato por 24 horas.

- **Condição 7**

- Nesta condição o ácido acético foi adicionado;

- Cozinhou-se a soja em panela de pressão.

- A soja foi embebida em água por 12 horas;

- Cocção da soja por 10 min em panela de pressão;

- Friccionou-se os grãos juntos com as mãos, para que as cascas se desprendam;

- Variação do volume de inóculo e quantidade de substrato: 4mL/100 g de substrato, 8 mL/200 g de substrato e 12 mL/300 g de substrato por 24 horas.

Condição 8

- Os grãos foram embebidos de 2 litros de água e deixados descansar durante 10 horas;
- A soja foi friccionada com a ajuda das mãos, para que os grãos fossem divididos com um movimento de amassar;
- Agitou-se suavemente para que as cascas subissem para superfície, em seguida decantar a água e os cascos em uma peneira;
- Na panela, a soja foi coberta de água e adicionou-se 25 mL de vinagre;
- Colocou-se para cozinhar durante 30 min;
- A soja então foi levada para estufa a 60 °C por 10 minutos;
- Variação do volume de inóculo e quantidade de substrato: 3mL/100 g de substrato, 4 mL/100 g de substrato e 6 mL/200 g de substrato;
- Inoculou-se com micro-organismo *Rhizopus oligosporus* à soja, em sacos plásticos perfurados;
- E encubado a 30 °C por 24 horas.

4.4.1.3 Caracterização físico-química do tempeh

Com o objetivo de determinar as características físico-químicas da melhor condição encontrada do tempeh, foram determinados os teores de , proteínas, lipídeos, fibras, cinzas, carboidratos, umidade e atividade de água (A_w).

- **Umidade**

A umidade foi determinada pela balança de umidade, modelo MAC 210. Com base na determinação de voláteis a 105 °C. Pesou-se aproximadamente 1 g da amostra em um vidro- relógio previamente tarado. Então o equipamento estabelece a umidade.

- **Atividade de água (A_w)**

A atividade de água foi determinada através do medidor digital de A_w utilizando o equipamento AQUALAB Dew point waterctivilymite 4tl, à temperatura de (25 °C ± 4 °C).

- **Determinação do pH**

Para a determinação do valor de pH pesou-se 10 g do tempeh, a amostra foi triturada em liquidificador industrial; colocou-se em um béquer de 15 mL e adicionou-se 10 mL de água destilada em agitação por 30 minutos. Mediu-se o pH com auxílio de potenciômetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

- ***Lipídeos***

Os lipídeos foram extraídos através do equipamento soxhlet de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do IAL (2008).

- ***Cinzas***

As cinzas foram determinadas, segundo o método recomendado pelo IAL (2008). Pesou-se em cadinho de porcelana, previamente tarado, cerca de 3 g de tempeh dessecada. Levou-se a amostra para a carbonização em temperatura de 200 °C e em seguida, incinerou-se a amostra em mufla a temperatura de 550°C. Deixou-se reduzir a temperatura da mufla até aproximadamente 80 °C e transferiu-se o cadinho para um dessecador. A quantidade de cinzas foi estabelecida como a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100 expressando um valor percentual da mesma.

- ***Carboidratos***

Método da diferença de 100 (subtraindo o teor de proteínas, fibras, lipídeos, cinzas e umidade) descrito nas Normas Analíticas do IAL (2008).

- ***Proteína***

Fração protéica foi determinada pelo Método sugerido na esalq de piracicaba-departamento de zootecnia- ruminantes. O Princípio do método no fato de as proteínas terem porcentagem de nitrogênio quase constante, em torno de 16%, o que se faz é determinar o nitrogênio e pôr meio de um fator de conversão, transformar o resultado em proteína bruta. Inicialmente faz-se a digestão da amostra, onde o nitrogênio orgânico é transformado em amônia, e os compostos orgânicos são convertidos em CO₂, H₂O etc. Pela titulação, faz-se a determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora, transformando o valor para % de proteína bruta.

- ***Fibras***

A determinação do teor de fibras foi realizada utilizando 1 g da amostra previamente realizada da extração de lipídeos, em seguida colocou-se em um balão de fundo chato esmerilado (250 mL), adicionou-se 100 mL de solução ácida preparada de acordo com o método do IAL (2008) para fibra bruta. Levou-se a amostra ao aquecimento por 40 min a 105 °C, com auxílio do condensador e banho refrigerado a 20 °C. Em seguida a amostra foi filtrada e lavada com água destilada quente até pH neutro, então a amostra foi levada a estufa por 1 hora a 105 °C, esperou-se esfriar. Logo após pesou-se subtraindo a massa do papel de filtro utilizado durante a filtração.

Determinação enzimática

- *Atividade enzimática de protease*

Conforme Charney e Tomarelli (1947), a mistura de reação constituiu de 1mL de solução 0,5% de azocaseína em tampão acetato 50 mM e pH 5,0 e 1 mL do extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 40 minutos. Após os 40 minutos, a reação foi parada com adição de 1mL de solução de ácido tricloroacético 10% , objetivando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação a 3.600 rpm por 15 minutos. Transferiu-se 2mL do sobrenadante contendo aminoácidos e oligopeptídeos de baixo peso molecular para um tubo de ensaio, e adicionou-se 2 mL de KOH 5 N, formando um composto com cor característica que foram quantificados por espectrofotômetro com comprimento de onda de 428 nm, contra um branco preparado em condições idênticas, mas utilizando 1mL de água destilada em substituição à amostra.

Para obtenção do branco de cada amostra, adicionou-se 1mL de solução de ácido tricloroacético logo após a formação da mistura reacional (1 mL de solução de azocaseína e 1mL do extrato enzimático).

Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorvância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições de reação estabelecidas. A atividade enzimática foi expressa através da diferença de absorvância entre as amostras enzimáticas analisadas com seus respectivos brancos, sendo 1 unidade = Absorvância - 0,01/ tempo de reação por mL do extrato enzimático.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das condições estudadas

5.1.1 Condição 1

Testou-se nesta condição o volume de inóculo de 1,5 mL para 40 g de soja, em Erlenmeyer de 250 mL, por 120 horas de processo fermentativo.

Não foi observado o crescimento denso do micélio, formando uma massa branca característica do tempeh, de 24 a 120 horas de processo fermentativo. A formulação do tempeh avaliado neste processo fermentativo resultou em um produto de odor e coloração não característicos (Figura 3). O tempo de fermentação e o reator utilizado no processo não propiciaram condições necessárias para que a fermentação da soja fosse realizada pelo micro-organismo e obter as características do tempeh com os grãos ligados a massa sólida por crescimento dos micélios dos fungos (NOUT e ROMBOUTS, 1990).

Figura 3 - Condição1: Soja fermentada com volume de inóculo de 1,5 mL para 40 g de soja, em Erlenmeyer de 250 mL, por 120 horas.



Fonte: BRITO, (2013).

5.1.2 Condição 2

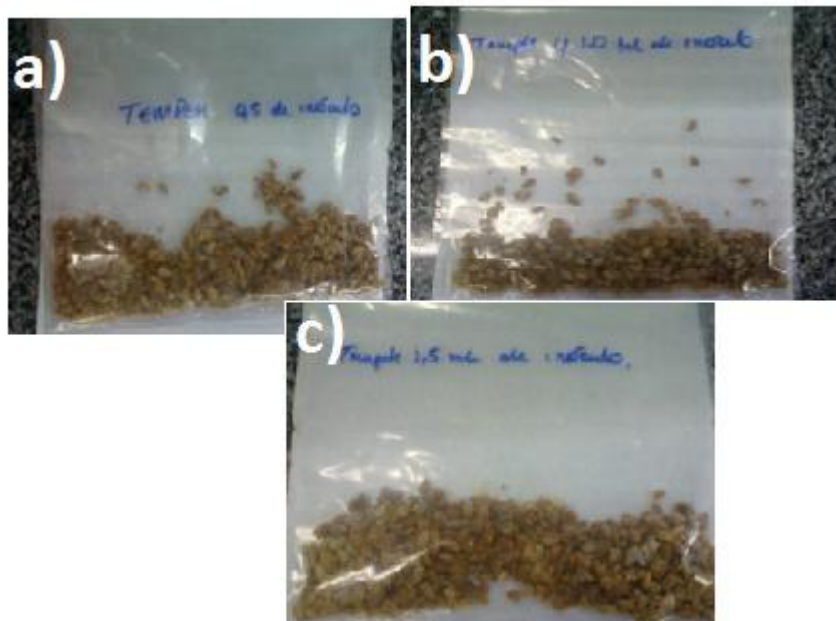
Nesta condição avaliou-se diferentes concentrações de inóculo: 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL de *Rhizopus oligosporus* para 100 g de soja, sem adição de ácido acético e o tipo de reator utilizado foi saco plástico perfurado durante 72 horas de processo fermentativo. Observou-se que as amostras retiradas a cada 24 horas de incubação apresentavam coloração escura e odor não característico e a cada 24 horas que se passou estas características

intensificaram-se. Não observou a formação da massa branca compacta desejada que é uma característica do produto fermentado obtido pelo crescimento do micélio do fungo. Isso pode ter ocorrido devido a não acidificação do meio, uma vez que, o ácido acético não foi adicionado não proporcionando a condição ideal de pH para o crescimento do micro-organismo.

A fermentação para a produção do tempeh é considerada completa quando os grãos são ligados firmemente e compactados em bolos brancos pela ação do micélio do fungo (RUSMIN e KO, 1974). Porém, as amostras retiradas com 24 h, 48 h e 72h não obtiveram estas características, apresentando um escurecimento dos grãos de soja, não desejada (Figura 4, 5 e 6).

Observou-se que a adição de ácido acético é necessário para evitar o crescimento de micro-organismos indesejáveis, principalmente de bactérias patogênicas, além de o crescimento do *Rhizopus oligosporus* ser pouco afetado pela ambiente ácido, por ser um micro-organismo acidófilo. A taxa de crescimento de bolores mantém-se, enquanto o pH é igual ou superior a 3,5 e é ligeiramente mais lenta quando os grãos foram mais ácido (BABU et al., 2009), Segundo Felipe et al., (1995) o ácido acético é um dos principais inibidores do metabolismo microbiano.

Figura 4 - Soja fermentada nas concentrações de 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5ml/ 100 g de substrato – amostras avaliadas com 24 h de incubados.



Fonte: BRITO, (2013).

Figura 5 - a) Soja fermentada nas de concentrações de 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5 mL/ 100 g de substrato – amostras retiradas com 48h de incubados.



Fonte: BRITO, (2013).

Figura 6 - a) Soja fermentada nas de concentrações 0,5 mL/100 g de substrato; b) 1,0 mL/100 g de substrato; c) 1,5 mL/ 100 g de substrato – amostras retiradas com 72 h de incubados.



Fonte: BRITO, (2013).

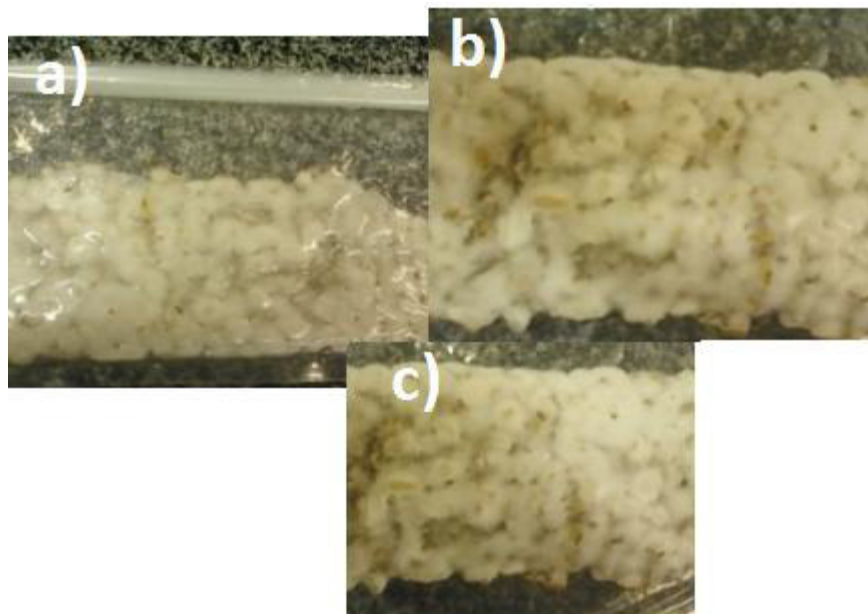
5.1.3 Condição 3

Os volumes de inóculo testados nesta condição foram: 2mL, 4 mL e 6 mL/100 g de substrato, em sacos plásticos perfurados durante 24 h de processo fermentativo, adicionando-se ácido acético.

A fermentação do tempeh foi fortemente influenciada pelos volumes de inoculação de *R. oligosporus*. Quando *R. oligosporus* foi inoculado no volume de 2 mL observou-se a obtenção de massa compacta formada pela interação dos micélios com a soja, grãos ligados em uma massa sólida por crescimento dos micélios dos fungos (Figura 7- a). Essas características também foram encontradas no trabalho de Rosa et al, (2009) obtendo uma massa branca compacta, envolvida pelos micélios do fungo.

O mesmo foi observado nos volumes 4mL e 6 mL, no entanto, apresentaram pontos escuros não característicos do produto final, mostrando que os micélios não aderiram toda a superfície da soja (Figura 7-b e Figura 7-c).

Figura 7 - Soja fermentada nas concentrações de a) 2mL/100 g de substrato ; b) 4 mL/100 g de substrato; c) 6 mL/100 g de substrato - amostras retiradas com 24 h de incubados.



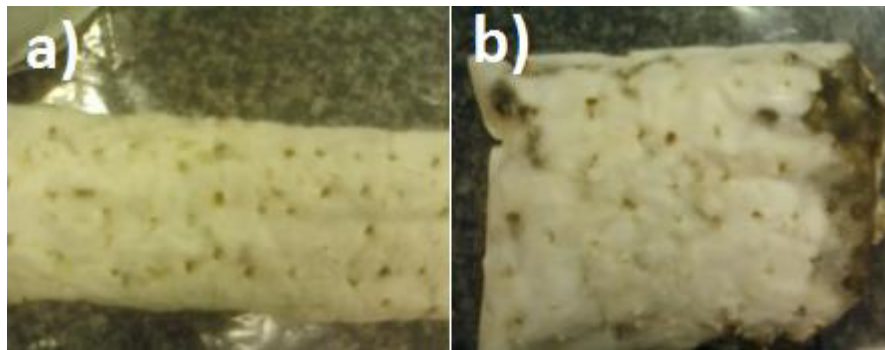
Fonte: BRITO, (2013).

5.1.4 Condição 4

Nesta condição foram produzidos tempeh com volumes de inoculo de: 4mL/100 g, em sacos plásticos perfurados com amostra sendo retiradas a cada 24 horas durante 48 horas. Para que fosse avaliado o melhor tempo de fermentação.

Observou-se na (Figura 8-a) que o tempeh retirado com 24 horas de incubação apresentou grãos ligados firmemente e compactados em bolos brancos pela ação do micélio do fungo, como cita Feng, (2006), em seu trabalho. No entanto, o tempeh retirado com 48 horas apresentou cor escura não característica, em meio aos grãos de soja, cor não característica da soja fermentada. (Figura 8- b).

Figura 8 - a) Soja fermentada incubada por 24 horas em concentração de 4mL/100 g de substrato; b) Soja fermentada, incubado por 48 horas, em concentração de 4 mL/100 g de substrato.



Fonte: BRITO, (2013).

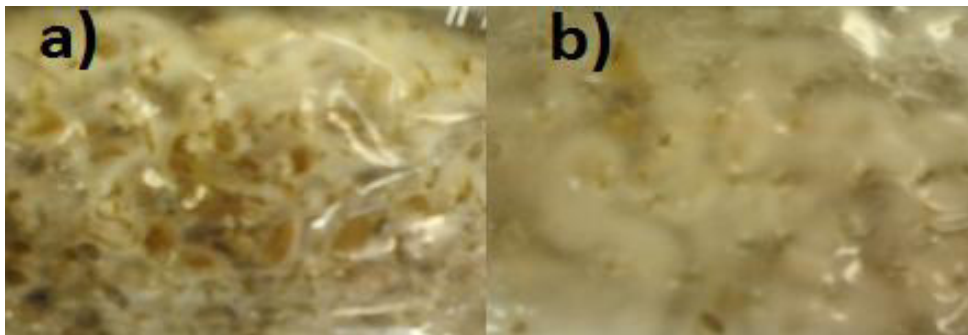
5.1.5 Condição 5

A variação da quantidade de substrato em relação ao volume de inoculo observada foi de: 4mL/100 g de substrato; 4 mL/ 200 g de substrato.

Nesta condição adicionou-se ácido acético e utilizaram-se como reator sacos plásticos perfurados, no entanto, o micro-organismo foi inoculado na sua forma vegetativa, inoculou-se o fungo com apenas cinco dias de incubação (Figura 1). Esta condição foi realizada para análise do poder fermentativo do fungo na produção do tempeh.

A produção do tempeh ocorreu com 24 horas de incubação produzindo odor desagradável e cor escura (Figura 9). Não se obteve a forma esperada com, grãos ligados firmemente e compactados em bolos brancos (RUSMIN e KO, 1974), se comparada ao tempeh quando inoculado com *Rhizopus oligosporus* esporulado.

Figura 9 - Soja fermentada incubado por 24 horas em concentração de: a) 4mL/100 g de substrato; b) 4 mL/ 200 g de substrato.



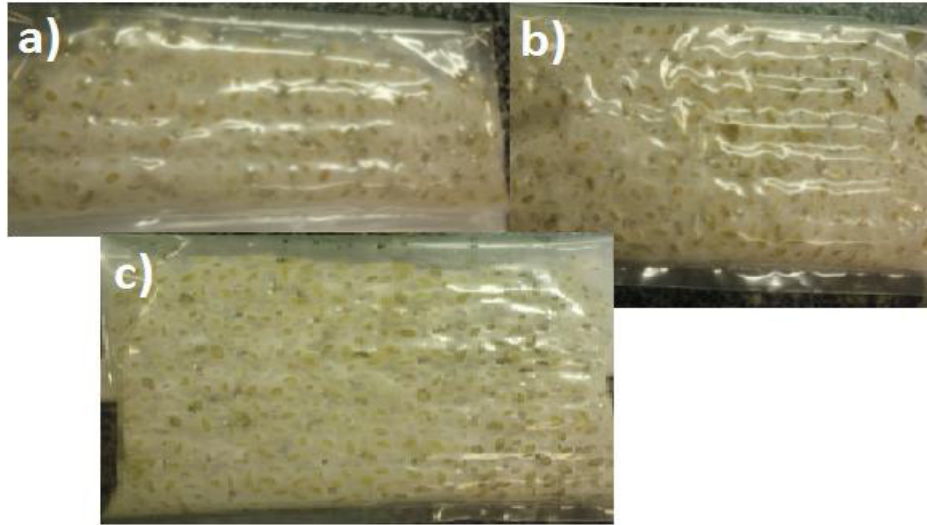
Fonte: BRITO, (2013).

5.1.6 Condição 6

Nesta condição o ácido acético também não foi adicionado. As variações do volume de inóculo e quantidade de substrato: 4mL/100 g de substrato, 8 mL/200 g de substrato e 12 mL/300 g de substrato; os reatores utilizados foram sacos plásticos perfurados para serem retirados após 24.

A produção do tempeh é considerada completa quando o desenvolvimento do fungo compacta a soja, dando ao produto o aspecto de uma massa branca (ROSA et al, 2009). Porém as amostras da (Figura 10-a, 10-b e 10-c) não obtiveram estas características, apresentando um escurecimento dos grãos de soja, aspecto não desejado para o produto.

Figura 10 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de: 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.



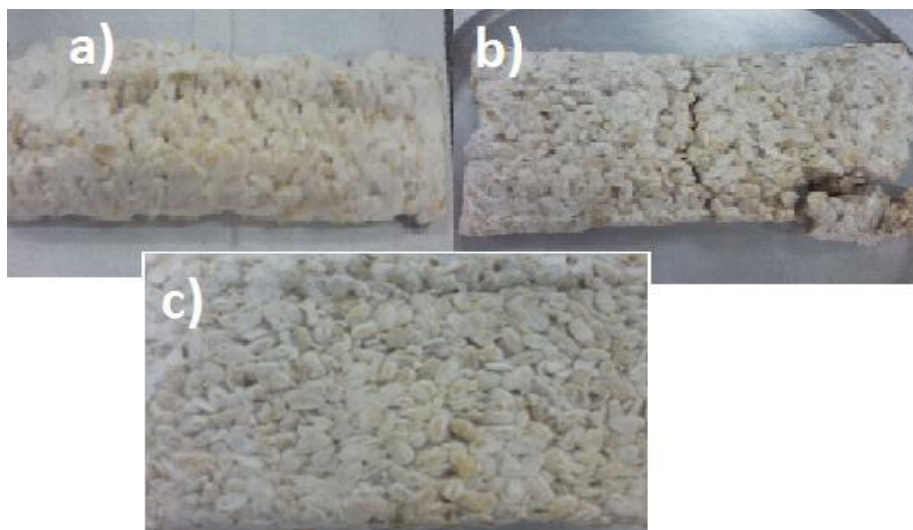
Fonte: BRITO, (2013).

5.1.7 Condição 7

A condição 7 apresentou-se com a variação do volume de inóculo e quantidade de substrato: 4 mL/100 g de substrato, 8 mL/200 g de substrato e 12 mL/300 g de substrato.

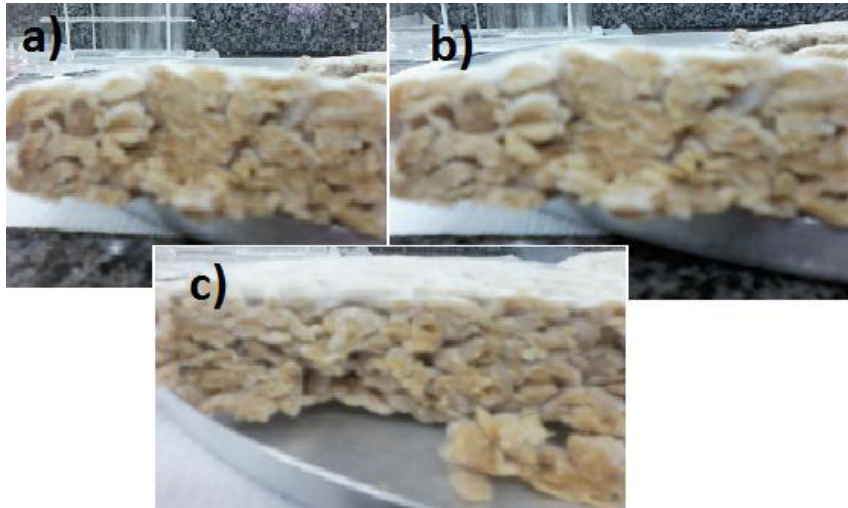
O produto fermentado apresentou grãos unidos em uma massa compacta, apresentado na Figura 11 e exalando um cheiro agradável, devido à ação desejada dos microorganismos, o tempo necessário para fermentação de 24 horas, proporcionada pelo tipo de reator utilizado, permitindo a oxigenação suficiente para respiração do fungo, semelhante ao produto descrito por Feng (2006) (Figura 13).

Figura 11 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de: 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.



Fonte: BRITO, (2013).

Figura 12 - Soja fermentada, cortada na transversal: a) 4mL/100 g de substrato; b) 8 mL/200 g de substrato; c) 12 mL/300 g de substrato.



Fonte: BRITO, (2013).

Figura 13 - Ilustração de tempeh refrigerados pronto para o consumo.



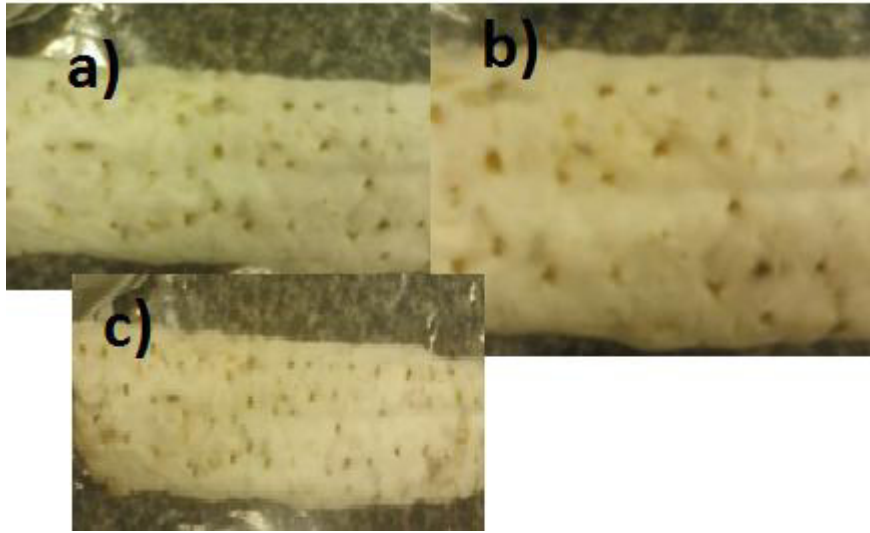
Fonte: BRITO, (2013).

5.1.8 Condição 8

Nesta condição o volume de inóculo e a quantidade de substrato: 3mL/100 g de substrato, 4 mL/100 g de substrato e 6 mL/200 g de substrato.

O produto apresentou características desejadas, de odor agradável e característico e uma massa branca compacta (Figura 14). Com o desenvolvimento do fungo, o micélio se desenvolve envolvendo o grão, dando ao produto o aspecto de uma massa branca compacta (ROSA et al, 2009).

Figura 14 - a) Soja fermentada, incubado por 24 horas em concentração de 3mL/100 g de substrato;b) 4 mL/100 g de substrato; c) 6 mL/200 g de substrato.



Fonte: BRITO, (2013).

5.2 Caracterização físico-química - Condição 7

De acordo com as condições testadas, escolheu-se a condição 7 que foi a que mais se aproximou dos resultados da literatura pesquisada, portanto, fez-se a caracterização físico-química e determinação da atividade proteolítica.

5.2.3 Determinações físico-químicas

A Tabela 1 reporta as análises físico-químicas da melhor condição encontrada, com resultados de proteínas, umidade, lipídios, cinzas e carboidratos em porcentagem para 100 g de tempeh.

Tabela 1 – Composição química do tempeh – valores convertidos para 100 g de tempeh.

Amostra	Proteínas	Umidade	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos
	%	%	%	%	%
Tempeh – Condição 7	28,90	51,64	1,67	0,06	17,73

Fonte: BRITO (2013).

Verifica-se com base na composição química, que o tempeh apresentou um alto teor de proteína, o que é evidenciado pela porcentagem de 28,90%. Observando um valor menos do que Tavares e Kiyon, (2002) cita em seu trabalho, uma porcentagem de 43,6% de proteína para 100 g de farinha de tempeh.

A primeira estimativa do valor nutricional de um alimento ou de uma dieta deve ser feita com base no conhecimento da composição química, portanto da proporção em que os diferentes nutrientes estão presentes (SHAMBURY et al., 1992). Comprovadamente as fontes proteicas de alto valor nutricional são de origem animal, no entanto a soja, um alimento de origem vegetal, apresenta proteína com considerável valor nutricional (SARWAR, 1989).

Os dados obtidos experimentalmente da umidade, apresentado na Tabela 1, mostra um alto valor, indicando 51,64%, sendo este obtido de parte da amostra (1 g) da matéria úmida. No entanto, não se obteve um valor próximo ao de Tavares e Kiyon, (2002), que detecta em 9,3% de umidade na farinha do tempeh.

O teor de lipídeos na soja fermentada encontramos o valor de 1,57% de tempeh. Comparado com outros cereais e grãos, a soja contém uma maior quantidade de gordura. Em cada 100 g do grão de soja, encontra-se 17,7 g (PAULETTO e FOGAÇA, 2012).

Segundo Paris, (2008) o valor de cinzas na soja integral apresenta um valor de 4,9 %. No tempeh produzido encontrou-se o índice de 0,06 %, de cinzas (Tabela 1). Observando que não há alterações significativas, na soja, quando a mesma é fermentada.

Observou-se que o teor de carboidratos, 17,73 %, do tempeh, obtido através da subtração de 100 a soma dos demais componentes, apresentou um valor alto, próximo ao que fala Tavares e Kiyon, (2002) em seu trabalho, obtendo neste um valor de 22,5 %.

5.2.4 Determinações analíticas e enzimática

A Tabela 2 apresenta os resultados de pH, Atividade de água (Aw), e Atividade proteolítica (U/g), da melhor condição encontrada.

Tabela 2 - pH, Atividade de água (Aw), Umidade e atividade proteolítica (U/g) do Tempeh de que mais se enquadrou nas perspectivas esperadas.

Amostra	pH	Aw	Atividade proteolítica (U/g)
Tempeh – Condição7	6,84 ± 0,17	0,9854 ± 0,003	50,4 ± 0,034

Fonte: BRITO (2013).

O valor de pH determinado foi de 6,84, próximo à neutralidade, revela o aumento significativo de pH 5, antes do micro-organismo ser inoculado, a pH 7, devido à libertação de amoníaco no produto final, afirma Sparringa e Owens, (1999).

Apesar de possuírem definições distintas, o teor de atividade de água se relaciona com o teor de umidade. Do ponto de vista microbiológico, a atividade de água (Aw) é um parâmetro crucial, definido como sendo a água disponível ou acessível ao micro-organismo (SOUSA, 2009). Obteve-se no produto fermentado uma atividade de água de 0,9854 Aw.

Durante a fermentação do tempeh, o substrato é degradado por enzimas produzidas pelo *R. oligosporus*, tais como (poligalacturonasecarbohidratases, endocelulase, xilanase, arabinanase, lipases, proteases e fitases (NOUT e ROMBOUTS, 1990). Neste estudo determinou-se a atividade de protease que resultou na classificação do tempeh com altos níveis de atividade enzimática. Os resultados de atividade de protease aqui apresentados são real incrementos de atividade de proteases durante a FSS.

WANG et al., (1974), utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 e o substrato de soja produziu 25 U/g de substrato, enquanto neste trabalho foi produzido 50,4U/g com mesmo substrato e com *Rhizopus oligosporus* NRRL 1526.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível avaliar diferentes formulações para obtenção do tempeh;

- No estudo de variação de concentração de inóculo foi possível obter a melhor concentração para produção do tempeh, que foi de 4mL/100 g de substrato.
- No estudo da variação de tempo de fermentação foi possível observar que o melhor tempo de fermentação foi de 24 horas;
- Diante dos resultados conseguiu-se chegar a uma formulação com características de crescimento microbiano que se assemelha ao produto comercializado em países ocidentais;
- Concluiu-se que existe alta atividade enzimática proteolítica na fermentação da soja.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Apresentar o trabalho ao comitê de ética para que este possa ser aprovado para análises sensoriais;
- Realizar análises microbiológicas,
- Realizar análises sensoriais;
- Aplicação para elaboração de novos produtos como hamburgers.

8. REFERENCIAS

- ASTUTI, M., MELIALA, A., DALAIS, F.S. & WAHLQVIST, M.L. Tempeh, a nutritious and healthy food from Indonesia. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Indonesia, v 9, p.322-325. 2000.
- AZEKE, M. A.; FRETZDORFF, Barbara; PFAUE, Han B.; b, BETSCHE, T. Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yam bean (*Sphenosty lisstenocarpa L.*) seeds. **Food Chemistry**, v. 103 p. 1421–1422, 2007.
- BABU, P. D.; BHAKYARAJ, R. e VIDHYALAKSHMI, R.A Low Cost Nutritious Food “Tempeh”- A Review. **World Journal of Dairy & Food Sciences**.V.4, ano 1, p. 22-27, 2009.
- BANERJEE, R., MUKHERJEE, G., PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 949–953, 2005.
- BARRETO, C. A. Os impactos socioambientais do cultivo de soja no Brasil, II Encontro da ANPPA. **Associação Nacional de Pesquisas em Agricultura Sustentável**. Indaiatuba/SP, 26 a 29 de maio 2003.
- BAVIA, A.C. F.; SILVA, F. M. P.; LEITE, R. S.; MANDARINO, J. M. G.; PANIZZI, M. C. C. Composição química de tempeh de cultivares de soja especialmente desenvolvidas para o consumo humano, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 613-620, 2012.
- BEHRENS, Jorge H.; SILVA, Maria A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, ano 3, p. 431, 2004.
- BERNO, L. I.; LOPES, T. G. G.; BRAZACA, S. G. C. Avaliação da composição centesimal , digestibilidade e atividade inibitória de trepsina em produtos derivados de soja. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara v.18, n.3, p. 277, 2007.
- BLAKEMAN, J.P., MCCRACHEN, A.R. & SEABY, D.A. Changes brought about in solid substrates after fermentation of mixtures of cereals and pulses with *Rhizopus oryzae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.v.45, p.115-118.1998.
- CANTO, W. L.; TURATTI, J. M. Produção e mercado de produtos intermediários protéicos de soja no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Cutitiba, p. 112, 1989.
- CARVALHO, G. B. M.; CÂNDIDO, E. J.; SILVA J. B. A. **Inibidores do processo fermentativo obtidos da fração hemicelulósica das aparas de eucalipto através de hidrólise ácida**. ICTR – Instituto de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável. p.4120, 2004
- CHIARELLO, M. A soja e os alimentos funcionais: oportunidades de parcerias em P&D para os setores público e privado. **Revista Parcerias Estratégicas**, Brasília, p. 47-48, N. 15, 2002.

COUTO, S. R.; SANROMAN, A. Application of solid-state fermentation to food industry. **Journal of Food Engineering**.v.76, p. 292.2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojapr/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 3 jan 2013.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., VIEIRA, D.C. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *C. Guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, n.3, p.171-179, 1995.

FENG, X. **Cursos seqüenciais:** Microbial dynamics during barley tempeh fermentation. Tese (Doutorado em Ciências Agrícolas) -Universidade Sueca de Ciências Agrícolas, Uppsala, 2006.

FERREIRA, M. P.; OLIVEIRA M. C. N.; MANDARINO J. M. G.; SILVA, J. B.; IDA, E. I.; PANIZZI M. C. C. Changes in theisoflavone profile and in thechemical composition of tempeh during proces singand refrigeration, **Pesquisa agropecuaria brasileira**, Brasília, v.46, n.11, p.1556, nov. 2011.

FREITAS, M. C. M. A Cultura da soja no Brasil: O crescimento da população brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agricula. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, vol.7, N.12, p.7. 2011.

GUERARD. F.; GUIMAS.L.; BINET. A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journalof Molecular Catalysis B: Enzymatic**; v.19, n. 20, p. 489–98, 2002.

GUIMARÃES, M. L. **Cursos seqüenciais:** Os riscos microbiológicos e nutricionais da cozinha vegetariana. Dissertação (Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar)- Escola superior de Hotelaria e Turismo do Estoril, Estoril, 2011.

HACHMEISTER, K.A. & FUNG, D.Y.C. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal-grains. **Critical Reviews in Microbiology**.V. 19, p.137-188, 1993.

HERMANA, M.M.; KARYADI, D. Composition and nutritional value of tempeh: its role in t he improvement of the nutritional value of food. In: AGRANOFF, J. (Ed.). **The complete handbook of tempeh: the unique fermented soy food of Indonesia**. 2.ed. Singapore: American Soybean Association Southeast Asia Regional Office, p.27-32, 2001.

HIRAOKA, N.K. **A importância do uso da soja na alimentação**. Produção Didático-Pedagógica. Assis Chateaubriand, 40f, 2008.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.717-725, 2000.

LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; GHILDYAL, N.P. ; RAMAKRISHNA, M. ; KRISHNAIAH,

M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation System. **Process Biotechnology**. v. 27, p. 259-273,1992.

LOTUS. Alimentação Saudável. Sabor e saúde com tempeh. **Jornal Lotus**. Disponível em: <http://www.jornalotusbemestar.com.br/jornal/alimentacao-saudavel/sabor-e-saude-com-tempeh>. Acesso em: 14 dez. 2012.

MATUSCHEK, E., TOWO, E. & SVANBERG, U. Oxidation of polyphenols in phytate-reduced, high-tannin cereals: Effect on different phenolic groups and on *in vitro* accessible iron. **Journal of Agricultura land Food Chemistry**.V. 49, p. 5630-5638. 2001.

MENDES, F. Q.; OLIVEIRA, M G. A.; COSTA, N. M. B.; PIRES, C. V.; HOFFMAM, Z B. Qualidade protéica de diversos alimentos, incluindo diferentes variedades de soja. **Alimentos e Nutrição**.Araraquara, v.20, n.1, p. 77, 2009.

MUGULA, J.K. Evaluation of the nutritive value of maize-soybean tempe as a potential weaning food in Tanzania. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**.V. 43, p.113-119. 1992.

NOUT; M.J.R. & KIERS; J.L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. **Journal of Applied Microbiology** v.98, p.789-805, 2005.

NOUT, M.J.R. e ROMBOUTS, F.M. Recent developments in tempe research. **Journal of Applied Bacteriology**v.69, p.609-633. 1990.

PANDEY, A. Solid state fermentation, Solid state fermentation.**Wiley Eastern Limited**, New Delhi, 3-10p., 1994.

PANEY, A.Recent process developments in solid-state fermentation. **ProcessBiochemistry**. 27. ed. New Delhi, p. 109–117, 1992.

PAULETTO, F.B.e FOGAÇA, a. O. Avaliação da composição centesimal de Tofu e okara. **Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 85-95, 2012.

PEREIRA F.N. **Dieta Vegetariana**.Disponivel em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAewh0AG/dieta-vegetariana>>. Acesso em : 14 dez. 2012.

PARIS, L. D. **Cursos sequenciais:** Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. 8f. Dissertação: (Pós graduação em Engenharia Química)- Universidade Ustadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

RODRÍGUEZ-BÜRGER, A.P., MASON, A. & NIELSEN, S.S. Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1998.

ROMÁN, L. D.; CASTAÑO, A.O. Dietas vegetarianas; repercusión sobre lasalud. **Revista Clinica Espanhola**, v. 207, ano 3, p142, 2007.

ROSA, A. M.; CLAVISO, J.; PASSOS L. M. L. e AGUIAR, C. L. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycinemax* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 455, 2009.

RUSMINI, S. e KO, S.D. Rice-Grown *Rhizopus oligosporus* Inoculum for Tempeh Fermentation. **American Society for Microbiology**. v. 28, n.3, p.348 1974

SANDBERG, A.S. e SVANBERG, U. Phytate hydrolysis by phytase in cereals - effects on invitro estimation of iron availability. **Journal of Food Science**. V.56, p. 1330-1333. 1991.

SANTOS, D. T.; SARROUH B. F.; SANTOS J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S.; Potencialidade e Aplicações da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia. Lorena, **janus**, lorena, ano 3, N 4, 2006.

SANTOS, L.; Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidade *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 06, p. 655-664, 2012

SANTOS, S.F.M. **Cursos seqüenciais**: Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando penduculo de caju como substrato. 35f Dissertação: (Pós graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SARWAR, G. Digestibility and amino and acids in selected foods as determined by a art balance method. **Plant Food Humanan Nutrition** ., v. 39, p. 23- 32, 1989.

SHAMBURY, M. et al. Evaluation of substrates and storage conditions for preparing and maintaining starter cultures for tempeh fermentation. **International Journal Food Microbiology** ., v. 15, p. 77-85, 1992

SHURTLEFF, W. & AOYAGI, A. **The book of tempeh**. 2 Ten Speed Press. Berkeley, California. 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA VEGETARIANA (SVB). **Guia Alimentar de dietas vegetarianas**. Departamento de medicina e nutrição sociedade vegetariana brasileira. São Paulo, 2012.

SOUSA, B. A. A. **Cursos seqüenciais**: Funcionalidade dos extratos fenolicos obtidos pelo cultivo sei-sólido de residues de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) Dissertação (Pós graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SPARRINGA, R.A. e OWENS, J.D. Inhibition of the tempemould, *Rhizopus oligosporus*, by ammonia. **The Society for Applied Microbiology**. Reading, v. 29, 1999.

STEINKRAUS, K.H., CULLEN, R.E., PEDERSON, C.S., NELLIS, L.F. & GAVITT, B.K. Indonesian tempeh and related fermentations. **In Handbook of indigenous fermented foods**. New York, p.94. 1983.

SVANBERG, U., LORRI, W. & SANDBERG, A.S. 1993. Lactic fermentation of non-tannin and high-tannin cereals - Effects on *in vitro* estimation of iron availability and phytate hydrolysis. **Journal of Food Science**. v 58, p. 408-412. 1993.

SILVA, R. R. e COELHO, G. D.; Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. **INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt**, São Paulo, p 3- 17, 2006.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2000.

TASSARA, R. B. “**Soja e Sorgo**” – Viabilidade técnica e financeira do sistema de produção, no método de plantio direto. Planaltina, 2005.

TAVARES, S. G. e KIYAN C.; Avaliação da Qualidade Nutricional da Proteína da Farinha de Tempeh, Produto Fermentado Obtido a partir da Soja. **Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada**, São Paulo, p. 25, 2002.

TOLEDO, T. C. F.; BRAZACA, S. G. C.; ARTHUR, V.; PIEDADE, S. M. S.; Composição, digestibilidade protéica e desaminação em cultivares brasileiras de soja submetidas à radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(4): p.813, 2007.

VIEIRA, T. M. F. S. Estrutura, Funcionalidade e Aplicações de Proteínas de Soja. **Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição**, Piracicaba, p. 1, 2007.

ANEXO

ANEXO A - Composição dos meios de cultura

1. Ágar Batata Dextrose (HiMedia)]Tabela 7.1 – Ingredientes do meio Ágar Batata Dextrose

Ingredientes g/L	
Infusão de batatas	200,00
Dextrose	20,00
Ágar	15,00

pH final (a 25°C): 5,6 ± 0,2