



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOÍAS (UFG)
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

ALINE OLIVEIRA COLOMBO

**Utilização do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na
elaboração de *tempeh***

GOIÂNIA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

ALINE OLIVEIRA COLOMBO

3. Título do trabalho

UTILIZAÇÃO DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) NA ELABORAÇÃO DO TEMPEH

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **ALINE OLIVEIRA COLOMBO**, Usuário Externo, em 08/07/2024, às 19:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Zaczuk Bassinello, Usuário Externo**, em 08/07/2024, às 19:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4654858** e o código CRC **2129D0FC**.

ALINE OLIVEIRA COLOMBO

**Utilização do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na
elaboração de *tempeh***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Prof^a Dr^a Priscila Zaczuk Bassinello

Co-Orientador: Prof. Dr. Franciello Vendruscolo

GOIÂNIA

2017

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

Oliveira Colombo, Aline
UTILIZAÇÃO DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) NA
ELABORAÇÃO DE TEMPEH [manuscrito] / Aline Oliveira Colombo. -
2017.
CXXII, 122 f.

Orientador: Profa. Dra. Priscila Zaczuk Bassinello; co-orientadora
Dra. Francieli Vendruscolo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2017.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

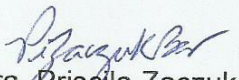
1. feijão envelhecido. 2. *Rhizopus oligosporus*. 3. compostos
bioativos. 4. análise sensorial. 5. microbiologia. I. Zaczuk Bassinello,
Priscila, orient. II. Título.

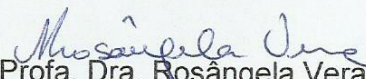
CDU 664

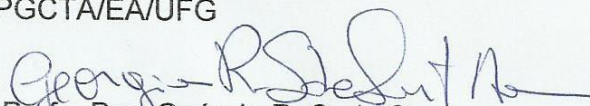


UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ALINE OLIVEIRA COLOMBO. Aos trinta dias do mês de agosto de 2017 (30/08/2017), às 08h30min, reuniram os componentes da Banca Examinadora: Profa. Dra. Priscila Zaczuk Bassinello – Orientadora – PPGCTA/EA/UFG, a Profa. Dra. Rosângela Vera – EA/UFG, e a Profa. Dra. Geórgia Ribeiro Silveira de Santana – JARDIM BOTÂNICO – Goiânia, para sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada na Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia-GO), proceder a avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Utilização do Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na elaboração de tempeh”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, de autoria de **ALINE OLIVEIRA COLOMBO**, discente do Programa de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Profa. Dra. Priscila Zaczuk Bassinello, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a autora da dissertação, que, em trinta minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca fez arguição da examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa, tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1403/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a dissertação foi **Aprovada** e, para fins de expedição do diploma de **MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, na área de concentração em **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS** pela Universidade Federal de Goiás, a candidata deverá proceder à entrega da versão final corrigida, nos termos do artigo 42 da resolução do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11h40min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação, e para constar, lavrou-se a presente Ata, que, depois de lida e aprovada, é assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.


Profa. Dra. Priscila Zaczuk Bassinello
Presidente – PPGCTA/EA/UFG


Profa. Dra. Rosângela Vera
Membro – EA/UFG


Profa. Dra. Geórgia R. S. de Santana
Membro – Jardim Botânico-Goiânia

DEDICATÓRIA

À Deus que me deu forças e sabedoria para a realização deste trabalho.
À minha família, amigos e professores, pelo apoio e incentivo.
Ao meu amor, Adriano Rezende, que sempre esteve ao meu lado me dando forças e
minha filha Maria Eduarda pela compreensão da minha ausência.
Dedico!

AGRADECIMENTOS

Muitos me ajudaram, de alguma forma ou outra, na elaboração e realização desse trabalho. A todos, desde já, meu “muito obrigada”. Mas, sem dúvida, há aqueles que precisam ser citados:

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de estudar, pela sabedoria e pela força para chegar até aqui.

À minha família, que esteve sempre ao meu lado me dando todo apoio necessário no decorrer de todo o mestrado.

Ao meu grande amor, Adriano Rezende, pelo amor, amizade, companheirismo, por ter me apoiado, por ter me encorajado, me dado força, incentivo, por não me deixar desistir, pela paciência com meu stress, choro, por acreditar em mim e por ter dividido este sonho comigo.

À minha filha, o perdão pela falta que fiz, pelas ausências no cotidiano, pela falta de escutar, pelo conselho não dado.

À professora Dr^a. Priscila Zaczuk Bassinello, minha orientadora. Obrigada pela orientação, incentivo, confiança, apoio, paciência, carinho e todos os conhecimentos transmitidos. Sempre disponível, foi além de suas atribuições. Foi inspiração.

Agradeço por ter despertado em mim, a certeza de ser capaz. Pelos conselhos, advertências, conversas profissionais e ao mesmo tempo tão carinhosas em todas as horas. Saiba que este trabalho só foi realizado porque você confiou em mim, me pegou pela mão e me deu a oportunidade.

Aos professores Dr. Manoel Soares e Dr. Márcio Caliari, coordenadores do curso, pelos ensinamentos repassados, pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Aos membros da banca examinadora da qualificação, Dr^a Georgia e Dr^a Rosângela pela disposição em fazer as correções em tempo hábil e pelas valiosas sugestões para melhoria deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que contribuíram para a minha formação.

À EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO pela oportunidade de utilização dos laboratórios e das dependências, tecnologia, colaboradores e todo o suporte que foi oferecido.

À estagiária Rayane Vital, que colaborou com todas as análises físico-químicas, além do companheirismo de laboratório, também pelas apresentações parciais de resultados.

TOTALE VEGAN, representada pela Nereida Cortopassi, empresa parceira no estudo, agradeço todas as informações, experiências e dicas compartilhadas. Além de todo material doado, a oportunidade de ter construído essa amizade.

Ao SENAI (SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL) ROBERTO MANGE, especialmente ao Antônio José de Barcelo e Aroldo dos Reis Nogue que entenderam a necessidade do aperfeiçoamento profissional e concederam licença especial de afastamento para os estudos.

À FAMA (FACULDADE METROPOLITANA DE ANÁPOLIS), que disponibilizou os laboratórios, materiais e equipamentos para as análises.

Ao meu querido amigo e colega de mestrado Ítalo Careli Gondim, que comigo passou por esses dois anos, meu parceiro nos seminários, nos estudos, trabalhos e no laboratório LABDARSA, obrigada por tudo.

À professora Maria Raquel Hidalgo por disponibilizar o Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos, da Faculdade de Nutrição, para a realização das análises microbiológicas.

À Camilla Alves Rodrigues, técnica do Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos, pelo auxílio, explicações e disponibilidade nas análises.

À Universidade Federal de Goiás pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro concedido pela concessão da bolsa de mestrado.

Seria impossível lembrar de todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho chegasse ao final com êxito. Caso tenha me esquecido de você, desculpe-me, mas tenha a certeza de que sou imensamente grata.

Obrigada a todos!!!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se
arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO GERAL

Alimentos saudáveis têm sido alvo da indústria no desenvolvimento de novos produtos. O *tempeh*, fermentado de soja pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, possui excelente qualidade nutricional, podendo ser produzido com feijão depreciado. Este trabalho tem o objetivo de elaborar *tempeh* de feijão carioca armazenado cv. Pérola, produzindo o inóculo, verificando a evolução da fermentação e estabelecendo o procedimento de preparo do *tempeh* que obedeça aos padrões microbiológicos. Também, determinar e relacionar as propriedades nutricionais, teor de substâncias bioativas, cor e textura instrumental e posteriormente, avaliar a aceitação e intenção de compra de hambúrguer elaborado com *tempeh* de feijão comum, comparando com o *tempeh* tradicional de soja. A cepa do *Rhizopus oligosporus* foi multiplicada e o inóculo produzido com arroz. Foram produzidos *tempehs* de feijão sem casca nas proporções 50% soja/feijão (TFS) e 100% feijão (TF) e comparados com *tempeh* comercial 100% soja (TS). Os grãos de feijão foram armazenados e utilizados apresentando-se mais escurecidos no momento do estudo. Primeiramente o *tempeh* foi confeccionado de forma tradicional e posteriormente com modificação, utilizando ácido acético (5%) e esterilização dos grãos. Realizou-se avaliação de Coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp para se determinar qual método é mais eficiente na garantia da qualidade sanitária. Na análise centesimal, foram analisados umidade, cinzas, atividade de água, pH, acidez titulável, extrato etéreo, proteína bruta, fibras, carboidratos, valor energético, minerais, vitamina B₁₂, atividade antioxidante, taninos, oligossacarídeos, cor e textura instrumentais. Na análise sensorial, os hambúrgueres foram confeccionados do mesmo modo para ambas as amostras e 82 provadores avaliaram os *tempehs* quanto à aceitação dos atributos: aparência, aroma, sabor e impressão global, utilizando-se escala hedônica de nove pontos e uma pergunta sobre intenção de compra. A concentração de células na suspensão de esporos foi de 10⁶ células/mL, sendo suficiente para fermentar os *tempehs*. O melhor resultado foi TF, devido a uniformidade do micélio e pelo tempo de fermentação (24 horas), aproximado ao tempo de fermentação do *tempeh* tradicional de soja (20hs). Na pesquisa microbiológica o método modificado, não houve contaminação, diferentemente do método tradicional. Nos resultados centesimais, entre TF e TS houve diferença significativa para lipídios (1.555%), proteínas (260%) e carboidratos (521%). O conteúdo de fibras totais de TF é 34% menor que TS. O molibdênio ultrapassa a recomendação diária, TS possui maior concentração de minerais, seguido pelo TFS e TF. A capacidade antioxidante do TF (14,77%) e TS (11,28%) no método DPPH, no método ABTS, TF (31,62%) e TS (48,89%) apresentando as amostras capacidade antioxidante relevante. Para o teor de vitamina B₁₂, TF (0,38 µg/100 g) e TS (0,42 µg/100 g), apresentam-se baixo, já que na literatura são citados valores maiores, perda provável durante o tratamento térmico do *tempeh*. Não houve diferença significativa em relação à coesividade, mastigabilidade e resistência das amostras. O brilho do TS é 1543% maior que TF, provavelmente devido ao maior teor de gordura presente na soja. Já a* do TS possui tonalidade mais aproximada ao verde que TF e o TF apresentou valor de b* maior que TS. Já na avaliação sensorial os hambúrgueres apresentaram formato firme, consistente e um tom marrom com característica crocante. O TS obteve nota maior que TF, apresentando melhor desempenho em todos os atributos. Pode-se afirmar que o feijão carioca comum cv. Pérola pode ser utilizado como matéria-prima para o *tempeh*, tendo propriedades nutricionais interessantes e sendo alternativa para o aproveitamento de grãos de baixo valor comercial.

Palavras-chave: feijão envelhecido; *Rhizopus oligosporus*, contaminação microbiológica análise centesimal, bioativos, análise sensorial.

GENERAL ABSTRACT

Healthy foods have been targeted by the industry in developing new products. Tempeh, fermented soybean by the fungus *Rhizopus oligosporus* and has excellent nutritional quality, can be produced with depreciated beans. This work has the objective of elaborating tempeh of carioca beans stored cv. Pérola, producing the inoculum, verifying the evolution of the fermentation and establishing the preparation procedure of tempeh that obey the microbiological standards. Also, determine and relate nutritional properties, bioactive substance content, color and instrumental texture and later, evaluate the acceptance and intention to buy hamburger prepared with common bean tempeh, comparing with traditional soybean tempeh. The *Rhizopus oligosporus* strain was multiplied and the inoculum produced with rice. 50% soybean / bean (TFS) and 100% bean (TF) were produced and compared to commercial soybean (TS) tempehs. The bean grains were stored and used presenting darker at the time of study. First the tempeh was made in a traditional way and later with modification, using acetic acid (5%) and sterilization of the grains. Coliforms at 45 ° C, *Staphylococcus coagulase* positive and *Salmonella* sp were evaluated to determine which method is most efficient in sanitary quality assurance. In the centesimal analysis, moisture, ash, water activity, pH, titratable acidity, ethereal extract, crude protein, fibers, carbohydrates, energy, minerals, vitamin B12, antioxidant activity, tannins, oligosaccharides, color and textures were analyzed. In the sensory analysis, the burgers were similarly made for both samples and 82 tasters evaluated the tempehs regarding the acceptance of the attributes: appearance, aroma, flavor and overall impression, using a nine-point hedonic scale and a question about intention of purchase. The concentration of cells in the spore suspension was 106 cells / mL, being sufficient to ferment the tempehs. The best result was TF due to mycelial uniformity and the fermentation time (24 hours), approximate to the fermentation time of the traditional soybean tempeh (20hs). In the microbiological research the modified method, there was no contamination, unlike the traditional method. In the centesimal results, between TF and TS there was a significant difference for lipids (1,555%), proteins (260%) and carbohydrates (521%). The total fiber content of TF is 34% smaller than TS. Molybdenum exceeds the daily recommendation, TS has higher concentration of minerals, followed by TFS and TF. The antioxyd ability of TF (14.77%) and TS (11.28%) in the DPPH method, in the ABTS, TF (31.62%) and TS (48.89%) method presented the relevant antioxidant capacity samples. For the vitamin B12 content, TF (0.38 µg / 100 g) and TS (0.42 µg / 100 g) were low, as the literature values showed higher values, a probable loss during the heat treatment Of tempeh. There was no significant difference in relation to the cohesiveness, chewing and resistance of the samples. The brightness of TS is 1543% greater than TF, probably due to the higher fat content in soybean. Already the * of the TS has a shade closer to the green than TF and the TF has a value of b * greater than TS. In the sensorial evaluation, the hamburgers presented a firm, consistent shape and a brown tone with a crispy characteristic. TS had a higher score than TF, presenting better performance in all attributes. One can consider the common bean cv. Pearl can be used as raw material for tempeh, having interesting nutritional properties and being an alternative for the use of grains of low commercial value.

Keywords: aged beans; *Rhizopus oligosporus*, microbiological contamination centesimal analysis, bioactive, sensory analysis.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	Contagem de células por mL	49
Equação 2.	Cálculo de carboidratos	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Alguns métodos tradicionais de preparação comercial de <i>tempeh</i> a partir de soja	70
------------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação estrutural da rafinose, estaquiose e verbascose	24
Figura 2.	Cards de propagandas de <i>tempeh</i>	26
Figura 3.	Fluxograma: Produção do <i>tempeh</i> de soja	27
Figura 4.	Esquema da contribuição de enzimas no processo de endurecimento de leguminosas	31
Figura 5.	Imagem do <i>Rhizopus oligosporus</i> no microscópio	33
Figura 6.	Fluxograma: Etapas do experimento	36
Figura 7.	Suspensão de fungos	48
Figura 8.	Etapas do preparo do inóculo e contagem	48
Figura 9.	Placas de Petri com diferentes meios de cultura. (A) PDA e farinha de feijão; (B) PDA e farinha de arroz; (C) PDA, farinha de feijão e farinha de arroz e (D) PDA	49
Figura 10.	Curvas de absorção de água dos grãos de feijão à temperatura ambiente.	51
Figura 11.	Curvas de absorção de água dos grãos de soja à temperatura ambiente.	52
Figura 12.	Desenvolvimento do <i>Rhizopus oligosporus</i> , em diferentes tempos e meios de cultura. A- 0 h; B- 08 hs; C- 16 hs; D- 24 hs; E- 32 hs e F- 40 hs. 1- Feijão; 2- Arroz; 3- Arroz e Feijão e 4- PDA	53
Figura 13.	Desenvolvimento do <i>Rhizopus oligosporus</i> em meio PDA e Arroz (A) e somente meio PDA (B)	53
Figura 14.	Fermentação inicial e final dos <i>tempehs</i> . Inicial: A- <i>Tempeh</i> de feijão e soja e B- <i>Tempeh</i> de feijão. Final: C- <i>Tempeh</i> de feijão e soja e D- <i>Tempeh</i> de feijão.	55
Figura 15.	Fluxograma: Etapas da fabricação tradicional do <i>tempeh</i>	64
Figura 16.	Fluxograma: Etapas da fabricação modificada do <i>tempeh</i> de soja ou feijão	65

Figura 17.	Fluxograma: Etapas da fabricação do <i>tempeh</i> de feijão	96
Figura 18.	Hambúrguer de <i>tempeh</i> de feijão	99
Figura 19.	Avaliação sensorial quanto à aparência dos hambúrgueres de <i>tempeh</i>	100
Figura 20.	Avaliação sensorial quanto ao aroma dos hambúrgueres de <i>tempeh</i>	101
Figura 21.	Avaliação sensorial quanto ao sabor dos hambúrgueres de <i>tempeh</i>	102
Figura 22.	Avaliação sensorial quanto à impressão global dos hambúrgueres de <i>tempeh</i>	103
Figura 23.	Avaliação sensorial quanto intenção de compra dos hambúrgueres de <i>tempeh</i>	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Compostos funcionais, suas ações e alimentos encontrados	20
Tabela 2.	Composição nutricional do <i>tempeh</i> , em 100 g de produto comestível	25
Tabela 3.	Diferentes tipos de <i>tempeh</i> e respectivas matérias-primas	27
Tabela 4.	Produção mundial de soja em milhões de toneladas por ano/país.	29
Tabela 5.	Produção por região de feijão, área e produção em milhões de toneladas por ano.	30
Tabela 6.	Padrão microbiológico para <i>tempeh</i>	66
Tabela 7.	Resultados das análises microbiológicas de <i>tempeh</i> produzidos pelo método tradicional	69
Tabela 8.	Resultados das análises microbiológicas de <i>tempeh</i> produzidos pelo método modificado	69
Tabela 9.	Determinação de Umidade (%) antes liofilização, Umidade (%) após liofilização, atividade de água antes liofilização, atividade de água após liofilização, determinação do pH e acidez titulável.	79
Tabela 10.	Determinação de Resíduo por Incineração (Cinzas), Determinação de Extrato Etéreo, Proteína Bruta Total, Carboidratos e Valor calórico.	80
Tabela 11.	Determinação de Fibras Alimentares	81
Tabela 12.	Determinação Mineral e Recomendação Diária para Adulto	82
Tabela 13.	Atividade antioxidante dos <i>tempehs</i>	85
Tabela 14.	Determinação de textura em N (Newtons)	87
Tabela 15.	Determinação de cor *L, *a e *b	87
Tabela 16.	Ingredientes dos hambúrgueres	97
Tabela 17.	Resultados e padrão microbiológico para <i>tempeh</i>	99
Tabela 18.	Pontuação geral da análise sensorial de hambúrgueres de <i>tempeh</i> de feijão e de soja	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2	CAPÍTULO 1- REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Alimentos Fermentados.....	18
2.1.1	História.....	18
2.1.2	Tipos de Fermentação.....	18
2.1.3	Fermentação Sólida.....	19
2.2	Substâncias Bioativas.....	20
2.2.1	Propriedades Funcionais dos Alimentos Fermentados.....	21
2.2.2	Atividade antioxidante.....	21
2.2.3	Vitamina B ₁₂	23
2.2.4	Oligossacarídeos.....	23
2.3	<i>Tempeh</i>	24
2.3.1	Definição e Histórico.....	26
2.3.2	Diversidades do <i>Tempeh</i>	26
2.3.3	Produção e Consumo.....	27
2.4	Matérias-Primas.....	28
2.4.1	<i>Hard – to – cook</i>	31
2.5	Microbiota do <i>Tempeh</i>	32
2.5.1	<i>Rhizopus oligosporus</i>	32
2.6	Objetivos.....	35
2.6.1	Objetivo Geral.....	35
2.6.2	Objetivos Específicos.....	35
	CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE INÓCULO DE <i>Rhizopus oligosporus</i> PARA PRODUÇÃO DE <i>TEMPEH</i> DE FEIJÃO CARIOCA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) E <i>TEMPEH</i> DE FEIJÃO CARIOCA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) COM SOJA AMARELA (<i>Glycine max</i> L).....	44
1	INTRODUÇÃO.....	46
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1	Curva de absorção de água.....	47
2.2	Multiplicação do <i>Rhizopus oligosporus</i>	47
2.3	Contagem de esporos.....	49
2.4	Preparação do inóculo.....	49
2.5	Produção do <i>tempeh</i>	49
2.6	Análise Estatística.....	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4	CONCLUSÃO.....	56
	CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO MICROBIOLOGICAMENTE SEGURA DE <i>TEMPEH</i> DE FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	60

1	INTRODUÇÃO.....	62
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1	Método Tradicional.....	63
2.2	Método Modificado.....	64
2.3	Análises Microbiológicas.....	65
2.3.1	Contagem de Coliformes Totais.....	66
2.3.2	Contagem de Coliformes de Origem Fecal.....	66
2.3.3	Estafilococcus Coagulase Positiva.....	67
2.3.4	Salmonella sp.....	67
3	RESULTADOS E DISCUSSAO.....	67
4	CONCLUSÃO.....	70
	CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE TEMPEHS DE FEIJÃO CARIOCA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) E TEMPEH DE SOJA AMARELA (<i>Glycine max</i> L)	73
1	INTRODUÇÃO	75
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1	Métodos da Análise Centesimal	76
2.2	Análise Estatística.....	78
3	RESULTADOS E DISCUSSAO	79
4	CONCLUSÃO	88
	CAPÍTULO 5- AVALIAÇÃO SENSORIAL DE TEMPEHS DE SOJA (<i>Glycine max</i> L.) E FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	92
1	INTRODUÇÃO.....	94
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1	Fabricação dos <i>tempehs</i>	95
2.2	Confecção dos hambúrgueres.....	96
2.3	Análise Microbiológica.....	97
2.4	Análise sensorial.....	97
2.5	Análise estatística.....	98
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
4	CONCLUSÃO.....	105
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

Alimentos saudáveis e diversificados tem sido o principal alvo da indústria alimentícia no desenvolvimento de novos produtos. A globalização dos sabores, aliada à curiosidade por novos tipos e disponibilidade de alimentos, além dos hábitos de consumo, torna atrativo o desenvolvimento de produtos funcionais, mais saudáveis e saborosos, entre os quais, os alimentos fermentados (CRUZ, 2014).

A fermentação é uma importante forma de preservação dos alimentos e, além de acrescentar variabilidade, vem ganhando visibilidade por promover longevidade e aumento do valor nutricional. Seguindo essa tendência, uma alternativa para os consumidores é o *tempeh*. Alimento originário da ilha de Java, na Indonésia e tradicionalmente produzido pela via da fermentação da soja pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, normalmente é consumido frito, cozido ou assado. É um produto atrativo pelo sabor, textura e propriedades nutricionais e consumido como um substituto da carne devido sua riqueza protéica (CAMPOS-VEGA, 2013).

Além de ser excelente fonte protéica e de cálcio, o *tempeh* tem um baixo teor de sódio e gordura saturada e um elevado teor de ácidos graxos essenciais, vitaminas do complexo B, nomeadamente vitamina B₁₂ e fibra alimentar solúvel (BABU et al., 2009). Possui substâncias bioativas, alto teor de ácido fólico, atividade antioxidante e vitamina B₁₂, reduz os fatores antinutricionais aumentando a digestibilidade das leguminosas. O *tempeh* pode ser produzido por outros substratos, porém não é comum, no entanto, há um interesse no *tempeh* alternativo variando os substratos, como ervilhas, feijão, milho, arroz, lentilha e cevada. O Brasil, sendo um importante produtor e detentor de tecnologias para produção de feijão, torna-se um campo propício para o incentivo às pesquisas utilizando essa matéria-prima (KRISNAWATI, 2015).

Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa consumida mundialmente, considerada fonte de proteína, carboidratos, fibras alimentares, vitaminas e minerais. Feijões comuns são ricos em muitos fitoquímicos, tais como os compostos polifenólicos, fibras, lectinas e inibidores de tripsina. Apresentam atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos em grãos pode ser aumentada durante o processo de fermentação, além de estar associado à redução do risco de doenças crônicas (LIMÓN, 2015; TOLEDO, 2008).

O gênero *Phaseolus* compreende todas as espécies conhecidas como feijão, sendo *Phaseolus vulgaris* L. a mais conhecida e a que possui inúmeras variedades tais como, Carioca, Roxo, Mulatinho, Preto, Rosinha entre outras (PIRES et al., 2005). Embora exista preferência regional por determinado tipo de grãos, feijões do grupo carioca são os mais

cultivados no Brasil, representando 70% do consumo nacional e a cultivar Pérola sendo a mais consumida atualmente (EMBRAPA, 2010; VANIER, 2012). Percebe-se também um crescente potencial de mercado interno e externo para os tipos especiais de feijões, que possuem características diferenciadas de cor, forma e tamanho, atraindo a gastronomia *gourmet* e que poderão, também, ser aproveitados em diferentes preparações culinárias e na indústria de alimentos, que não apenas na forma de grãos cozidos.

A 68ª Assembléia Geral das Nações Unidas declarou 2016 o Ano Internacional dos “Pulses”¹, visando aumentar a consciência pública para os benefícios nutricionais, produção sustentável, segurança alimentar e nutrição, criando oportunidade para incentivar a melhor utilização de proteínas vegetais, rotações de culturas e o comércio de “pulses” (FAO, 2013). Nesse contexto, há países da África e Ásia, como Indonésia e Índia, em que o *tempeh*, em função de suas propriedades nutricionais e sensoriais e versatilidade no preparo na forma pura ou como ingrediente de uma série de outras preparações alimentares (hambúrgueres – “carne vegetal”, produtos vegetarianos, farinha de *tempeh* liofilizado ou torrado para biscoitos), vem sendo estimulado em políticas públicas, como alternativa nas multimisturas para combater a desnutrição de populações carentes, especialmente em mães e crianças em fase de desmame (SCRIMSHAW; WALLERSTEIN, 2012). 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.

O presente trabalho tem o objetivo de desenvolver, por meio de fermentação sólida, *tempeh* a partir de feijão carioca sem casca e comparar suas propriedades nutricionais, funcionais, tecnológicas e sensoriais com o *tempeh* tradicional de soja. Espera-se, desse modo, contribuir com o avanço do conhecimento científico em relação ao processo pioneiro no país de fabricação de *tempeh* à base de feijão carioca e suas propriedades nutricionais, funcionais e tecnológicas, como uma alternativa ao consumidor que busca no alimento, além

¹Segundo o *Codex Alimentarius*, “pulses” são sementes secas de plantas leguminosas que se distinguem das sementes oleaginosas de vagem por seu baixo teor de gordura, como exemplos: feijões (*Phaseolus* spp), lentilhas (*Lensculinaris* Medic. Syn. *Lensesculenta* Moench), ervilhas (*Pisumsativum* L.), grão de bico (*Cicerarietinum* L.), feijões (*Vicia faba* L.), ervilhas (*Vigna unguiculata* L.) Walp, syn. *Vigna sesquipedalis* Frühe., *Vigna sinensis* (L.) Saviexd Hassk.

da nutrição e prazer sensorial, alguns benefícios à saúde e fonte protéica de baixo custo, oportunizando a ampliação de mercado e acesso ao alimento. Além disso, espera-se cada vez mais fortalecer a cadeia produtiva do feijoeiro e aproximar os principais elos envolvidos na produção (produtores de grãos, pequena indústria e consumidor).

2 CAPÍTULO 1- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentos Fermentados

A produção de alimentos fermentados é uma das tecnologias de conservação de alimentos mais antigas conhecidas pelo homem. Desde o início da civilização, as matérias-primas eram fermentadas e resultavam em produtos como queijo, iogurte, embutidos, bebidas alcoólicas, molho de soja, chucrute e conservas. Os conhecimentos eram transmitidos de geração em geração nas comunidades locais, mosteiros e propriedades feudais (CAPLICE, 1999).

De acordo com Tamang (2010), os alimentos e bebidas fermentadas são componentes indispensáveis da cultura alimentar mundial. Cada produto fermentado é único e distinto, devido à localização geográfica, fatores ambientais, preferência alimentar e da disponibilidade de fontes vegetais ou animais. Cerca de 5000 variedades de alimentos fermentados são produzidas por diferentes etnias e comunidades em todo o mundo. Entre 50 e 400 g *per capita* de alimentos e bebidas fermentadas são consumidos diariamente em todo o mundo, representando de 5% a 40% da ingestão diária total de alimentos. O processo de fermentação é importante, pois proporciona diversas vantagens, como: enriquecimento do valor nutricional dos produtos; diversificação do sabor e textura; preservação dos alimentos; proporcionar o consumo de aminoácidos essenciais, compostos bioativos, propriedades antioxidantes e antimicrobianas, vitaminas e minerais; degradação dos compostos indesejáveis e fatores antinutricionais além de melhorar a digestibilidade.

Também altera as propriedades sensoriais dos alimentos, tornando-as agradáveis ao consumidor, levando este processo a ser utilizado para modificar estas propriedades com vista à obtenção de produtos com novas características (CRUZ, 2014).

2.1.1 Tipos de Fermentação

As fermentações podem ser classificadas de acordo com o estado físico do substrato: fermentações em estado sólido, estado líquido e em estado semissólido. As fermentações podem ainda classificar-se com base no tipo de microbiota envolvida como sendo: fermentações naturais (matérias-primas fermentadas por micro-organismos nelas presentes ou presentes no meio ambiente) e fermentações induzidas, onde são utilizadas culturas

selecionadas (fermentação de monocultura, em que só se utiliza uma só cultura de micro-organismos e fermentação multicultural, em que se utiliza uma cultura de duas ou mais micro-organismos) (TAMANG, 2010).

Segundo Steinkraus (1996), há uma classificação das fermentações também por categorias, como: fermentações alcoólicas (vinho, cerveja e cachaça); fermentações acéticas (vinagre); fermentações ácido-láticas (iogurtes, chucrute, queijos e pickles); fermentação de substitutos de proteína animal à base de proteína vegetal texturizada (*tempeh* e *ontjom*); fermentações à base de elevadas concentrações de sal (molho de soja e missô); fermentações alcalinas (*natto*); pães fermentados com leveduras e com fermento natural.

2.1.2 Fermentação Sólida

De acordo com Durand et al., (1988), a definição de fermentação sólida é:

“Processo que refere-se à cultura de micro-organismo sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida.”

Algumas características da fermentação sólida (FS) devem ser evidenciadas: necessita de fonte de carbono e de nitrogênio, para o desenvolvimento microbiano; o oxigênio deve atravessar os espaços vazios do meio; o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais; o desenvolvimento microbiano ocorre em condições próximas às dos habitats naturais e o meio apresenta alta heterogeneidade. A água apresenta-se em destaque na FS, devido sua interação com as substâncias que compõem o substrato, a água está relacionada a dois parâmetros: umidade e atividade de água, sendo que a última afeta diretamente o desenvolvimento microbiano e a síntese de metabólitos. Além da água, a temperatura, pH, inóculo e o substrato são variáveis que devem controladas durante o processo de fermentação (PINTO, 2005).

A fermentação sólida é capaz de gerar diversos produtos como: álcool etílico, ácidos orgânicos, enzimas, toxinas, antibióticos, biopesticidas, esporos, enriquecidos protéicos, além dos produtos orientais. O objetivo principal da fermentação de cereais e de sementes não é tanto a sua preservação, mas sim a alteração sensorial e nutricional, além da fermentação

resultar em vários alimentos facilmente digeríveis, nutritivos e saudáveis (CARMIGNANI, 2014).

2.2 Substâncias Bioativas

Segundo a Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002, que aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde (BRASIL, 2002), são considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Alimentos funcionais apresentam substâncias bioativas, que são além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, como exemplos: fibras, carotenóides, fitoesteróis, flavonóides, fosfolipídios, organosulfurados, polifenóis e probióticos. Na Tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de substâncias bioativas, ações e alimentos que possuem essas substâncias.

Tabela 1. Compostos funcionais, suas ações e alimentos encontrados

Composto	Ação	Alimento encontrado
Isoflavonas	Ação estrogênica (reduz sintomas da menopausa) e anti câncer	Soja e derivados
Proteínas de soja	Redução dos níveis de colesterol	Soja e derivados
Flavonóides	Atividade anti câncer, vasodilatadora, anti-inflamatória e antioxidante	Soja, frutas cítricas, tomate, pimentão, alcachofra e cereja
Fibras solúveis e Insolúveis	Reduz risco de câncer de cólon, melhora o funcionamento intestinal. As solúveis podem ajudar no controle da glicemia e no tratamento da obesidade, pois dão maior saciedade	Cereais integrais como aveia, centeio, cevada, farelo de trigo; leguminosas como soja, feijão e ervilha
Tanino	Antioxidante, antisséptico, vasoconstritor	Maçã, sorgo, manjeriço, manjerona, sálvia, uva, caju, soja
Estanóis e esteróis vegetais	Reduzem risco de doenças cardiovasculares	Extraídos de óleos vegetais como soja e de madeiras

Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015)

Ainda de acordo com a RDC nº2, a substância bioativa deve estar presente em fontes alimentares, podendo ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano, podendo ser direcionada a grupos populacionais específicos, não ter

finalidade medicamentosa ou terapêutica, seguro para o consumo humano, sem necessidade de orientação e ou acompanhamento médico.

O feijão possui alto teor de fibras, devido seu valor estar acima do mínimo recomendado (6 g de fibras/100 g em alimentos). A fibra alimentar exerce um papel no organismo que a torna alimento funcional, devido sua resistência à digestão e absorção. São importantes, pois auxiliam na proteção contra o câncer de mama, diminuição do risco de constipação intestinal, doenças coronarianas e evitam o aumento dos níveis de glicose (SOARES et al., 2008).

2.2.1 Propriedades Funcionais dos Alimentos Fermentados

Os micro-organismos do processo fermentativo são responsáveis pela mudança das propriedades sensoriais e biológicas dos alimentos, quando se comparam as matérias-primas sem processo. Devido à fermentação, há um aumento no poder de conservação dos alimentos melhorando sua segurança microbiológica. A oxidação de hidratos de carbono disponibiliza o desenvolvimento dos micro-organismos e gera como produtos finais ácidos (lático ou acético), álcool e dióxido de carbono, com ação antimicrobiana, que irão controlar o crescimento de micro-organismos patogênicos e de alteração dos alimentos (CAPLICE, 1999).

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: intolerantes à 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 (NAIA, 2015).

Durante o processo de fermentação sólida, a hidrólise enzimática dos substratos, aumenta a quantidade de aminoácidos livres, podendo ser elevada à 25%, ativa os compostos nitrogenados solúveis em água, ácidos graxos livres, diminui a quantidade de lipídios, sendo um importante e significativo processo tecnológico de leguminosas (JHAN, 2015).

2.2.2 Atividade antioxidante

De acordo com Zago (2014), o interesse por antioxidantes vem crescendo devido às descobertas sobre o efeito dos radicais sobre o organismo. A oxidação é natural na vida aeróbica e, radicais são produzidos espontaneamente e/ou por alguma disfunção biológica, bem como por fatores ambientais (poluição do ar, fumaça, radiação solar entre outros) e/ou alimentos inadequados. Quando produzidos naturalmente, estes encontram-se na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biologicamente importantes. Porém, quando em excesso, os radicais livres são prejudiciais, uma vez que promovem a peroxidação dos lipídeos das membranas, agressões às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, 2006).

Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo, portanto, reativos ao oxigênio ou reativos ao nitrogênio (BARREIROS et al., 2006).

Os antioxidantes são divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. Na primeira, as enzimas que retiram as espécies reativas ao oxigênio, sendo compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação. Na segunda classe, as moléculas interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação (ANGELO; JORGE, 2007).

No organismo, os radicais livres desempenham papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, entretanto, o excesso deles pode ser responsável por peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, entre outras. O excesso é combatido por antioxidantes, destacam-se os compostos fenólicos, flavonóides, carotenóides e antocianinas (SÁ, 2012).

Existem inúmeros fenóis, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Os fenólicos são definidos, quimicamente, como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Por possuírem estrutura variável, são multifuncionais. Os antioxidantes fenólicos interagem, com o radical peroxil, por possuir menor energia do que outros radicais e ser mais prevalente na etapa da autooxidação, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (ANGELO; JORGE, 2007).

2.2.3 Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ é a mais complexa das vitaminas, contém um microelemento, o cobalto (cobalamina), quando ligado a um grupo cianeto, confere a denominação de cianocobalamina.

A cobalamina participa como co-fator para duas enzimas: a metilmalonil-CoA redutase e a metionina sintetase. A primeira está envolvida no metabolismo dos aminoácidos, do colesterol, da timina e dos ácidos graxos. A cianocobalamina estável precisa ser convertida em coenzimas ativas no organismo (VANNUCCHI, 2010).

A síntese da vitamina B₁₂ não é realizada por animais ou plantas, somente certos micro-organismos são capazes de sintetizá-la, como o *Rhizopous oligosporus*. No organismo humano, a absorção de vitamina B₁₂ já inicia na boca, por ação da saliva e continua até o final do intestino delgado. Em 60% dos casos de deficiência de vitamina B₁₂ resultam da má-absorção da cobalamina a partir da dieta, de 15% a 20% são decorrentes de anemia perniciosa e os demais estão associados à dieta insuficiente e a doenças hereditárias. A carência de vitamina B₁₂ causa anemia e alterações neurológicas, que reduzem a qualidade de vida do indivíduo, doença de Alzheimer, úlceras aftosas, depressão, demência e declínio da função cognitiva estão freqüentemente associados com deficiência de vitamina B₁₂ (FUTTERLEIB, 2005).

De acordo com Vannucchi (2010), o conteúdo corporal de cobalamina é estimado em 2,5 a 3,9 mg, e o fígado, detém cerca de 50% a 90% do conteúdo total. A vitamina é armazenada após degradação por proteases e transformação em suas coenzimas ativas adenosil-cobalamina e metil-cobalamina. A excreção é feita pelo trato gastrointestinal, rins e pele. Aproximadamente 3 mcg de cobalamina são secretados diariamente na bile, havendo reabsorção de cerca de metade da quantidade secretada.

2.2.4 Oligossacarídeos

De acordo com Silva Filho (2010), os oligossacarídeos rafinose, verbascose e estaquiose (Figura 1) são açúcares de baixo peso molecular que contêm um ou mais grupos α -D-galactopiranosil na sua estrutura. São considerados antinutricionais, pois são causadores de desconforto intestinal, sendo flatulências o sintoma mais comum. A rafinose é um trissacarídeo (C₁₈H₃₂O₁₆) constituído por uma molécula de galactose, uma de glicose e outra de frutose. A estaquiose (C₂₄H₄₂O₂₁) é um tetrassacarídeo que contêm duas moléculas de galactose, uma de glicose e outra de frutose. Já a verbascose (C₃₀H₅₂O₂₆), é um

pentassacarídeo constituído por três moléculas de galactose, uma de glicose e uma de frutose. Esses oligossacarídeos são sintetizados e armazenados em sementes e tubérculos, durante o processo de amadurecimento e variam de acordo com o grau de maturação da planta e de condições de cultivo como composição do solo e temperatura e estão presentes em quantidades relativamente altas (2-15% de peso seco) em sementes de leguminosas (YAMAGUISHI, 2008).

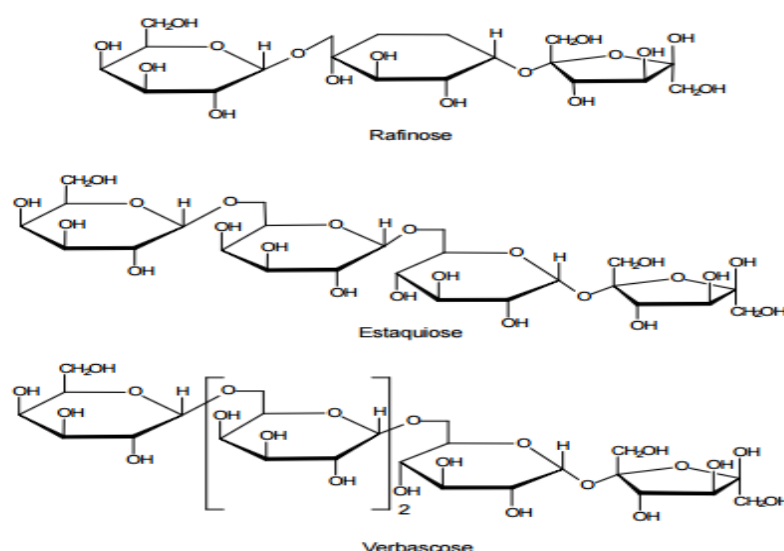


Figura 1- Representação estrutural da rafinose, estaquiose e verbascose.
Fonte: FILHO (2010)

2.3 *Tempeh*

Tempeh é um alimento tradicional da Indonésia, produzido por fermentação dos feijões de soja usando espécies *Rhizopus* e possui qualidades nutritivas significativas e funções de regulação metabólica (NAKAJIMA, 2005). Na fermentação, o fungo produz micélio que se liga formando uma massa compactada e é o responsável pelo sabor original, desenvolvimento da textura desejável e aroma do produto. É consumido normalmente frito, podendo ser cozido ou assado, por todos os grupos econômicos sendo utilizado como substituto de carne, devido a quantidade de proteínas (JELEN, 2013).

A quantidade de proteínas, lipídeos e as propriedades nutricionais tornam o *tempeh* atraente (Tabela 2). Estudos afirmam que o *tempeh* é mais resistente a oxidação lipídica que a soja não fermentada e há maior quantidade de isoflavonas em relação a grãos de soja. Altamente nutritivo, de fácil digestão e boa aceitação sensorial, o *tempeh* atende uma demanda crescente de consumidores que procuram substituir a carne. Por possuir elevado teor

de proteínas é considerado um complemento protéico. Algumas das características nutricionais advêm das alterações promovidas pelo *Rhizopus oligosporus* (OWENS, 2015).

Tabela 2. Composição nutricional do *tempeh*, em 100 g de produto comestível.

	Energia	(Kcal)	157
Macro constituintes	Proteína	(g)	19,5
	Lipídio	(g)	7,5
	Carboidrato	(g)	9,9
	Fibra	(g)	3,2
	Cinza	(g)	1,6
	Sólidos solúveis	(g)	28,0
Vitaminas	Tiamina (Vit. B ₁)	(mg)	0,28
	Riboflavina (Vit. B ₂)	(mg)	0,65
	Niacina (Vit. B ₃)	(mg)	2,52
	Ácido pantoténico	(mg)	0,52
	Piridoxina (Vit. B ₆)	(mg)	0,83
	Biotina	(µg)	53,0
	Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	(µg)	0,1
Minerais	Folacina (Vit. B ₉)	(µg)	3,9
	Ca	(mg)	142,0
	P	(mg)	240,0
	Fe	(mg)	5,0

Fonte: KARYADI et al., (1995), citado por NAIA (2015)

O maior inconveniente do *tempeh* é sua vida útil limitada, cerca de dez dias sob refrigeração, pois depois de fermentado outros micro-organismos tendem a utilizar seus nutrientes, além da atividade enzimática microbiana. Como alternativa de armazenamento, o *tempeh* pode ser congelado (JAGASIA, 2015).

O *tempeh* teve origem há 2000 anos, trazido por comerciantes chineses, que fermentavam a soja, produzindo o koji. A Indonésia, no final de 1600, conheceu o *tempeh* e modificou sua produção, devido ao paladar dos javaneses e clima propício para o *Rhizopus*, que se adapta ao calor e a umidade dos trópicos (ROSA, 2009).

Grãos de soja não são consumidos apenas como *tempeh*, também fazem parte do patrimônio cultural. Na cerimônia de casamento javanês, o noivo presenteia a noiva e sua família com alimentos, incluindo arroz, milho, soja e feijão preto, como um símbolo de sua responsabilidade para o bem-estar da família (AOKI, 2003).

Segundo Owens (2015), os holandeses foram os primeiros a estudar *tempeh* no final de 1800 e um pesquisador norte-americano observou o micro-organismo utilizado para fermentação, desenvolvendo um método de produção que utilizava sacos plásticos ao invés das tradicionais folhas de bananeira.

Durante o início do século XIX, a sociedade javanesa, passando pela escassez de alimentos tornou o consumo de *tempeh* uma realidade. Durante a segunda guerra mundial, os prisioneiros de guerra sofriam com problemas intestinais por intolerância à soja, um prisioneiro do campo de Cingapura, relatou que no fim de 1943, os japoneses, substituíram parte da alimentação por soja e produziam o *tempeh* com forma de amenizar os desconfortos (ROUBOS-VAN DEN HIL, 2011).

Na década de 1980, *tempeh* foi apontado como novo produto na América do Norte, Europa e partes da Ásia, mais notavelmente no Japão. Nos Estados Unidos, há uma grande tendência de substituição da carne por *tempeh* nos tradicionais hambúrgueres americanos. Na Indonésia, *tempeh* ainda é amplamente consumido por todas as classes econômicas da sociedade, e era visto anteriormente como alimento de pessoas pobres, sendo hoje orgulhosamente parte da cozinha indonésia (JAGASIA, 2015).

Segundo Shurtleff et al., (2011), na década de 1980, hambúrgueres de *tempeh* de soja foram utilizados para promover o consumo de *tempeh*. Eram vendidos na Europa e EUA, com apelo de saudável e como substituto de carne bovina, conforme Figura 2.



Figura 2- Cards de propagandas promovendo os hambúrgueres de *tempeh*
Fonte: Shurtleff et al., (2011)

2.3.1 Diversidades do *Tempeh*

Outros substratos também podem ser utilizados para a fermentação: grão de bico, cevada, ervilha, tremço e feijão. Dependendo da matéria-prima, possui denominações diferentes, demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Diferentes tipos de *tempeh* e respectivas matérias-primas.

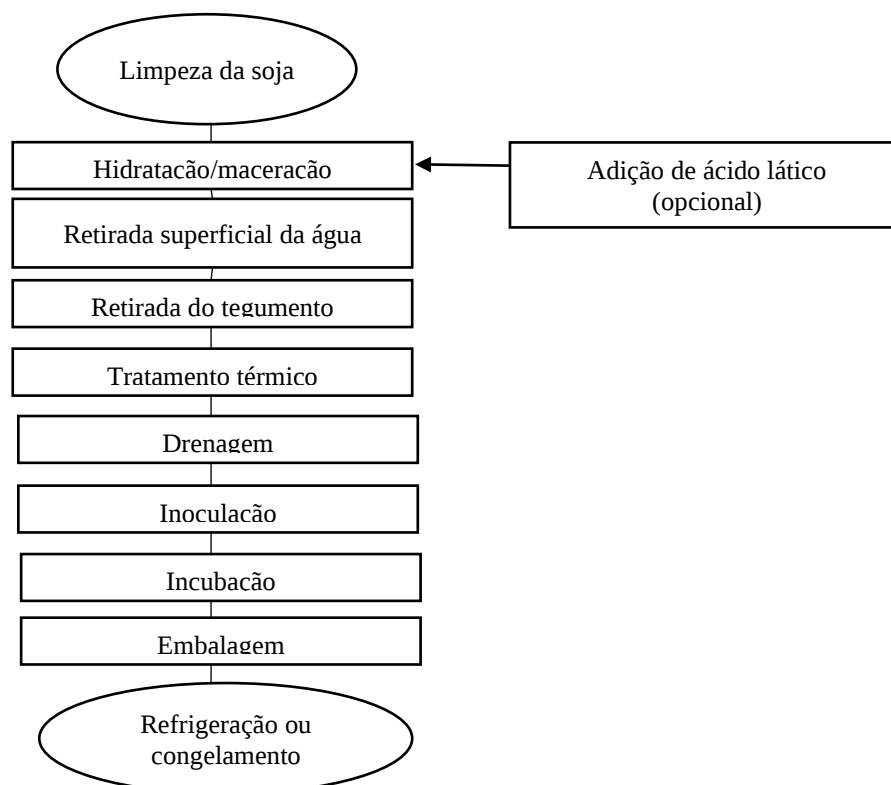
Matéria-prima	Micro-organismo	Referencia
Leguminosas	<i>R.oligosporus</i>	Nout et al., (1987); Varzakas (1998)
Soja (<i>Glycinemax</i>)		
Feijão preto (<i>Phaseolus mungo</i>)	<i>R.oligosporus</i>	Jha and Verma (1980)
Cereais	<i>R.oligosporus</i>	Nout and Rombouts (1990); Hachmeister and Fung (1993); Berg et al., (2001).
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)		Hesseltine and Wang (1980); Nout and Rombouts (1990); Hachmeister and Fung (2002)
Trigo (<i>Triticum vulgare</i>)	<i>R.oligosporus</i>	
Sprouted Broken rice		Dinesh (2009)
Mistura de leguminosas e outros grãos	<i>R.oligosporus</i>	Shurtleff and Aoyagi (2001)
Gergelim e soja		
Milho e soja	<i>R.oligosporus</i>	Nout and Kiers (2005)
Milho e soja	<i>R.oligosporus</i>	Nout and Kiers

Fonte: Adaptado de BABU (2009)

2.3.2 Produção e Consumo

O *tempeh* é um alimento interessante por sua produção ser de tecnologia simples, baixos custos, único ingrediente (soja ou grãos), ideal em clima tropical, fermentação simples e curta e também por ser um substituto da carne, saudável e saboroso (FENG, 2005).

Tradicionalmente, as etapas da preparação do *tempeh* tradicional estão demonstradas na Figura 3:

**Figura 3** – Fluxograma: Produção do *tempeh* de soja.

Os grãos de soja são previamente selecionados e limpos, em seguida, maceração em água que cubra a superfície dos grãos. A água deve ser trocada a cada 6 horas. Depois deste processo o grão é seco com pano ou papel absorvente para que o excesso de água seja retirado. Os grãos são descascados manualmente e cozidos em panela aberta cerca de 60 minutos. Os principais objetivos da cocção são: destruição de bactérias contaminantes que possam interferir na subsequente fermentação fúngica (HUTKINS, 2006; KUSWANTO, 2005) desnaturação do inibidor da tripsina, uma proteína da soja que atua como fator antinutricional (HUTKINS, 2006); liberação de nutrientes necessários ao crescimento do fungo durante o passo seguinte (HUTKINS, 2006; KUSWANTO, 2004) melhoria da produção do *flavour* específico do *tempeh* (KUSWANTO, 2004).

Após a cocção, os grãos são drenados e inoculados com o *Rhizopus oligosporus* e incubados por cerca de 24 horas em temperatura de 30 ± 2 °C. Em seguida, o produto já fermentado é refrigerado e embalado. A tecnologia de processamento de *tempeh* ainda necessita de melhorias, para uma produção de escala industrial significativa (JAGASIA, 2015; OWENS, 2015).

Na produção rústica, artesanal, a soja não deve ser lavada para a produção de ácido láctico por micro-organismos naturais. Na folha do hibisco (*Hibiscus L.*) está naturalmente presente o *Rhizopus*. Uma camada dos grãos de soja é sobreposta ao hibisco, utilizado na fermentação do produto, posteriormente são envolvidas nas folhas de bananeira e armazenadas. A pilha de folhas é então enrolada e amarrada com palha de arroz, é colocado num saco de juta ou cesto e deixado de 2 a 3 dias à temperatura ambiente. Estará pronto quando o micélio do fungo branco aparece na superfície das folhas de bananeira (HAN WU, 2015).

2.4 Matérias-primas

Soja (*Glycinemax L. Merrill*) é uma oleaginosa importante que se destaca por fornecer produtos diferentes para nutrição humana e animal. Com alto valor econômico no mercado nacional e internacional, a soja é rica em proteínas, contém isoflavonas (às quais são atribuídas funções similares às do estrógeno com efeito benéfico sobre os lipídeos plasmáticos e lipoproteínas), reduz o risco de doenças crônicas degenerativas, sintomas da menopausa, osteoporose, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares soja (PENHA, 2007).

De acordo com a EMBRAPA SOJA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), “em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligossacarídeos como rafinose e estaquiose)”. Soja sem processamento possui um gosto desagradável de feijão cru, devido a lipoxigenase, enquanto no *tempeh* fermentado por *R. oligosporus* tem um agradável sabor de cogumelo. Está presente na soja considerável quantidade de isoflavonas agliconas, componente funcional, importante por suas funções similares ao hormônio estrogênio que apresenta efeito benéfico sobre os lipídeos plasmáticos e lipoproteínas. As isoflavonas presentes na soja são a genisteína, daidzeína e gliciteína (JAGASIA, 2015; KRISNAWATI, 2015; KUSWANTO, 2004).

De acordo com o Relatório de Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Safra 2015/2016, CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), representado na Tabela 4, a produção mundial de soja vem crescendo a cada ano, devendo ser destacada a posição do Brasil neste cenário, ocupando o segundo lugar no volume de produção. Vale ressaltar a importância econômica e comercial deste “pulse”, além da tecnologia que o país detém no que diz respeito à produtividade, qualidade e produtos de soja.

Tabela 4. Produção mundial de soja em milhões de toneladas por ano/país.

País/ Safra	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16 Novembro	2015/16 Dezembro
Estados Unidos	84,29	82,79	91,39	106,88	108,35	108,35
Brasil	66,50	82,00	86,70	96,20	100,00	100,00
Argentina	40,10	49,30	53,50	61,40	57,00	57,00
China	14,49	13,05	12,20	12,35	11,50	11,50
Paraguai	4,04	8,20	8,19	8,10	8,80	8,80
Índia	11,70	12,20	9,50	8,70	9,50	8,00
Canadá	4,47	5,09	5,36	6,05	5,95	6,24
Outros	14,84	16,20	16,28	19,32	19,91	20,22
Total	240,43	268,82	283,12	319,00	321,02	320,11

Fonte: Adaptado de CONAB 2015/2016

Segundo Pinto (2016), o feijoeiro comum é uma planta herbácea, pertencente à família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. Dentro das cinco mais cultivadas do gênero é a espécie mais importante, por ser a mais antiga e a mais cultivada nos cinco continentes (CEPEF, 2001). Essa leguminosa era cultivada no antigo Egito e na Grécia, sendo também cultuada como símbolo da vida (EMBRAPA, 2010). Teve origem na América Central e na América do Sul, de onde surgiram grãos de diferentes cores, formas e tamanhos, sendo essas características a base para a classificação das classes

comerciais de feijão. É considerada cultura de significativa importância socioeconômica no mundo todo (BROUGHTON et al., 2003). Muitas pessoas das regiões tropicais e subtropicais do planeta dependem deste grão como principal alimento básico (YOKOYAMA, 2014).

O feijão possui em média de 20 a 35% de proteína, dependendo do cultivar e apresenta baixos valores de aminoácidos limitantes como: a metionina e a cistina, além do triptofano. Também apresenta baixa digestibilidade, quando comparado às proteínas de origem animal. Um dos fatores a interferir na baixa digestibilidade das proteínas do feijão cru é a presença dos inibidores de proteases (SANTOS; GAVILANES, 2006).

Contém muitos grupos hidroxila, que permitem a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas, o que reduz sua digestibilidade e consequente aproveitamento das mesmas pelo organismo. Estes grãos são uma excelente fonte de minerais, apresentando teores consideráveis de ferro, cálcio, cobre, zinco, fósforo, potássio e magnésio. Quando armazenados em ambiente de alta umidade e passando por longo tempo de cocção, por causa do endurecimento pós-colheita, os grãos de feijão apresentam redução do valor nutricional (TOLEDO, 2008).

Apesar da produção de “pulses” se elevar a cada safra, nos últimos anos o consumo vem regredindo, pois, esses produtos são transformados e utilizados como insumos em produtos industrializados, com suas propriedades perdidas. A diminuição do consumo de cereais e leguminosas é um fator preocupante, pois esses alimentos fornecem nutrientes importantes, destacando seu papel funcional, por isso, a fermentação do feijão representa uma abordagem estratégica para a diversificação de produtos derivados de feijão (CAMPOS-VEGA, 2013).

De acordo com o Relatório de Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Safra 2015/2016, CONAB, na região Centro-Sul, onde maior parte do volume da produção de feijão primeira safra é produzida, volume da região é quase 53,04% da produção total, destacando-se Paraná, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e São Paulo, mesmo ocupando apenas 45,89% das áreas cultivadas com a cultura (Tabela 5).

Tabela 5. Produção de feijão por região , área e produção em milhões de toneladas por ano.

Região/UF	Área (Em milhão ha) Safra 15/16	Produção (Em mil t) Safra 15/16
Centro-oeste	72,4	165,6
MT	8,3	13,5
MS	0,7	1,5
GO	51,3	120,7
DF	12,1	29,9

Sudeste	199,2	302,5
MG	148,0	192,4
ES	6,2	4,7
RJ	0,4	0,3
SP	44,6	105,1
Brasil	1.024,3	1.185,0

Fonte: Adaptado de CONAB 2015/2016.

2.4.1 *Hard – to – cook*

As condições desfavoráveis do armazenamento de feijão reduzem sua capacidade de absorção de água durante a cocção, o que dificulta a separação celular, a gelatinização do amido e promove desnaturação protéica. Além disso, a presença de taninos também está associada e este defeito conhecido como *hard-to-cook* (HTC), que provoca redução da qualidade nutricional e na baixa aceitação dos consumidores (VANIER, 2012).

Este problema tem algumas explicações: oxidação e/ou polimerização lipídica, formação de pectatos insolúveis, lignificação da lamela média, reação de β - eliminação da pectina, desnaturação protéica, ligações cruzadas de proteínas desnaturadas e/ou de polifenólicos. As enzimas também têm papel fundamental nesta transformação, conforme o esquema demonstrado na Figura 4.

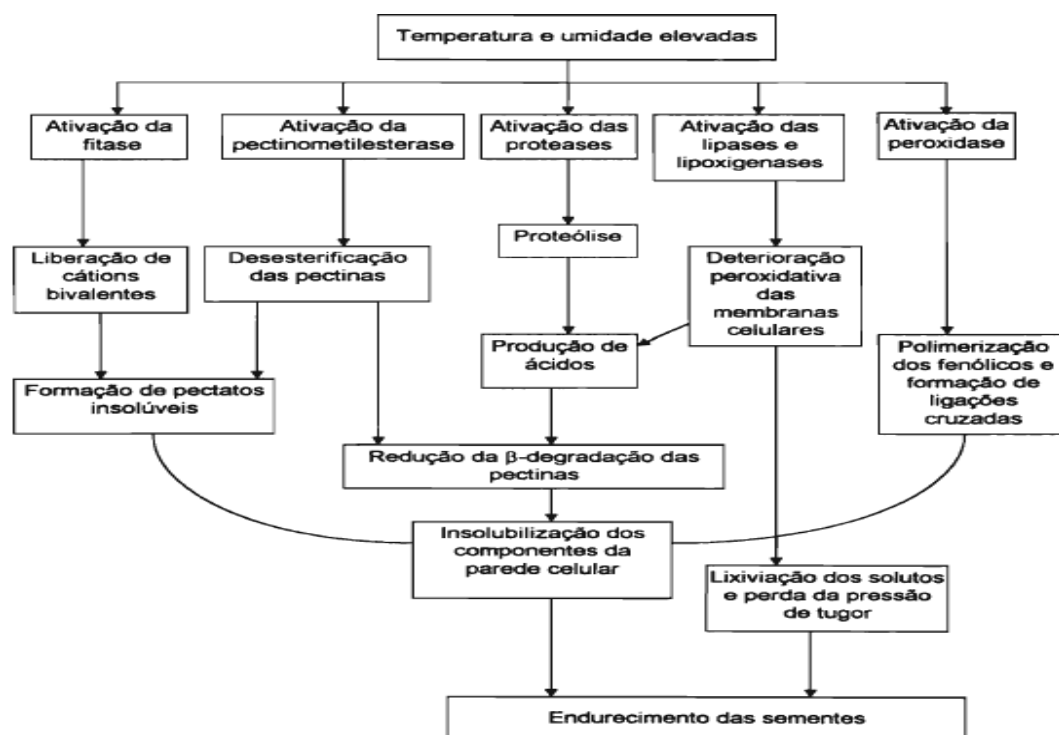


Figura 4-Esquema da contribuição de enzimas no processo de endurecimento de leguminosas
Fonte: Shiga, 2009

2.5 Microbiota do *Tempeh*

O fungo fermentador selvagem, *Rhizopus oligosporus*, é encontrado em flores de hibisco (*Hibiscus* L.), abundante em Cingapura e na Indonésia. A composição da microbiota do *tempeh* inclui um grande número de bactérias e leveduras para além dos fungos. As interações microbianas são claramente importantes durante a fermentação do *tempeh*, embora em fases distintas deste processo (KUSWANTO, 2005).

O pH da água da etapa de maceração geralmente atinge pH 4,5 a 5,0 devido ao ácido láctico e misturas de fermentações ácidas. Embora a produção de *tempeh* dependa, claramente, do crescimento de *Rhizopus oligosporus*, a fermentação que ocorre durante a maceração é também essencial, sobretudo para controle de potenciais micro-organismos patogênicos que possam existir no grão incluindo a *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (CRUZ, 2014).

As propriedades do *tempeh* são resultado da atividade do *Rhizopus oligosporus*, porém outras cepas podem fermentar a soja e transformá-la em *tempeh*: *Rhizopus formosaensis* e *Rhizopus roryzae* (NOUT, 2005).

2.5.1 *Rhizopus oligosporus*

A espécie *Rhizopus oligosporus* possui células filamentosas assetadas (células contínuas que não se dividem em compartimentos) designadas por hifas, que se caracterizam pelo seu crescimento aéreo e rápido, formando uma estrutura ramificada e complexa, o micélio aéreo 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 zigospório, o qual, sob condições favoráveis, forma esporos que germinam para desenvolver um novo indivíduo (NAIA, 2015).

Os fungos do género *Rhizopus* sp são classificados: filo: *Zygomycota*; classe: *Zygomycetes*; ordem: *Mucolares*; família: *Mucolaceae*; género: *Rhizopus*. Dentre as espécies do género *Rhizopus*, encontram-se as espécies *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circicans*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus formosa*, *Rhizopus stolonifer* (CRUZ, 2014).

Durante o período de incubação um terço da fração lipídica e um quarto da fração protéica são degradados. Durante a fermentação, o *Rhizopus* induz mudanças na composição

nutricional do *tempeh*, nomeadamente a redução de fatores antinutricionais e produção de vitaminas. Há estudos sobre 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 oligossacarídeos foram totalmente removidos e houve uma redução significativa no teor de ácido fítico após 48 h de fermentação (JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Também avaliou-se o efeito da fermentação pelo mesmo fungo no teor de oligossacarídeos em duas espécies de tremoço (*L. mutabilis* e *L. campestris*) e em soja, tendo demonstrado que, ao fim de 48 h, o teor de oligossacarídeos diminuiu para valores indetermináveis na espécie *L. campestris* e na soja, e cerca de 93% na espécie *L. mutabilis* (NAIA, 2015).

Fontes de carbono, nitrogênio e macro e micronutrientes (como sais minerais e algumas vitaminas), são substratos que contêm nutrientes que os fungos requerem e geralmente necessitam da aeração (MIUAOKA, 2012).

As principais vantagens de se utilizar *Rhizopus oligosporus* (Figura 5), resultam do fato de ser de fácil manipulação, capaz de crescer rapidamente em diferentes substratos e produzir vitamina B₁₂ (KUSWANTO, 2005).

Uma das mais importantes funções que o fungo tem no processo de fermentação é a síntese enzimática, no qual hidrolisa os constituintes da soja e contribui para o desenvolvimento de uma agradável textura, *flavor* e aroma no produto (HACHMEISTER; FUNG, 1993).

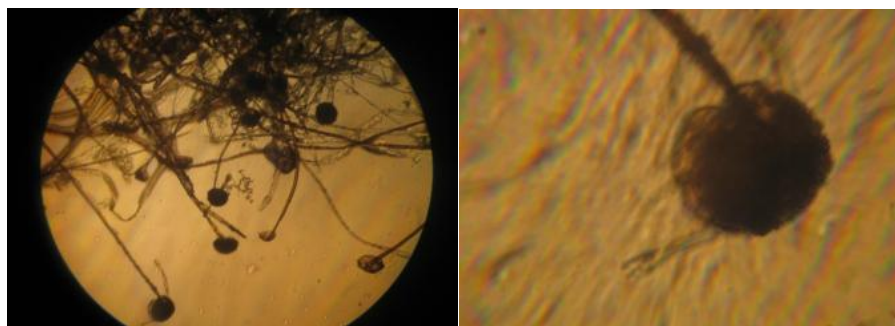


Figura 5- Imagem do *Rhizopus oligosporus* no microscópio
Fonte: CRUZ, 2014

O fato de o *tempeh* ser submetido ao processo fermentativo, ele também pode fornecer os benefícios de saúde dos alimentos probióticos, que atualmente estão em alta nos mercados nacional e internacional. Nos últimos anos, produtos assim denominados ganharam as prateleiras dos supermercados e as mesas dos consumidores que buscam dietas mais

saudáveis. Um probiótico é um alimento ou suplemento alimentar contendo microrganismos vivos que trazem benefícios ao consumidor. Diversos estudos mostram que manter uma microbiota intestinal saudável traz diversos benefícios à saúde e podem ajudar a prevenir algumas doenças crônicas, como diabetes e alguns tipos de câncer do trato digestório. Devido a isso, os probióticos ganharam importância como alimentos que ajudam a equilibrar a flora intestinal além de auxiliar na prevenção de certos tipos de cânceres, como o câncer de cólon (SÁ, 2015).

Os probióticos aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos por incrementarem os níveis de vitaminas do complexo B e de aminoácidos, ajudam a melhorar a absorção de cálcio e ferro. Além disso, colaboram com outros processos, como a redução das taxas de colesterol e triglicérides e o fortalecimento do sistema imunológico (por aumentar a produção de células protetoras). Os probióticos também protegem a mucosa intestinal metabolizando as fibras presentes e transformando-as em ácidos. Assim, há uma diminuição na concentração de bactérias patogênicas, que provocam doenças e gases (MACHADO, 2012).

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 Objetivo Geral

Elaborar *tempeh* de feijão comum carioca cv. Pérola armazenado, caracterizar e comparar suas propriedades nutricionais, bioativas e sensoriais ao *tempeh* tradicional de soja.

2.6.2 Objetivos Específicos

- Produzir inóculo para viabilizar o *tempeh* de feijão comum carioca cv. Pérola envelhecido, verificando a evolução da fermentação de acordo com as proporções de feijão: soja;
- Estabelecer o procedimento de preparo do *tempeh*, obedecendo à legislação em relação a padrões microbiológicos de contaminação;
- Determinar e relacionar as propriedades nutricionais, teor de substâncias bioativas, cor e textura instrumental dos *tempehs* produzidos a partir de grãos de feijão comum carioca cv. Pérola sem tegumento e de soja;
- Avaliar a aceitação e intenção de compra de hambúrguer elaborado com *tempeh* de feijão comum carioca cv. Pérola, por análise sensorial, comparando com o *tempeh* tradicional de soja.

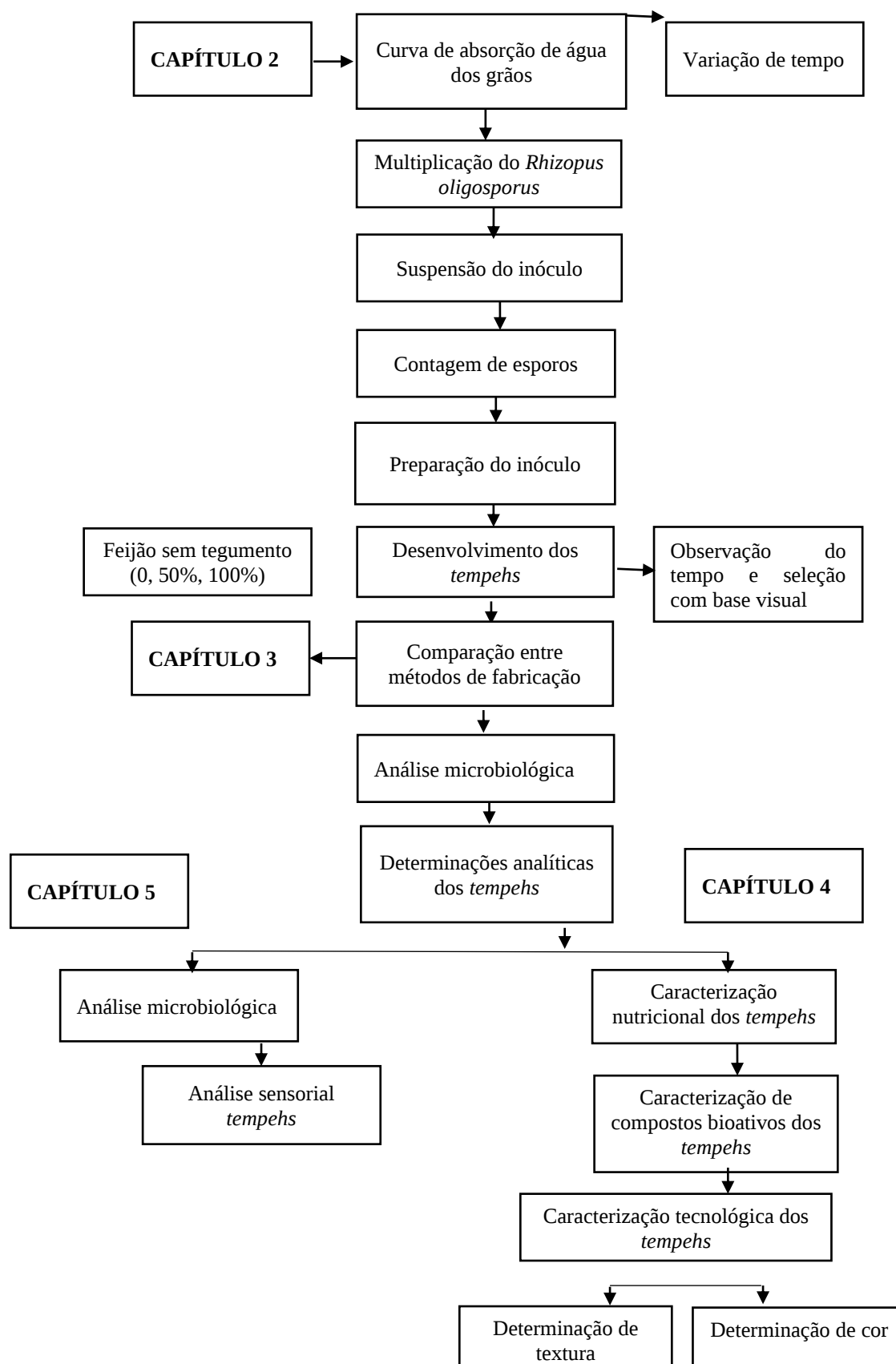


Figura 6- Fluxograma: Etapas do experimento

REFERÊNCIAS

ANGELO, P.M; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 66(1): 1-9, 2007.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International, USA, 16th Edition, 3rd Revision, volume II, 1997.

AOKI, H. UDA, I., TAGAMI, I., FURUYA, Y., ENDO, Y. and FUJIMOTO, K.. The Production of a New *Tempeh*-like Fermented Soybean Containing a High Level of g-Aminobutyric Acid by Anaerobic Incubation with *Rhizopus*. **Bioscience. Biotechnology Biochemistry**, 2003, 67, 1018–1023

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.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, 2006 v. 29, n. 1, p. 113.

BERG, S., J. OLSSON, M. SWAN BERG, J. SCHNAUZER AND A. ERIKSSON, 2001. **Method for the production of fermented cereal food products and products thereof**. In World Intellectual Property Organization. Sweden: Olligon AB.

BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT – Food Science and Technology**, 1995 London, v. 28, n. 1, p. 25-30.

BRASIL, Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 jan. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 Jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. **Beans (Phaseolus spp.) - model food legumes**. Plant and Soil, The Hague, v. 252, p. 55-128, 2003

CAMPOS-VEGA, R., B DAVE OOMAH, GUADALUPE LOARCA-PIÑA AND HAYDÉ AZENETH VERGARA-CASTAÑEDA Review. Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. **Foods** 2013, 2, 374-392.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 1999, v 50, p 131-149.

CARMIGNANI, LO.; PEDRO A.O., COSTA-PAIVA, L.H, PINTO-NETO A.M. The effect of soy dietary supplement and low dose of hormone therapy on main cardiovascular health biomarkers: a randomized controlled trial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2014; 36(6):251-8.

CEPEF – Comissão Estadual de Pesquisa de Feijão. **Feijão: recomendações técnicas para cultivo de feijão no Rio Grande do Sul**. Erechim: São Cristóvão, 2001. 112p.

CONAB (Brasil). Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2015/2016**, v. 1, n.3. Brasília: CONAB, 2016.

CRUZ, IVONE LOPES. **Desenvolvimento de um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a produção de tempeh em pequena escala a partir de diferentes leguminosas**. 2014. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia alimentar. Universidade de Lisboa, Lisboa- Portugal.

DINESH BABU, P., 2009. **Designing a low cost nutritious antioxidant food using Rhizopus oligosporous**. Thesis submitted for the award of Bachelor of Technology in Biotechnology to Bharathidasan University.

DURAND, A.; DE LA BROISE, D.; BLACHÈRE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, 1988, v.8, p.59-66.

EASH, N. S., P. D. STAHL, T. B. PARKIN, AND D. L. KARLEN. 1996. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. **Soil Science Society of American Journal** 60:468-471.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4p. (Comunicado técnico, 128).

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Procedimento Operacional Padrão para Determinação de Fibras Solúvel e Insolúvel**. Rio de Janeiro, RJ. 2008. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97331/1/2008-DOC-0094-2.pdf>. Acesso em 25 de fev de 2016.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Agência de Informação Embrapa: Feijão**, 2010. Disponível em: acesso em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/informação/index.htm>>. Acesso em: 15 de março de 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **International Year of Pulses, 2016**. Resolution adopted by the General Assembly on 20 December 2013. Disponível em:

http://www.un.org/en/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/68/231&referer=http://www.un.org/en/events/observances/years.shtml&Lang=E. Acesso em 25 de fev de 2016

FENG, X. M., A. R.B. ERIKSSON, JOHAN SCHNURER. Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley *tempeh* fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 1988.v 104 249– 256.

FILHO, E. G. A. **Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*)**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2010.

FUTTERLEIB, A. e CHERUBINI, K.; Artigo de revisão: Importância da vitamina B₁₂ na avaliação clínica do paciente idoso. **Scientia Medica**, 2005. Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 1, jan./mar.

GOMES, L.O.F. **Emprego da farinha de bandinha de feijão carioca extrusada na formulação de misturas para bolo sem glúten contendo farinha de quirera de arroz**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás; Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2012, 122 p.

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

HAGERMAN. A.E.; BUTTER. L.G. Protein precipitation method for the qualitative determination of tannins. 1978. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 26: 809 - 812.

HAN WU, RUI,X., LI, W., CHEN, X, JIANG, M., DONG, M. Mung bean (*Vignaradiata*) as probiotic food through fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. **LWT - Food Science and Technology**. 2015.p 445 e 451.

HESELTIME, C.W. and. WANG, H.L 1980. The importance of traditional fermented foods. **Bioscience**, 30: 402-404.

HUTKINS, R.W. 2006. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. 1ª ed. USA. Blackwell Publishing Professional. 473 p.

JAGASIA, D., FERRANDO, V. Z., ***Tempeh*: a tempting potential vitamin B₁₂ treat. An exploration of legumes and vitamin B₁₂**.2015. Institution enförkostvetenskap, Besöksadress: BMC, Husargatan, Uppsala.

JELEN, H, MAJCHER, M., GINJA, A. KULIGOWSKI, M. Determination of compounds responsible for *tempeh* aroma. **Food Chemistry**, 2013 v.141- 459–465.

JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C., HERNANDEZ-SÁNCHEZ, H., E DÁVILA-ORTIZ, G. 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**, 2007. 87:1315–1322.

JHA, K. AND J. VERMA, 1980. Removal of flatulence principles from legumes by mold fermentation. **Indian Journal of Experimental Biology**, 18: 658-9.

JHAN, JK., WF. CHANG., PM. WANG., ST. CHOU., YC. CHUNG. Production of fermented red beans with multiple bioactivities using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. **LWT - Food Science and Technology** (2015) p. 1281 e 1287.

KRISNAWATI, A. and MUCHLISH, M.A.P. Selection of soybean genotypes by seed size and its prospects for industrial raw material in Indonesia. **Food Science**. 2015p.355 – 363. The First International Symposium on Food and Agro-biodiversity

KUSWANTO, K.R. **Studies on the semayi Indonesian traditional fermented food**. 2004Memoirs of the Tokyo University of Agriculture30:189–287.

LANDIM, L. A. S. R; BARROS, N. V. A; LEAL, M. J. B; SILVA,M.G.S.S; COSTA N Q; PORTO, R. G. C. L; SILVA, K. J. D; ROCHA M. M.; ARAUJO, M. A. M; ARAUJO, R S R. M. Composição Química do Biscoito Base de Farinha de Feijão Caupi (*Vigna Unguiculata*(L.) Walp) Biofortificado. **III CONAC – Congresso Nacional do Feijão Caupi**. 22 a 24 de abril de 2013 – Recife – PE

LIMÓN, R.I., E. PENHAS., M. I. TORINO., C. MARTÍNEZ-VILLALUENGA., M. DUEÑAS, J. FRIAS. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. **Food Chemistry**.2015 p. 343–352.

MACHADO, K.I.D.;**Alimentos Funcionais: Um Guia Com Receitas**.Editora EDIPUCRS, ed. 2012.

MERRIL, A. L.; WATT, B. K. **Energy value of foods**: basis and derivation. Washington: United States Departament of Agriculture, 1973. 105 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Alimentos Funcionais**. Biblioteca Virtual em Saúde. Publicação em 12 de maio de 2015. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/dicas-em-saude/420-alimento-funcionais/>, acesso em 03 de fevereiro de 2016.

MIYAOKA, Mitiyo Fukuda.**Avaliação do Potencial dos Fungos do gênero *Rhizopus Spp* na Produção de Substâncias Bioativas com Ação Antioxidante Utilizando Diferentes Substratos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 2012.

NAIA, I. I. P. **Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de *tempeh* de soja**. 2015. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

NAKAJIMA, N., NOZAKI, N. AND ISHIHARA, K., ISHIKAWA, A. AND TSUJI, A. Analysis of Isoflavone Content in *Tempeh*, a Fermented Soybean, and Preparation of a New

Isoflavone-Enriched *Tempeh*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005. Vol. 100, No. 6, 685–687.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

NOUT, M.J.R. and KIERS, J.L. A REVIEW: Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, and Friesland. **Nutrition Research**, Friesland Coberco Dairy Foods, Leeuwarden, The Netherlands. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 789–805.

NOUT, M.J.R., M.A.D. DREU, A.M. ZUURBIER AND T.M.G. BONANTS VAN LAARHOVEN, 1987C. Ecology of controlled soybean acidification for Tempe manufactures. **Food Microbiology**, 4: 165-172.

NOUT, M.J.R. AND F.M. ROMBOUTS, 1990. Recent developments in Tempe research. **Journal of Applied Bacteriology**, 69: 609-633.

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

OLIVEIRA, G. D. C. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Vitaminas Hidro e Lipossolúveis em Comprimidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis (GO).

OLIVEIRA, M. N; SILVIERE, K. S, ALEGRO, J. H. A; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 2002. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 38, n. 1, jan./mar., – São Paulo.

OWENS, J. D, ASTUTI, M and KUSWANTO, K.R. **Tempe and Related Products**. Memoirs of the Tokyo University of Agriculture 2015.

PAREDES -LOPEZ, O; GWYNETH I. H and MONTES –RIVERA, R..Development of a Fermentation Procedure to Produce a Tempe-Related Food Using Common Beans as Substrate. **Biotechnology Letters**. Vol 9 No 5 333-338 (1987)

PENHA, A.O., I. C. B.FONSECA, J.M. MANDARINO, V.T. BENASSI. B.CEPPA. **A Soja Como Alimento: Valor Nutricional, Benefícios Para A Saúde E Cultivo Orgânico**. Curitiba, v. 25, n. 1, p. 91-102, jan./jun. 2007

PINTO, G. A. S; BRITO, E. S.; ANDRADE, A M R; FRAGA, S. L..P; TEIXEIRA, R. B.; **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. EMBRAPA, Agosto, 2005 - Fortaleza, CE.

- PINTO, J. V., **Propriedades Físicas, Químicas, Nutricionais e Tecnológicas de Feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de Diferentes Grupos de Cor**. Dissertação de Mestrado, Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2016.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A. Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 157-162, 2005.
- ROSA, M., CLAVISO, J., L. M. L. PASSOS E C. L. AGUIAR. REVISÃO: Alimentos fermentados à base de soja (*Glycinemax*(Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Brazilian Journal of Biosciences**. ISSN 1980-4849 (on-line) / 1679-2343.
- ROUBOS-VAN DEN, P.J. Hil1 and M.J.R. NOUT. Anti-Diarrhoeal Aspects of Fermented Soya Beans. **Food Microbiology**, 2011. Wageningen University, Wageningen The Netherlands.
- SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (*Selaginellaceae*). **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, 2012;33(4):561-566
- SÁ, M. M.; **A importância dos probióticos na dieta**. 20 de Julho de 2015. Revista eletrônica Cria Saúde. R7 Saúde, Rádio e Televisão Record S/A. Disponível em <http://www.criasaude.com.br/noticias/2015/029/a-importancia-dos-probioticos-na-dieta.html>. Acesso em 25 de março de 2016.
- SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. IN: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. p.41-66.
- SCRIMSHAW, N. S.; WALLERSTEIN, M. B. **Nutrition Policy Implementation: Issues and Experience**. Springer Science & Business Media, 6 de dez. de 2012 - 572 p.
- SHIGA, T. M.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v. 76, p. 100-109, 2009.
- SHURTLEFF, W. AND A. AOYAGI, 2001. **The Book of Tempeh**, 2nd edition. Pgs 48-50, 103-113.
- SOARES, L. A; BASSINELLO, P.Z; KOAKUZU, S. N; EIFERT, E. C; PELOSO, M. J. D. Fibra Alimentar em Feijão Comum e Feijão Caupi. Documentos, **Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas, p.85, 2008.
- SORENSEN, W.G.; HESSELTINE, C.W. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia*, v. 58, p.681-689, 1966.
- STEINKRAUS, K. H. (1996). **Handbook of Indigenous Fermented Foods**, Second edition. Marcel Dekker, New York.

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

TOLEDO, T. C. F. and CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Chemical and nutritional evaluation of Carioca beans (*Phaseolus vulgaris L.*) cooked by different methods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. Campinas, 28(2): 355-360, abr.-jun.

VANIER, N. L. **Armazenamento de cultivares de feijão e seus efeitos na qualidade tecnológica dos grãos e nas propriedades do amido**. Dissertação apresentada para obtenção de grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas. p. 88, 2012.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Cobalamina (Vitamina B12). **ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**. Série de Publicações ILSI Brasil. Volume 13 São Paulo - SP – Brasil, 2010.

VARZAKAS, T., 1998. *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean *Tempeh*. **Process Biochemistry**, 33: 741-747.

YAMAGUISHI, C. T. **Processo Biotecnológico para a Produção de Feijão Desidratado com Baixo Teor de Oligossacarídeos da Família Rafinose**. 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

YOKOYAMA, L. P. **Importância econômica**. 2014. Acesso em: 21 maio. 2017.

ZAGO, M. F. C. **Aproveitamento de resíduo agroindustrial de jabuticaba no desenvolvimento de formulação de cookie para a alimentação escolar**. 2014. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

ZHANG, M.; YOSHIYAMA, M.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWA, Y.; YOSHIOKA, T.; ESASHI, Y. Aging of soybean seeds in relation to metabolism at different relative humidities. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 7, p. 1189-1195, 1995.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE INÓCULO DE *Rhizopus oligosporus* PARA PRODUÇÃO DE TEMPEH DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) E TEMPEH DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) COM SOJA AMARELA (*Glycine max* L.)

RESUMO

A alimentação saudável, produtos práticos e a rápida alteração de gostos por parte do consumidor, tornam possível o consumo de produtos inovadores. *Tempeh* é um alimento tradicional da Indonésia, produzido por fermentação da soja usando espécies *Rhizopus*. Há um interesse no *tempeh* alternativo variando os substratos, como ervilhas, feijão, milho, arroz, lentilha e cevada. Este trabalho tem o objetivo de produzir inóculo para viabilizar o *tempeh* de feijão comum cv. Pérola envelhecido, verificando a evolução da fermentação de acordo com as proporções de feijão: soja. A cepa do *Rhizopus oligosporus* foi multiplicada em placas de petri e o inóculo foi produzido com arroz. Foram produzidos *tempehs* de feijão sem casca em diferentes proporções 50% soja/feijão (TFS) e 100% feijão (TF) e comparados visualmente com *tempeh* comercial 100% soja (TS). A concentração de células na suspensão de esporos foi de 10^6 células/mL, apresentando-se suficiente para fermentar os *tempehs*. O melhor resultado foi TF, devido a uniformidade do micélio e pelo tempo de fermentação (24 horas), aproximado ao tempo de fermentação do *tempeh* tradicional de soja (20hs). A amostra TFS não obteve boa consistência, uniformidade do micélio, maior tempo de fermentação (30 horas), além de pontos pretos. A diferença entre as matérias primas dos *tempehs* proporcionaliza tempos de fermentação diferentes, os polissacarídeos do feijão possuem peso molecular maior que as da soja e provavelmente são mais difíceis de serem hidrolisados pelas enzimas produzidas pelo *Rhizopus oligosporus* quando são apresentados juntos. O *tempeh* poderá ser uma alternativa interessante para o aproveitamento de grãos de baixo valor comercial e agregação de valor ao feijão.

Palavras-chave: fermentação; suspensão de esporos; feijão depreciado.

INCULO DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF COMMON BEAN *TEMPEH* (*Phaseolus vulgaris* L.) CV. PEARL AND SOYBEAN (*Glycine max* L.)

ABSTRACT

Healthy eating, practical products and the rapid change of consumer tastes make it possible to consume innovative products. Tempeh is a traditional Indonesian food, produced by fermenting soybeans using *Rhizopus* species. There is an interest in alternative tempeh varying substrates such as peas, beans, corn, rice, lentils and barley. This work has the objective of producing inoculum to enable the tempeh of common bean cv. Aged pearl, checking the evolution of the fermentation according to the proportions of beans: soybean. The strain of *Rhizopus oligosporus* was multiplied in petri dishes and the inoculum was produced with rice. 50% soybean / bean (TFS) and 100% bean (TF) were produced and compared visually with commercial soybean (TS) tempehs. The concentration of cells in the spore suspension was 106 cells / mL, being sufficient to ferment the tempehs. The best result was TF due to mycelial uniformity and the fermentation time (24 hours), approximate to the fermentation time of the traditional soybean tempeh (20hs). The TFS sample did not obtain good consistency, mycelial uniformity, longer fermentation time (30 hours), and black spots. The difference between tempehs raw materials provided different fermentation times, bean polysaccharides have a higher molecular weight than soybeans and are probably more difficult to hydrolyze by the enzymes produced by *Rhizopus oligosporus* when presented together. The tempeh can be an interesting alternative for the use of grains of low commercial value and aggregation of value to the beans.

Keywords: fermentation; spore suspension; beans depreciated.

1 INTRODUÇÃO

As constantes evoluções da indústria alimentar vêm revelando progressos tecnológicos e científicos no desenvolvimento de novos produtos. A alimentação saudável, produtos práticos e a rápida alteração de gostos por parte do consumidor, tornam possível o consumo de produtos inovadores. Seguindo esta tendência, o *tempeh*, alimento tradicional da Indonésia, produzido por fermentação da soja usando espécies *Rhizopus* (NAKAJIMA, 2005), se apresenta como alimento de fonte protéica, possui substâncias bioativas, atividade antioxidante, reduz os fatores antinutricionais aumentando a digestibilidade das leguminosas, vitaminas do complexo B, vitamina B₁₂ e fibra alimentar solúvel (BABU et al., 2009).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é rica em proteínas, contém isoflavonas, reduz o risco de doenças crônicas degenerativas, sintomas da menopausa, osteoporose, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares. Estudos demonstram que, a ingestão de proteína de soja reduz a taxa do mau colesterol (LDL), pois as gorduras predominantes no grão de soja são as poliinsaturadas e as monossaturadas, que não provocam obstrução de artérias. Os fitoestrógenos, semelhantes ao hormônio feminino, reduzem o risco de câncer de mama e de próstata e suas fibras ajudam no funcionamento do intestino e na redução dos níveis de glicose no sangue de diabéticos (PENHA, 2007).

A quantidade de proteínas, lipídeos e as propriedades nutricionais tornam o *tempeh* atraente. Estudos afirmam que o *tempeh* é mais resistente a oxidação lipídica que a soja não fermentada e há maior quantidade de isoflavonas em relação a grãos de soja. O *tempeh* pode ser produzido por outros substratos, porém não é comum, no entanto, há um interesse no *tempeh* alternativo variando os substratos, como ervilhas, feijão, milho, arroz, lentilha e cevada (KRISNAWATI, 2015).

O Brasil, sendo um importante produtor e detentor de tecnologias para produção de feijão, torna-se propício para pesquisas utilizando essa matéria-prima (KRISNAWATI, 2015). O crescente potencial de mercado interno e externo para os tipos especiais de feijões, atrai a gastronomia *gourmet*, além ser aproveitados em diferentes preparações culinárias e na indústria de alimentos, que não apenas na forma de grãos cozidos.

Este trabalho tem o objetivo produzir inóculo para viabilizar o *tempeh* de feijão comum cv. Pérola envelhecido, verificando a evolução da fermentação de acordo com as proporções de feijão: soja;

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os grãos de feijão carioca cv Pérola, considerada padrão comercial, e de soja convencional cv BRS 284 foram multiplicados na safra 2015/2015 na Fazenda Capivara, na Embrapa Arroz e Feijão, tendo sido colhidos para o experimento, 15 Kg de feijão e 25 Kg de soja. Os grãos foram armazenados em temperatura ambiente e utilizados após 18 meses da colheita. Os grãos de feijão carioca apresentaram-se mais escurecidos no momento do estudo, o que é um indicativo de envelhecimento de grão.

A cepa de *Rhizopus oligosporus* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, em Campinas (SP).

Como amostras de referência de *tempeh* de soja, foram adquiridos produtos comerciais (congelados) do mesmo lote junto ao fabricante em Rezende/RJ.

Após colheita e beneficiamento (secagem natural e limpeza), os grãos foram homogeneizados e submetidos a quarteamento manual antes da amostragem. Realizou-se uma seleção dos grãos, removendo aqueles que estavam danificados ou deteriorados. Os grãos sadios foram mantidos em câmara fria até uso.

A confecção dos temphe seguir o método utilizado por Starzynska-Janiszewska et al., (2013).

2.1 Curva de absorção de água

Após lavagem dos grãos em água corrente, 200 g de feijão Pérola e 200 g de soja BRS 284 foram colocados em béquer com 500mL de água destilada em temperatura ambiente (25°C). Com auxílio de uma peneira, os grãos foram retirados de cada recipiente em intervalos de tempo de 30 minutos (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min.) e posteriormente em intervalos de 4 horas (4, 8 e 16 horas) de maceração. Após retirados da maceração, os grãos foram secos em papel toalha e pesados em balança analítica, onde a absorção de água foi calculada em % considerando o ganho de peso dos grãos após hidratação. O teste foi realizado para estipular o tempo de hidratação, aquele no qual o grão atingiu o máximo de absorção de água.

2.2 Multiplicação do *Rhizopus oligosporus*

As cepas de *Rhizopus* sp. foram transferidas para placas de Petri com meio de PDA (Potato Dextrose Ágar) para maior produção de esporos. Após o crescimento do micélio e

formação de esporos, a superfície de cada placa foi raspada com uma alça de platina e este micélio transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada esterilizada (Figura 7). Desta suspensão foram realizadas contagens em câmara de Neubauer, conforme relatado por Miyaoka (2012) e demonstrado na Figura 8.

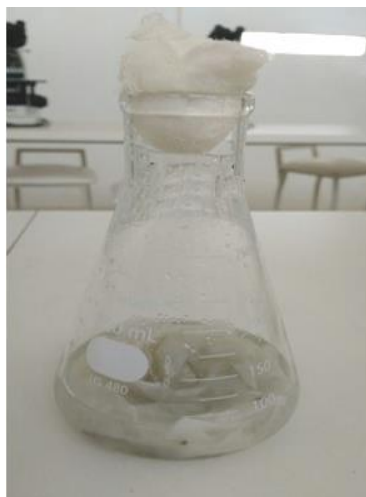


Figura 7- Suspensão de fungos



Figura 8- Etapas do preparo do inóculo e contagem

Fonte: Miyaoka (2012)

A fim de se determinar o meio de cultura ideal para produção do inóculo, a cepa de *Rhizopus* foi semeada em placas de Petri contendo os seguintes meios: PDA, PDA + farinha de arroz (FA), PDA + farinha de feijão (FF), PDA + 50% FA + 50% FF, conforme Figura 9.

Os meios de cultura já autoclavados, foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados em estufa à 30°C por 48 hs. O meio que apresentou melhor desenvolvimento do fungo foi escolhido para a preparação do inóculo.

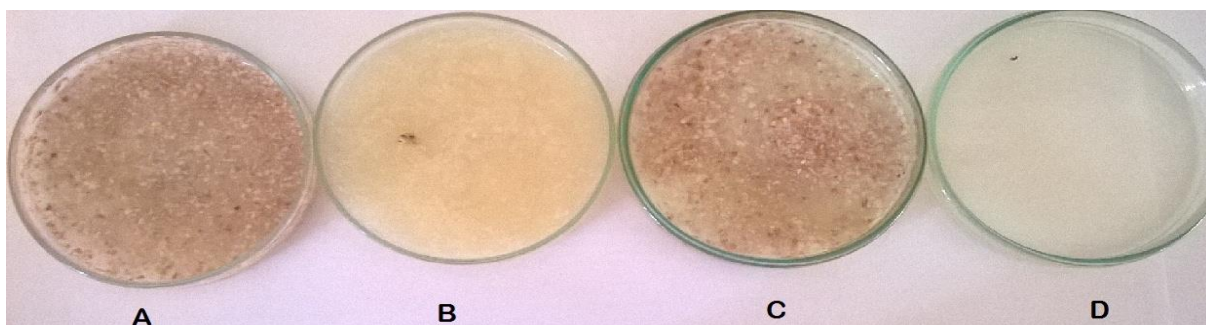


Figura 9– Placas de Petri com diferentes meios de cultura. (A) PDA e farinha de feijão; (B) PDA e farinha de arroz; (C) PDA, farinha de feijão e farinha de arroz e (D) PDA

2.3 Contagem de esporos

A contagem de esporos foi realizada utilizando a câmara de Neubauer (Global Trade, Dupla Melhorada – BSN 020) onde a suspensão foi homogeneizada e transferido 0,2 mL para um tubo de ensaio. Adicionou-se 0,6 mL de corante azul de tripano 0,2% ao tubo, uma alíquota de 0,5 mL foi depositada na lamínula, para contagem no microscópio. Para o cálculo foi utilizada a equação 1:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.4 Preparação do inóculo

Na produção da farinha inóculo, triturou-se 100 g de arroz agulhinha tipo 1, tamizou-se em agitador magnético BERTEL® utilizando peneiras 200 mesh. A farinha foi colocada em recipientes de vidro com tampa metálica. Esterilizou-se e aguardou-se resfriar. Em cada recipiente inoculou-se 20 mL do inóculo e incubou-se em estufa a 30 °C por 5 dias. Após este período os recipientes foram armazenados em refrigeração e utilizados em até 30 dias.

2.5 Produção do *tempeh*

Após conclusão de todas as etapas anteriores, foram inoculadas as matérias-primas tendo como fator determinante a fermentação avaliada visualmente, ou seja, monitorando-se o desenvolvimento do micélio produzido pelo *Rhizopus oligosporus* em função dos tempos de fermentação, até que toda a extensão da matéria-prima estivesse ocupada pelo fungo.

Foram produzidas três repetições de *tempehs* de feijão sem casca em diferentes proporções: 50% feijão/50% soja (TFS) e 100% feijão (TF) e os resultados encontrados foram comparados com o *tempeh* comercial de 100% soja (TS).

Os feijões e a soja, cerca de 750 g e 250 g, respectivamente, foram lavados em água corrente. A hidratação/maceração dos grãos foi realizada de acordo com o tempo definido anteriormente (item 2.2.2.1). Posteriormente, foram secos manualmente em papel toalha. A retirada do tegumento foi realizada manualmente após a maceração. O tegumento foi retirado do feijão e da soja, pois a casca é uma barreira física para a fermentação.

Em seguida, a matéria-prima foi submetida a cocção em água fervente (100 °C) em panela aberta durante 30 minutos. Após cocção, os grãos foram drenados. Foram pesados 100 g de feijão para a amostra TF e 50 g de feijão e 50 g de soja para amostras TFS. As leguminosas secas, foram colocadas em sacos plásticos de polietileno, em seguida, inoculou-se 20 g, em cada saco o inóculo produzido com a farinha de arroz.

Após o acondicionamento, os sacos foram selados e pequenos furos foram feitos com um garfo de modo a permitir o contato com oxigênio da cultura de *Rhizopus oligosporus*. Por fim, os grãos foram incubados em estufa à 30 °C e monitorados nos tempos 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 h, a fim de verificar visualmente o desenvolvimento do micélio. O *tempeh* depois de pronto foi congelado para futuras análises.

As amostras TFS, TF e TS foram desidratadas por liofilização, em equipamento Liofilizador L101, LIOTOP®, por 48 horas, até que todo material estivesse completamente desidratado.

Neste trabalho, a condição de oxigênio não foi mensurada. Porém, durante o desenvolvimento da pesquisa, observou-se que se houvessem excesso de furos nas embalagens, os *tempehs* apresentavam pontos pretos e a escassez de furos não havia fermentação. Para o processo de fermentação, foi colocado um béquer com água destilada na estufa a fim de aumentar a umidade relativa dentro da estufa, porém também não foi mensurada por falta de equipamento com este recurso.

2.6 Análise Estatística

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, o tratamento estatístico dos resultados obtidos para os parâmetros de hidratação dos grãos de soja e feijão foram efetuados no programa Microsoft® Office Excel 2013, tendo-se efetuado os valores médios e erro das médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 10 e 11, pode-se observar que os grãos de feijão e de soja apresentaram diferentes curvas de absorção de água. A soja absorve água mais rápido que o feijão. Nos tempos 480 min. a 1200 min., pode-se considerar que a soja manteve o peso constante, diferentemente do feijão que continuou absorvendo água até o tempo final. Este fenômeno pode ser explicado devido o tegumento do feijão apresentar uma espessura maior que o da soja, menos maleável e mais aderente ao cotilédone (CAVARIANI, 2009; OLIVO, 2011)

Durante a maceração, a água é difundida para o interior do grão de feijão, promovendo o aumento do seu volume. Esta expansão volumétrica ocorre nas direções radiais e axiais dos grãos, sendo influenciada pela temperatura da maceração. A cinética de hidratação tem sido estudada para diversos produtos agrícolas como o milho, feijão Kidney, soja, trigo e arroz. A absorção de água dos grãos por maceração aumenta com a elevação da temperatura e do tempo (RESENDE, 2007).

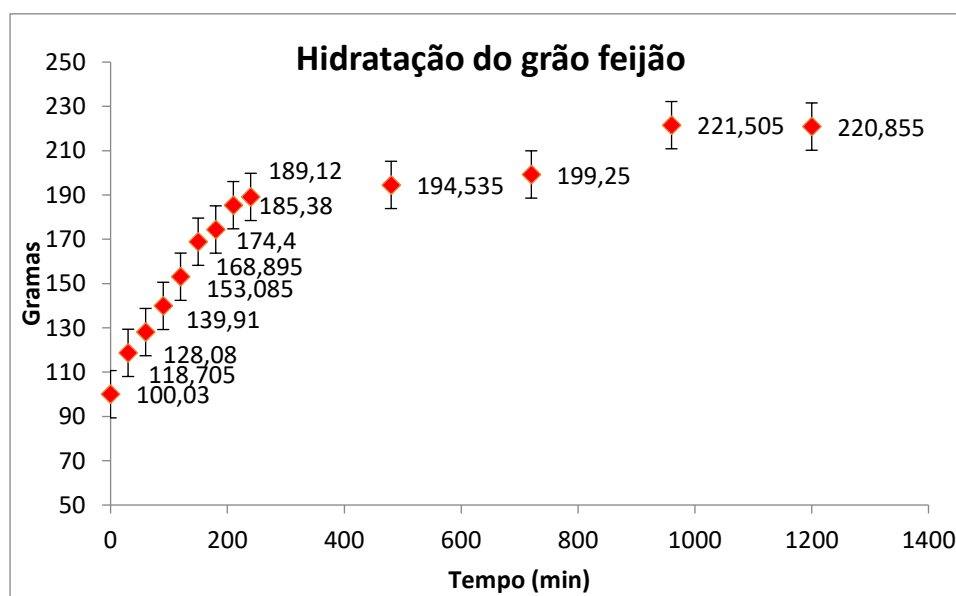


Figura 10—Curvas de absorção de água dos grãos de feijão à temperatura ambiente.

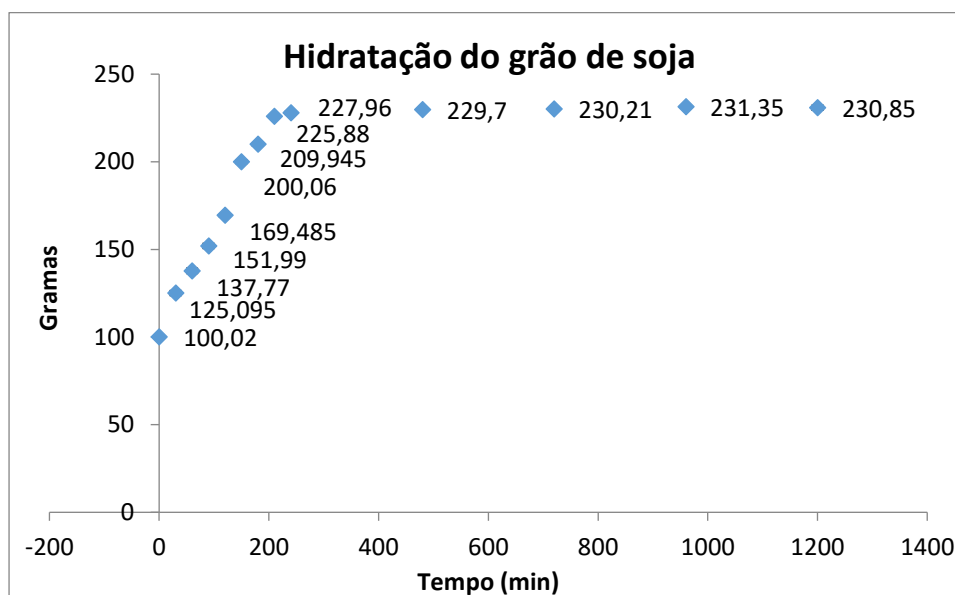


Figura 11—Curvas de absorção de água dos grãos de soja à temperatura ambiente.

A hidratação é compreendida como um processo físico coerente com as características de permeabilidade do tegumento e as propriedades dos colóides constituintes dos grãos. A velocidade de absorção de água depende da composição química, permeabilidade do tegumento e da presença de água nas formas líquida ou gasosa no meio em que o processo está ocorrendo (FRACASSO, 2011).

Cavariani et al., (2009) argumentam que a permeabilidade do tegumento afeta a velocidade de hidratação da soja, devido a variações de espessura e composição, além da cultivar e local de produção, sendo a gelatinização do amido uma das principais razões da hidratação.

Abu-Ghannam et al., (1998), em seu estudo da cinética de hidratação do feijão, observaram que a dureza do grão atinge um certo equilíbrio após a umidade atingir um certo nível, mesmo que o grão continue a absorver água do meio e a força de cisalhamento nos grãos reduzir em função do aumento de umidade.

No caso da soja, as proteínas são as principais responsáveis pela hidratação e aumento de tamanho da celulose e substâncias pécicas, o amido e os lipídios apresentam intervenção reduzida no processo (BECKERT et al., 2000).

Coutinho et al., (2010) compararam estudos feitos sobre hidratação de grãos de soja e observaram que a umidade de equilíbrio independe da temperatura e o tempo requerido para o equilíbrio é influenciado pela temperatura, mas a cultivar de soja exerce influência sobre esse sistema.

De acordo com o observado na curva de hidratação, para a amostra de feijão, o tempo de maceração foi definido em 20 horas e para os grãos de soja foi definido em 16 horas, pois as amostras atingiram seu ponto máximo de hidratação.

Após 48 hs de fermentação, por meio de análise visual, pode-se observar que todos os meios de cultura proporcionaram o desenvolvimento do fungo na placa de petri (Figura 12). Porém, o meio de cultura que continha adição de arroz (2) e o que continha somente PDA (4), permitiram melhor desenvolvimento de micélio nas placas (Figura 13).

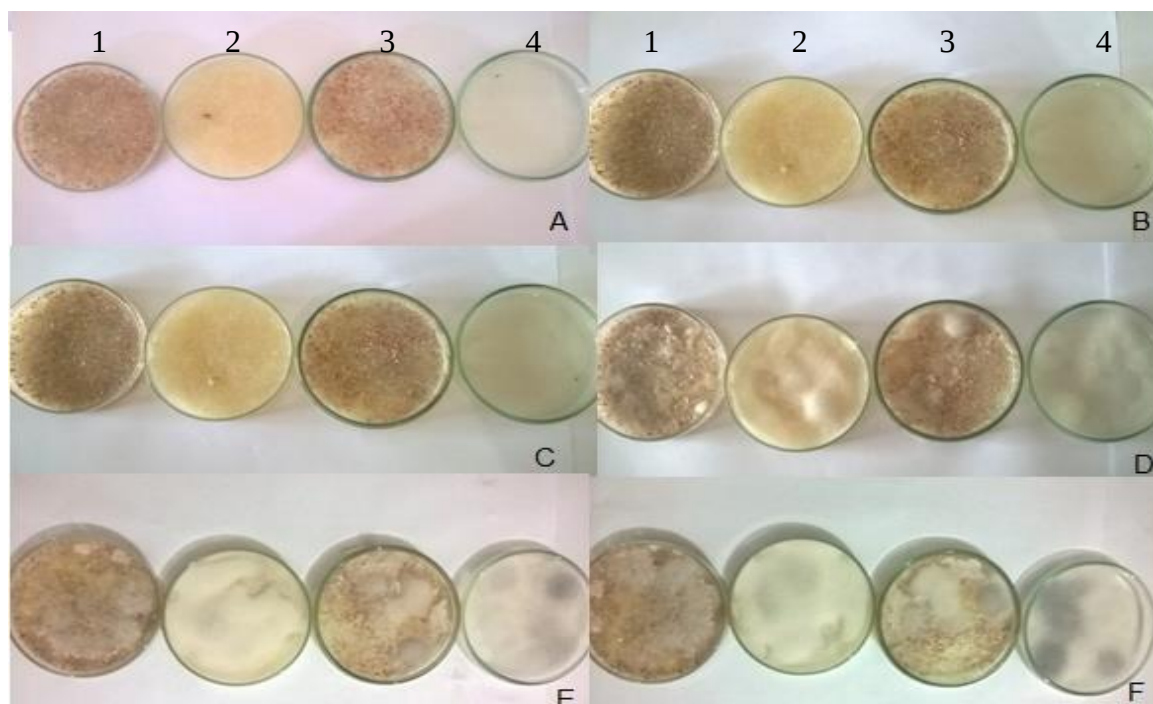


Figura 12– Desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus*, em diferentes tempos e meios de cultura. A- 0 h; B- 08 hs; C- 16 hs; D- 24 hs; E- 32 hs e F- 40 hs. 1- Feijão; 2- Arroz; 3- Arroz e Feijão e 4- PDA

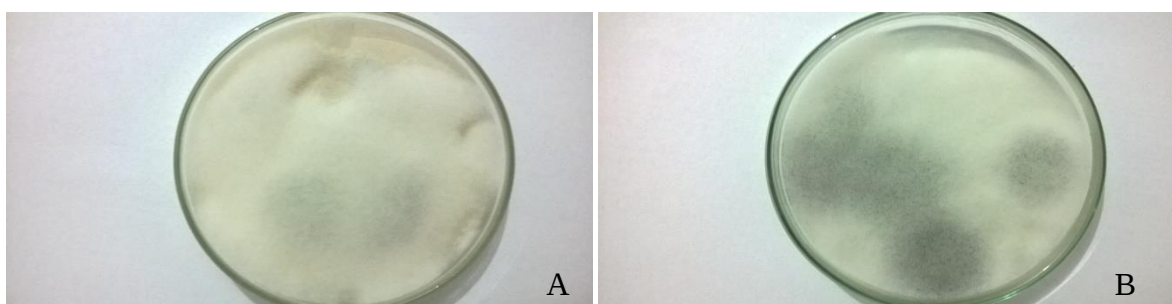


Figura 13– Desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus* em meio PDA e Arroz (A) e somente meio PDA (B)

Cruz (2014) pretendia em seu trabalho determinar o melhor meio de cultura para obter um crescimento e esporulação abundantes de *R. oligosporus* e utilizaram PDA (*Potato*

Dextrose Agar) e MEA (*Malt Extract Agar*). O resultado obtido foi o mesmo observado por Ruiz-Terán e Owens (1996) e Nout (2005) que referem que o meio PDA permite crescimento abundante do micélio, em virtude de ser um meio mais rico. Por outro lado, o meio MEA sendo um meio menos rico favoreceu a esporulação.

Em seu estudo, Miyaoka (2012) fermentou grão de soja com diferentes substratos, onde pôde-se notar que os melhores resultados foram obtidos com o substrato misto de arroz e soja.

Em 1974, Rusmini e Djien, descreveram um método de crescimento de *Rhizopus oligosporus* em arroz cozido, como o inóculo para a fermentação de soja em *tempeh*. Os resultados foram satisfatórios no que diz respeito à fermentação, sendo que os esporos sobreviveram melhor à baixa temperatura e umidade intermediária. A atividade do inóculo não diminuiu quando armazenada seca, durante um ano à 4 °C.

Os cálculos da quantidade de células do inóculo foram efetuados tendo em conta que o volume de suspensão na câmara de Neubayer é de 0,1 mm³. Após observação em microscópio e utilização da equação, o resultado para a contagem de esporos foi de 10⁶ células/mL. Sabendo-se disto, foram inoculados 20 mL da suspensão de esporos em 100 g de arroz triturado e esterilizado.

A fermentação dos *tempehs* monitorados ao longo do tempo foi desenvolvida de forma gradativa nos grãos. Nas primeiras 8 horas, não houve desenvolvimento observado de forma visual, nos dois *tempehs*. Porém, a partir das 12 horas, o TF apresentou formação de micélios e nas 16 horas no TFS.

Os *tempehs* foram considerados já prontos, com fermentação completa, onde todos os grãos se apresentavam envolvidos no micélio, com 24 horas para TF e 30 horas para TFS (Figura 14).

Segundo Naia (2015), a fermentação da soja na fabricação do *tempeh* exige cerca de 20 horas para ser realizada, tempo esse que pode variar conforme a concentração do inóculo. Inóculos com baixa concentração de células viáveis eleva o tempo de fermentação e proporciona a contaminação por outros microrganismos, outrora, a alta concentração de esporos no inóculo afeta a formação de compostos que formam o sabor do *tempeh* devido a rápida fermentação.



Figura 14- Fermentação inicial e final dos *tempehs*. Inicial: A- *Tempeh* de feijão e soja e B- *Tempeh* de feijão. Final: C- *Tempeh* de feijão e soja e D- *Tempeh* de feijão.

O *tempeh* tradicional se apresenta de forma firme, consistência macia, totalmente envolvido pelo micélio de cor branca. O *tempeh* que apresentou aparência similar ao produto tradicional foi o TF, devido a uniformidade do micélio e pelo tempo de fermentação.

A fermentação do TFS foi considerada insatisfatória. Isso por não ter apresentado boa consistência (sem formação de bolo) e uniformidade do micélio (envolvimento do fungo em todos os grãos). Houve formações de pontos pretos, o que indica a ultrapassagem do tempo de fermentação. Este tempo, apesar de ter sido ultrapassado, não apresentou formação de micélio branco característico. A diferença entre as matérias primas dos *tempehs* proporcias tempos de fermentação diferentes, os polissacarídeos do feijão possuem peso molecular maior que as da soja e provavelmente são mais difíceis de serem hidrolisados pelas enzimas produzidas pelo *Rhizopus oligosporus* quando são apresentados juntos. Devido a isto, as amostras TSF foram descartadas de algumas análises posteriores.

Steinkraus (1996) relatou que nas primeiras horas após a inoculação ocorre germinação de esporos, tornando o crescimento do fungo mais lento durante as primeiras horas. Posteriormente, entre 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 controle dos parâmetros de temperatura, umidade e oxigênio são determinantes na obtenção do *tempeh*.

Temperatura baixa resulta em um crescimento lento do fungo enquanto temperatura alta inibe o crescimento. Elevada umidade relativa favorece o crescimento de bactérias, mas

umidade muito baixa inibe completamente o crescimento micelial e favorece a esporulação prematura (o que torna o produto mais escuro e, por isso, menos atrativo para o consumidor).

A mesma situação pode ser observada na demanda de oxigênio, sendo insuficiente inibe o crescimento do fungo e o excesso favorece uma esporulação prematura (STEINKRAUS, 1996).

Pode-se observar que a soja é mais facilmente fermentada em comparação ao feijão, segundo Miyaoka (2012), os carboidratos da soja (estaquiose, rafinose e sacarose) não são as únicas fontes de carbono consumidas pelo *Rhizopus oligosporus*. Análises com microscópio eletrônico de varredura indicam que enzimas são secretadas pelo fungo para facilitar a degradação química dos compostos do substrato. O crescimento microbiano pode ser acompanhado pelo consumo dos açúcares simples como glicose, frutose, maltose e xilose (SORENSEN; HESSELTINE, 1966).

Parte dos carboidratos do feijão está na forma de amido e fibra, sendo que 17-23% são compostos basicamente por pectina, celulose e hemicelulose. O feijão possui polissacarídeos com peso molecular maior que os de soja e provavelmente são mais difíceis de serem hidrolisados pelas enzimas produzidas pelo *Rhizopus oligosporus*. Quando se misturam matérias-primas diferentes, as enzimas amilolíticas têm dificuldades de atuar e a velocidade de fermentação é alterada, diferentemente quando se utiliza uma única matéria prima (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2009).

O fungo *Rhizopus oligosporus* possui alta atividade proteolítica, importante para seu crescimento em substrato protéico, mas baixa atividade de enzimas amilase e pectinase (WAGENKNECHT, 1961; WANG; HESSELTINE, 1965).

4 CONCLUSÃO

A fabricação do *tempeh* utilizando o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Pérola sem tegumento é viável quando se utilizam 10^6 esporos por mL na inoculação, por 24 horas a temperatura de 30 °C. O uso de misturas de feijão e soja não se mostrou adequada para a etapa de fermentação. O *tempeh* poderá ser uma alternativa interessante para o aproveitamento de grãos de baixo valor comercial e agregação de valor ao feijão.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Goiás e à EMBRAPA Arroz e Feijão pelo apoio científico, e utilização do Laboratório de Grãos e Subprodutos e à Faculdade Metropolitana de Anápolis.

REFERÊNCIAS

ABU-GHANNAM, N. Modelling textural changes during the hydration process of red beans. **Journal of Food Engineering**, v. 38, p. 341 – 352, 1998.

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.

BECKERT, O. P.; MIGUEL, M. H.; MARCOS FILHO, J. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Scientia Agrícola**, v. 57, n.4, p 671-675, 2000.

CAVARIANI, C.; TOLEDO, M. Z.; RODELLA, R. A.; NETO, J. B. F.; NAKAGAWA, J. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 1, p. 030-039, 2009.

COUTINHO, M. R.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; PARAÍSO, P. R.; ANDRADE, C. M. G.; OMOTO, E. S.; JORGE, R. M. M.; FILHO, R. M.; JORGE, L. M. M. Application of the Hsu model to soybean grain hydration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2010

CRUZ, IVONE LOPES. **Desenvolvimento de um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a produção de tempeh em pequena escala a partir de diferentes leguminosas**. 2014. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia alimentar. Universidade de Lisboa, Lisboa- Portugal

FRACASSO, A. F; **Cinética De Hidratação De Soja: Estudo Comparativo Entre Soja Transgênica E Convencional**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do setor de Tecnologia. Curitiba, 2011

HESELTIME, C.W. and. WANG, H.L 1980. The importance of traditional fermented foods. **Bioscience**, 30: 402-404

KRISNAWATI, A. and MUCHLISH, M.A.P. Selection of soybean genotypes by seed size and its prospects for industrial raw material in Indonesia. **Food Science**. 2015p.355 – 363. The First International Symposium on Food and Agro-biodiversity

- LIMÓN, R.I., E. PENHAS., M. I. TORINO., C. MARTÍNEZ-VILLALUENGA., M. DUEÑAS, J. FRIAS. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. **Food Chemistry**.2015 p. 343–352.
- MIYAOKA, Mitiyo Fukuda. **Avaliação do Potencial dos Fungos do gênero *Rhizopus Spp* na Produção de Substâncias Bioativas com Ação Antioxidante Utilizando Diferentes Substratos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 2012.
- NAIA, I. I. P. **Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de *tempeh* de soja**. 2015. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- NAKAJIMA, N., NOZAKI, N. AND ISHIHARA, K., ISHIKAWA, A. AND TSUJI, A. Analysis of Isoflavone Content in *Tempeh*, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched *Tempeh*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005. Vol. 100, No. 6, 685–687.
- NOUT, M.J.R. AND J.L. KIERS, 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, 98: 789-805.
- OLIVO, F.; TUNES, L. M.; OLIVO, M.; BERTAN, I; PESKE, S. **Espessura do Tegumento e Qualidade Física e Fisiológica de Sementes de Feijão**. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.1, p. 89 - 88 janeiro/março de 2011
- PENHA, A.O., I. C. B.FONSECA, J.M. MANDARINO, V.T. BENASSI. B.CEPPA. **A Soja Como Alimento: Valor Nutricional, Benefícios Para A Saúde E Cultivo Orgânico**. Curitiba, v. 25, n. 1, p. 91-102, jan./jun. 2007
- RESENDE, O; CORRÊA, P. C. Modelagem matemática do processo de hidratação de sementes de feijão. **Acta Sci. Agron**. Maringá, v. 29, n. 3, p. 373-378, 2007
- RUIZ-TERAN, F. and OWENS, J.D. (1996) Chemical and enzymic changes during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 71, 523–530
- RUSMINI, SIMON and DJIEN SWAN, 1974. Rice-Grown *Rhizopus oligosporus* Inoculum for Tempeh Fermentation. *Applied environmental microbiology*, 28. Page 347-350. <http://aem.asm.org/content/28/3/347.full.pdf>
- SHIGA, T. M.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 76, p. 100-109, 2009.
- SORENSEN, W.G.; HESSELTINE, C.W. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia*, v. 58, p.681-689, 1966.

STEINKRAUS, K. H. (1996). **Handbook of Indigenous Fermented Foods**, Second edition. Marcel Dekker, New York.

TOLEDO, T. C. F. and CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Chemical and nutritional evaluation of Carioca beans (*Phaseolus vulgaris L.*) cooked by different methods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. Campinas, 28(2): 355-360, abr.-jun.

ZHANG, M.; YOSHIYAMA, M.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWA, Y.; YOSHIOKA, T.; ESASHI, Y. Aging of soybean seeds in relation to metabolism at different relative humidities. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 7, p. 1189-1195, 1995.

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO MICROBIOLOGICAMENTE SEGURA DE TEMPEH DE FEIJÃO COMUM (*PHASEOLUS VULGARIS*)

RESUMO

Cuidados higiênico-sanitários no processamento de alimentos estão entre as principais medidas preventivas de contaminação microbiológica e isso tem sido motivo de preocupação por parte dos órgãos de inspeção e saúde pública. Todo alimento deve ter sua qualidade microbiológica garantida através de testes que comprovem sua inocuidade, por isso este trabalho tem como objetivo estabelecer o procedimento de preparo do *tempeh*, obedecendo à legislação em relação a padrões microbiológicos de contaminação. Foram confeccionados *tempehs* de feijão sem casca em diferentes proporções: 50% feijão/50% soja (TFS) e 100% feijão (TF). Os grãos de feijão carioca cv Pérola foram armazenados e utilizados apresentando-se mais escurecidos no momento do estudo, sendo indicativo de envelhecimento e soja convencional cv BRS 284. Primeiramente o *tempeh* foi confeccionado de forma tradicional da Indonésia, onde a maceração é somente em água esterilizada e o tratamento térmico consiste em fervura por 30 min. Posteriormente o *tempeh*, foi produzido com modificação do método tradicional, utilizando vinagre de álcool comercial contendo ácido acético (5%) na água da maceração, sendo 20 mL para cada litro de água esterilizada. Na fase do tratamento térmico os grãos foram acondicionados em béquer e tampados com papel laminado e esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C. Foi realizada avaliação microbiológica do *tempeh* pronto, contemplando análises de Coliformes a 45 °C, *Estafilococos* coagulase positiva e *Salmonella* sp e avaliado de acordo com Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa. No método tradicional, pôde-se observar que as bactérias se desenvolveram acima do permitido pela legislação. Os resultados na placa foram incontáveis, até a diluição 10^{-4} , para todos os *tempehs*, apesar de todos os requisitos de boas práticas adotadas. Já no método modificado, onde foram acrescentados o ácido acético e a autoclavagem, não houve nenhum desenvolvimento de colônias típicas de bactérias. A autoclavagem e acidificação do meio são procedimentos eficientes na eliminação de agentes contaminantes do *tempeh*. O método modificado pode ser utilizado pela indústria a fim de garantir a qualidade sanitária do *tempeh* e ofertar ao consumidor alimento seguro.

Palavras-chave: contaminação, qualidade microbiológica, autoclavagem, acidificação.

MICROBIOLOGICALLY SAFE PRODUCTION OF COMMON BEAN *TEMPEH* (PHASEOLUS VULGARIS)

ABSTRACT

Hygienic-sanitary care in food processing are among the main preventive measures of microbiological contamination and this has been a cause of concern on the part of inspection bodies and public health. All food must have its microbiological quality guaranteed through tests that prove its innocuity, so this work aims to establish the preparation procedure of tempeh, obeying the legislation in relation to microbiological standards of contamination. The bean pea beans were stored and used to be darkened at the time of the study, in order to evaluate the behavior of the bean pea beans in different proportions: 50% bean / 50% soybean (TFS) and 100% Being indicative of aging and conventional soybean cv BRS 284. First the tempeh was made in a traditional Indonesian way, where the maceration is only in sterilized water and the heat treatment consists of boiling for 30 min. After the tempeh, it was produced with modification of the traditional method, using commercial alcohol vinegar containing acetic acid (5%) in the maceration water, with 20 mL for each liter of sterilized water. At the heat treatment stage the beans were packed in beakers and capped with laminated paper and autoclaved for 15 min at 121 ° C. A microbiological evaluation of prepared tempeh was carried out, considering coliform analyzes at 45 ° C, coagulase positive *Staphylococcus* and *Salmonella* sp and evaluated according to the Technical Regulation on Microbiological Standards for Foods, RDC No. 12 of January 2, 2001 - Anvisa. In the traditional method, it has been observed that the bacteria have developed above that allowed by the legislation. The results on the plate were uncountable, up to the 10⁻⁴ dilution, for all tempehs, despite all good practice requirements adopted. In the modified method, where acetic acid and autoclaving were added, there was no development of colonies typical of bacteria. The autoclaving and acidification of the medium are efficient procedures in the elimination of pollutants from tempeh. The modified method can be used by industry to ensure the sanitary quality of tempeh and to provide the consumer with safe food.

Keywords: contamination, microbiological quality, autoclaving, acidification.

1 INTRODUÇÃO

O *tempeh* é um alimento fermentado, originalmente da Indonésia, produzido pela fermentação da soja pelo *Rhizopus oligosporus*. Este fungo é naturalmente obtido a partir das folhas de hibisco usadas para envolver a soja assim como as folhas de bananeiras são utilizadas como embalagem primária. Mesmo com a globalização do *tempeh* com sua industrialização, as etapas de produção ainda são, em maioria, as mesmas da produção caseira (NAIA, 2015).

Este processo sofre contaminações com bactérias, fungos e leveduras que se desenvolvem durante a fermentação. A própria matéria-prima possui bactérias, incluindo *Lactobacillus casei*, Enterococci; Staphylococci; Streptococci; Bacilli; *Enterobacter*, *Klebsiella*, entre outros coliformes (HUTKINS, 2006). Por isso, cuidados higiênico-sanitários no processamento de alimentos estão entre as principais medidas preventivas de contaminação microbiológica. Em 2012, 89 casos de gastroenterite causadas por salmonela na Carolina do Norte, foram associados ao consumo de *tempeh* não pasteurizado (GRIESE, 2013).

O grupo dos coliformes totais envolve bactérias originárias do trato gastrointestinal que fermentam a lactose produzindo gás. Os coliformes fecais são considerados como coliformes totais e neste grupo são incluídas a *E. coli*, considerada melhor indicadora de contaminação fecal (GEUS; LIMA, 2006).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* possui espécies frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, causa vários tipos de intoxicações e pode ser encontrado em várias partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Em alimentos destaca-se *Staphylococcus aureus*, que é coagulase positiva e possui a capacidade de coagular o plasma sanguíneo. As toxinas produzidas pelo *Staphylococcus* apresentam propriedade de termorresistência, o que constitui ponto crucial em controle de qualidade de alimentos.

As salmonelas são micro-organismos mesófilos, com ótimo crescimento no intervalo de 35 à 37 °C. O pH mínimo para o desenvolvimento varia com o sorotipo, temperatura de incubação, tipo de ácido, composição do substrato e tensão de oxigênio, mas, de modo geral, em valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0, as salmonelas são lentamente destruídas. (BRASIL, 1990; FDA, 1998; GIOMBELLI e SILVA, 2001).

Como todo alimento precisa ser seguro, o *tempeh* de feijão, por ser um alimento inovador, de importância econômica e contribuição científica, necessita de um método de

produção que assegure sua qualidade microbiológica. O objetivo deste trabalho é avaliar o *tempeh* de feijão cv. Pérola e *tempeh* misto, 50%feijão/50% soja, produzidos por duas metodologias diferentes, verificando se essas condições atendem às recomendações da RDC Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 – ANVISA, apesar desta legislação não contemplar especificamente o produto *tempeh*, porém toma-se como padrão microbiológico alimento fermentado similar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os grãos de feijão carioca cv Pérola, considerada padrão comercial, e de soja convencional cv BRS284 foram multiplicados na safra 2015/2015 na Fazenda Capivara, na Embrapa Arroz e Feijão. Os grãos foram armazenados em temperatura ambiente e utilizados após 18 meses da colheita. Os grãos de feijão carioca apresentaram-se mais escurecidos no momento do estudo, o que é um indicativo de envelhecimento de grão.

A cepa de *Rhizopus oligosporus* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, em Campinas (SP). A cepa foi desenvolvida em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e arroz em placas de Petri por 48 hs à 30 °C em estufa. Após a proliferação do fungo na placa, o mesmo foi raspado e transferido para um Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada estéril, formando assim a suspensão de esporos. A contagem de esporos desta suspensão foi realizada na câmara de Neubayer, obtendo resultado de 10^6 células /mL, sendo esta concentração suficiente para a fermentação dos grãos (observados em testes prévios). O inóculo foi produzido com arroz triturado e esterilizado, utilizando a cepa já desenvolvida em meio de cultura.

Para o estudo, foram produzidos *tempehs* de feijão sem tegumento em diferentes proporções: 50% feijão/50% soja (TFS) e 100% feijão (TF). O tegumento foi retirado do feijão e da soja, pois a casca é uma barreira física para a fermentação. Todas as boas práticas de fabricação foram obedecidas.

2.1 Método Tradicional

Primeiramente, o *tempeh* foi confeccionado de forma tradicional da Indonésia, para ambos os grãos, seguindo as etapas demonstradas na Figura 15, descrito por Kuswanto (2004). Utilizaram-se 200 g de cada leguminosa, a limpeza foi em água corrente, na hidratação/maceração os grãos foram submersos em 1000 mL de água (1000 mL/Erlenmeyer

para soja e para feijão) somente esterilizada, temperatura ambiente, 16 horas para a soja e 20 horas para o feijão. Para a retirada da água superficial aos grãos foram escorridos e secos manualmente em papel toalha. A retirada do tegumento foi realizada manualmente. O tratamento térmico consiste em fervura por 30 min em panela aberta. Ambos foram drenados e arrefecidos até temperatura ambiente. As leguminosas foram colocadas em sacos plásticos de polietileno, em seguida, inoculou-se 20 g, em cada saco o inóculo produzido com a farinha de arroz. Após o acondicionamento, os sacos foram selados e pequenos furos foram feitos com um garfo de modo a permitir o contato com oxigênio da cultura de *Rhizopus oligosporus*. Por fim, os grãos foram incubados em estufa à 30 °C e monitorados a fim de verificar visualmente o desenvolvimento do micélio. O tempo de fermentação para as amostras foi determinado previamente em outros experimentos, sendo o tempo ideal para TF de 24 h e o TFS de 30 hs. O *tempeh* depois de pronto foi congelado para futuras análises.

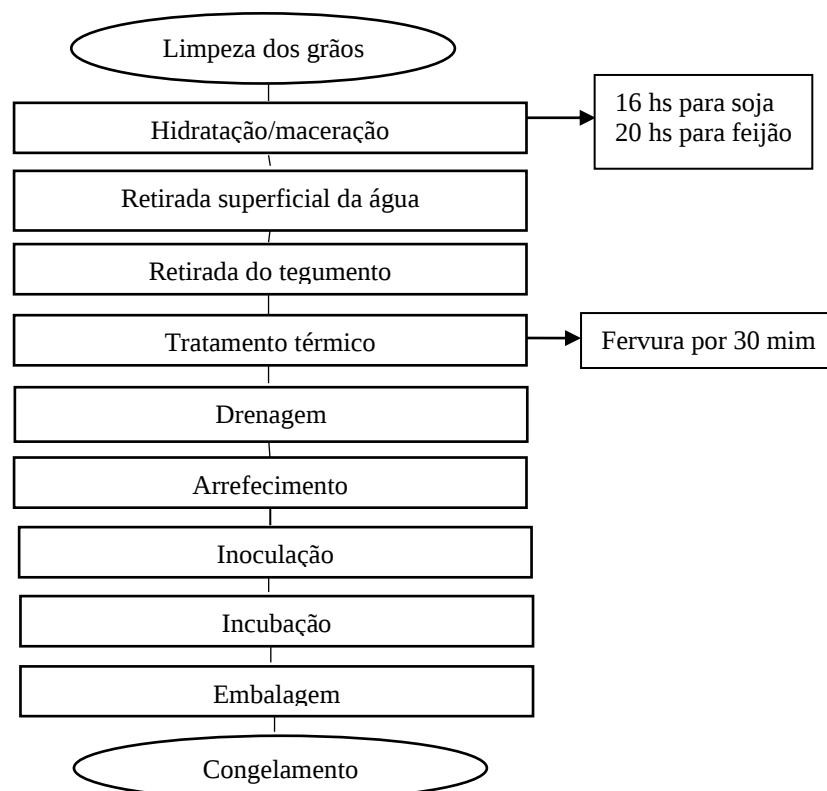


Figura 15. Fluxograma: Etapas da fabricação tradicional do *tempeh*

2.2 Método Modificado

Em paralelo, o *tempeh* foi produzido com modificação do método tradicional, conforme os autores: Starzynska-Janiszewska et al., (2013) e fluxograma da Figura 16. Neste método, foi introduzido vinagre de álcool comercial contendo ácido acético (5%) na água da

maceração, sendo 20 mL para cada litro de água esterilizada. Na fase do tratamento térmico os grãos foram acondicionados em béquer e tampados com papel laminado e esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C. As etapas posteriores seguiram o método tradicional.

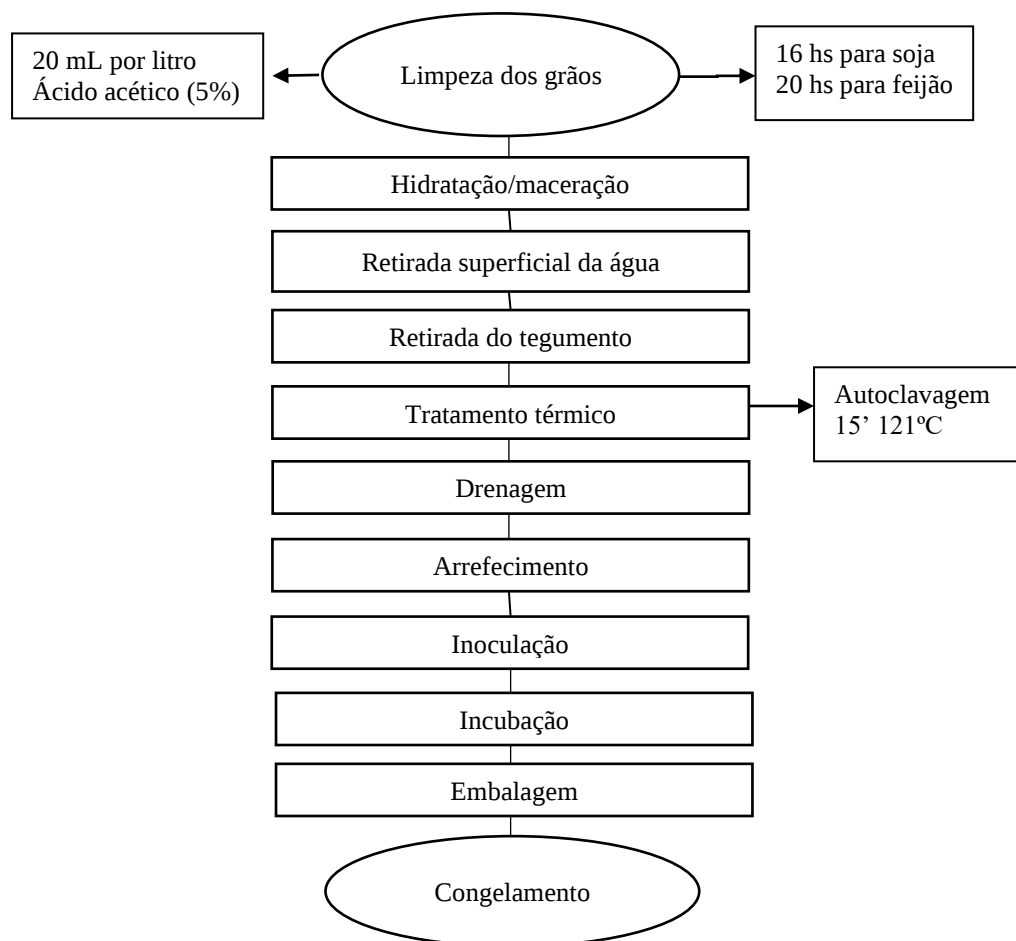


Figura 16. Fluxograma: Etapas da fabricação modificada do *tempeh* de soja ou feijão

2.3 Análises Microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas do *tempeh* pronto, contemplando análises de Coliformes a 45 °C, *Estafilococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp, de acordo com Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa (BRASIL, 2001), demonstrado na Tabela 6. Nesta legislação, não é contemplado especificamente o produto *tempeh*, porém pode-se tomar como padrão microbiológico alimento fermentado similar. Após o descongelamento do produto, por 4 horas em geladeira na embalagem original, foi realizada análise microbiológica em triplicata de maneira asséptica, no Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos, da

Faculdade de Nutrição da UFG – Goiânia – GO e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade Fama – Anápolis GO, a fim de verificar se os métodos poderiam assegurar a qualidade microbiológica do produto. O protocolo microbiológico obedeceu à metodologia estabelecida pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001) e FDA (2002). Para todos os micro-organismos analisados, foi realizado teste controle (incubação do meio de cultura em placa de petri, sem inoculação), para se verificar a inocuidade do mesmo.

Tabela 6. Padrão microbiológico para *tempeh*

Pasta de soja fermentada (missô) e similares, desengordurada ou não	
Coliformes a 45 °C/g	10 ² UFC/g
Estaf.coag.positiva/g	10 ² UFC/g
Salmonella sp/25 g	Ausência em 25 g

Fonte: Adaptado de RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001

Para o preparo das diluições decimais foi retirada uma alíquota de 25 g da amostra e adicionados 225 mL de água peptonada tamponada (0,1%) e homogeneizada em homogeneizador de amostras, tipo stomacher modelo SP-190 – SPLABOR, utilizando sacos plásticos esterilizados próprios para este equipamento. Desta diluição (10⁻¹) foram realizadas as outras diluições seriadas utilizando o mesmo diluente até 10⁻⁴.

2.3.1 Contagem de coliformes totais

Para análise de Coliformes à 45 °C, primeiramente deve-se realizar análise de Coliforme Totais. Para isso, foi distribuído 1,0 mL de cada diluição no centro da placa de Petri e adicionados 15 mL do Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA), incubando as placas invertidas a 35 °C por 48 horas. As características das colônias são vermelhas púrpuras rodeadas por zonas de precipitação dos sais biliares de cor violeta. As colônias típicas foram contadas e calculadas o número de UFC/grama.

Para o teste confirmativo de coliformes totais, foram selecionadas as placas com 10 a 150 colônias e inoculando com alça, 3-5 colônias em Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose, incubando os tubos a 35 °C por 48 horas, observando a presença de gás nos tubos de Durhan.

2.3.2 Contagem de coliformes de origem fecal

A partir das placas de VRBA utilizadas na contagem de Coliformes Totais, foram selecionadas 3-5 colônias típicas, inoculadas no Caldo *Escheria coli* (EC), e incubadas a 45 °C por 24 horas. A partir do Caldo EC foram realizadas as provas bioquímica do IMViC (Indol, vermelho de Metil, Voges-Proskauer e Citrato), transferindo uma alçada para os tubos com Caldo Triptona, e Citrato de Simmons, incubadas a 35 °C por 48 horas e para os tubos com caldo VM-VP (Vermelho de Metila/ Vogel Proskauer), incubados a 35 °C por 5 dias. As colônias típicas foram contadas e calculadas o número de UFC/grama.

2.3.3 Estafilococos coagulase positiva

Foram semeados sobre a superfície do ágar Baird-Parker (BP), 0,1mL de cada diluição da amostra, e incubar as placas invertidas a 35 °C por 30 - 48 horas. As placas com colônias foram contadas e de cada placa selecionada, 3 a 5 colônias foram semeadas em tubos com Brain Heart Infusion (BHI), e incubadas a 35 °C por 24 horas. A partir deste caldo procedeu-se as provas de pesquisa da presença de coagulase, pesquisa da presença da DNase e fermentação anaeróbica da glicose e manitol.

2.3.4 *Salmonella* sp

No pré-enriquecimento foram pesados 25 g da amostra, adicionados 225 mL de água peptonada a 1,0% tamponada e incubados a 35 °C por 24h. No enriquecimento seletivo, pipetaram-se alíquotas de 1mL da cultura pré-enriquecida e transferiu-se para tubos contendo 10mL de Caldo Tetrationato e de Caldo Selenito Cistina. Incubaram-se ambos a 43 °C por 24 horas em banho-maria. No isolamento em ágar seletivo, semeou-se, por estrias, em placas com Agar Salmonella Shigella SS e Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), e incubou-as a 35 °C por 24 horas. No isolamento em meio diferencial:selecionaram-se 3 a 5 colônias típicas das placas com SS e XLD. Semeou-se nos tubos com Ágar Triple Sugar Iron (TSI) e Ágar Motilidade, Indol e H₂S (SIM) e incubou-se a 35 °C por 24 a 30 horas. Para as provas bioquímicas foram realizados os testes de uréase, MIO, Caldo lisina descarboxilase, Caldo Dulcitol, Caldo Lactose, Caldo sacarose, VM-VP, Citrato de Simmons, Caldo triptona e Caldo malonato fenilalanina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação microbiológica das amostras, produzidas por métodos diferentes, se faz necessária para que se possa comparar a efetividade dos métodos contra contaminação por patógenos.

O método tradicional possui algumas etapas que proporcionam o desenvolvimento de micro-organismos, pois não apresenta barreiras que eliminam ou impedem a proliferação de micro-organismos. A qualidade do *tempeh* pode ser afetada devido a contaminações com bactérias, fungos e leveduras que se desenvolvem durante o processo de fermentação (MAZAS; PÉREZ, 2003). A superfície dos feijões crus contém uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas (HUTKINS, 2006). Mazas e Pérez (2003), concluíram que existe uma necessidade de manter um nível alto de práticas sanitárias durante a produção e de refrigerar ou congelar adequadamente o produto uma vez terminada a fermentação.

Já no método modificado, a adição do ácido acético é uma boa alternativa de fabricação uma vez que a maioria das bactérias se desenvolve em pH perto do neutro (OWENS, 2015).

Hutkins (2006), em sua pesquisa afirma que, apesar do limitado metabolismo das proteínas e dos aminoácidos, ocorre uma acumulação de amônia durante a fermentação do *tempeh*, que faz o pH se alterar de 5.0 para acima dos 7.0. Este aumento do pH durante a fermentação fúngica ressalva a importância da acidificação durante a fase de maceração, pois este processo é responsável pela inativação de potenciais patógenos que podem estar presentes na matéria-prima. Bactérias lácticas que podem estar presentes nos grãos, podem impactar diretamente na proliferação e possível formação de toxina de potenciais patógenos e bactérias toxinogênicas no *tempeh* por serem sinérgicas (KUSWANTO, 2004).

Segundo o método descrito por Starzynska-Janiszewska, Stodolak e Mickowska (2013), que autoclavaram os grãos no processo de fabricação de *tempeh*, pode-se afirmar que incluir esta etapa (autoclavagem) e manter as boas práticas durante o processo são eficazes no controle de patógenos. Processos de fabricação de *tempeh* de soja que incluem autoclavagem a 121 °C durante 10min em 0,1 mol L⁻¹ de ácido láctico para obter cotilédones estéreis e acidificados (RUIZ-TERÁN; OWENS, 1996) proporcionam um *tempeh* com boa fermentação e com segurança sanitária. Em 2012, 89 casos de gastroenterite causada por salmonela na Carolina do Norte foram associados ao consumo de *tempeh* de soja. Este fato foi investigado e

descobriu-se que a contaminação advinha do inóculo distribuído internacionalmente. Apesar de não estar claro, a hipótese é que, ao contrário de outros produtos comerciais de *tempeh*, o produto do surto não era pasteurizado e, portanto, patógenos permaneciam no produto final (GRIESE, 2013).

No método tradicional, pôde-se observar que as bactérias se desenvolveram acima do permitido pela legislação. Os resultados na placa foram incontáveis, até a diluição 10^{-4} , para todos os *tempehs*, apesar de todos os requisitos de boas práticas adotadas.

Já no método modificado, onde foram acrescentados o ácido acético e a autoclavagem, não houve nenhum desenvolvimento de colônias típicas de bactérias. Houve desenvolvimento de fungos com as mesmas características do *Rhizopus oligosporus* nos meios de cultura, estes advindos do próprio inóculo, porém não foi identificado, sendo necessária análise de identificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, em português Reação em Cadeia da Polimerase) para confirmar se estes fungos eram realmente *Rhizopus oligosporus* (FENG, 2006). Não houve proliferação na placa controle.

Contudo, após os procedimentos realizados, os resultados das contaminações microbiológicas dos *tempehs* referentes aos diferentes métodos, tradicional e modificado, estão expressos na Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente.

Tabela 7. Resultados das análises microbiológicas de *tempeh* produzidos pelo método tradicional

TFS (50% feijão/soja)		TS (100% feijão)	
Coliformes Totais	$\geq 10^4$ UFC/g	Coliformes Totais	$\geq 10^4$ UFC/g
Coliformes Fecais	$\geq 10^4$ UFC/g	Coliformes Fecais	$\geq 10^4$ UFC/g
Estafilococos coagulase positiva	$\geq 10^4$ UFC/g	Estafilococos coagulase positiva	$\geq 10^4$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25 g	<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25 g

Tabela 8. Resultados das análises microbiológicas de *tempeh* produzidos pelo método modificado

TFS (50% feijão/soja)		TS (100% feijão)	
Coliformes Totais	≤ 10 UFC	Coliformes Totais	≤ 10 UFC
Coliformes Fecais	≤ 10 UFC	Coliformes Fecais	≤ 10 UFC
Estafilococos coagulase positiva	≤ 10 UFC	Estafilococos coagulase positiva	≤ 10 UFC
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25 g	<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25 g

De acordo com Kuswanto (2004), existem vários métodos para produzir o *tempeh* (Quadro 1) e essa variação se dá pela região em que é produzida, porém algumas etapas são comuns entre os métodos: lavagem, descasque, fervura, drenagem e incubação. Pode-se

observar que alguns métodos empregam a fervura dos grãos mais de uma vez, isso porque a contaminação do grão é facilitada pela natureza de seus componentes.

Diferentes Métodos de Fabricação de <i>Tempeh</i>							
Etapa	1	2	3	4	5	6	7
1	Descascar	Ferver	Demolha	Ferver	Ferver	Demolha	Demolha
2	Lavar	Demolha	Descascar	Demolha	Arrefecer	Ferver	Ferver
3	Ferver	Descascar	Lavar	Descascar	Descascar	Lavar	Arrefecer
4	Escorrer	Lavar	Ferver	Lavar	Lavar	Ferver	Descascar
5	Arrefecer	Escorrer	Escorrer	Ferver	Demolha	Arrefecer	Lavar
6	Inocular	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Ferver	Descascar	Demolha
7	Embalar	Embalar	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Lavar	Ferver
8	Incubar	Incubar	Embalar	Inocular	Arrefecer	Escorrer	Escorrer
9			Incubar	Embalar	Inocular	Incubar	Arrefecer
10				Incubar	Embalar	Embalar	Inocular
11					Incubar	Incubar	Embalar
12							Incubar

Quadro1- Alguns métodos tradicionais de preparação comercial de *tempeh* a partir de soja

Fonte: KUSWANTO, 2004

Todas essas metodologias de fabricação do *tempeh* possuem em suas etapas variáveis que podem contribuir para contaminação microbiológica, demonstrando a necessidade de investigação para que se conheça a eficiência do método em relação ao combate à patógenos.

4. CONCLUSÃO

A autoclavagem à 121°C por 15 minutos e acidificação com ácido acético a 5% na fase de maceração são metodologias eficientes no controle de agentes contaminantes do *tempeh*. O método modificado pode ser utilizado pela indústria a fim de garantir a qualidade sanitária do *tempeh* e proporcionar ao consumidor alimento seguro. Vale salientar que as boas práticas de fabricação também contribuem para que bactérias patogênicas não estejam presentes no produto, assim como seu armazenamento e temperatura de estocagem.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Goiás e à EMBRAPA Arroz e Feijão pelo apoio científico, e utilização do Laboratório de Grãos e Subprodutos e à Faculdade Metropolitana de Anápolis.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA**: (aprovado Decreto n.30.691, de 29/03/52; alterado pelo Decreto n. 1.255 de 25/06/62). Brasília, 1980. 40p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12 de 2 de janeiro de 2001. **Aprovar o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília: DF: ANVISA, 2001

APHA. **American Public Health Association. Compendium of Methods For the Microbiological Examination For Foods**. (F.P. Downes and K. Ito, eds) 4. ed. 676p. American Public Health Association, Washington D.C, 2001.

FENG, X.M., PASSOTH, V., EKLUND-JONSSON, C., ALMINGER, M. AND SCHNÜRER, J., 2006. Rhizopus oligosporus and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation - Nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. **Food Microbiology**, doi:10.1016/j.fm.2006.06.007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual. 8.ed. Arlington**: AOAC, 1998, p.29-34.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Enumeration of *Escherichia coli* and the **Coliform Bacteria**. Washington, 2002. FDA Bacteriological Analytical Manual.

GEUS, J.A.M.; LIMA, I.A.L.; ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. **II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais**, 14 e 15 de agosto de 2006.

GIOMBELLI, A.; SILVA, N.L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes in natura. **Higiene Alimentar**, v.15, n.87, p.63-67, 2001.

GRIESE SE, FLEISCHAUER AT, MACFARQUHAR JK, MOORE Z, HARRELSON C, VALIANI A, et al., Gastroenteritis Outbreak Associated with Unpasteurized *Tempeh*, North Carolina, USA. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1514-1517.
<https://dx.doi.org/10.3201/eid1909.130334>

NAIA, I. I. P. **Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de *tempeh* de soja**. 2015. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

STARZYNSKA-JANISZEWSKA, Anna; Bozena STODOLAK and Barbara MICKOWSKA. Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of *tempeh* obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Sci Food Agric** 2013; 94: 359–366.

KUSWANTO, Kapti Rahayu. **Industrialization of Tempe Fermentation**- Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia (2004)

MAZAS, N., PÉREZ, M., (2003). *Estudio de la microbiota contaminante en el Tempeh*, Alimentaria, Revista de tecnología e higiene de los alimentos, 345, 129-132.

HUTKINS, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods – Fermentation of Food in Orient*, 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, 436-443.

OWENS, J. D, ASTUTI, M and KUSWANTO, K.R. **Tempe and Related Products**. Memoirs of the Tokyo University of Agriculture 2015.

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

RUIZ-TERAN, F. and OWENS, J.D. (1996) Chemical and enzymic changes during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 71, 523–530.

CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *TEMPEHS* DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) E *TEMPEH* DE SOJA AMARELA (*Glycine max* L.)

RESUMO

O *tempeh* é um alimento com papel importante na alimentação de vegetarianos, veganos e daqueles que o apreciam. Este trabalho foi desenvolvido para determinar e relacionar as propriedades nutricionais, teor de substâncias bioativas, cor e textura instrumental dos *tempehs* produzidos a partir de grãos de feijão carioca e de soja convencional. Foram confeccionados *tempehs* de feijão sem casca, armazenados e escurecidos, em diferentes proporções: 50% feijão/50% soja (TFS), 100% feijão (TF) e as amostras comerciais de 100% soja (TS) foram adquiridas em Rezende-RJ. Foram realizadas análises de umidade, cinzas, atividade de água, pH, acidez titulável, extrato etéreo, proteína bruta, fibras, carboidratos, valor energético, minerais, vitamina B₁₂, atividade antioxidante, taninos, oligossacarídeos, cor e textura instrumentais. Nos resultados, entre TF e TS onde houve diferença significativa principalmente em lipídios (1.555%), proteínas (260%) e carboidratos (521%). O conteúdo de fibras totais de TF é 34% menor que TS. Destaca-se o conteúdo de molibdênio, ultrapassando a recomendação diária em todas as amostras, TS apresenta-se com a maior concentração de minerais, seguido pelo TFS e TF. A capacidade antioxidante do TF (14,77%) e TS (11,28%) no método DPPH, no método ABTS, TF (31,62%) e TS (48,89%) apresentando as amostras capacidade antioxidante relevante. Para o teor de vitamina B₁₂, TF (0,38 µg/100 g) e TS (0,42 µg/100 g), apresentam-se baixo, já que os valores de literatura demonstram valores maiores, perda provável durante o tratamento térmico do *tempeh*. Não houve diferença significativa em relação à coesividade, mastigabilidade e resistência das amostras. O brilho do TS é 1543% maior que TF, provavelmente devido ao maior teor de gordura presente na soja. Já a* do TS possui tonalidade mais aproximada ao verde que TF e o TF apresentou valor de b* maior que TS. Pode-se considerar o *tempeh* de feijão comum, um alimento com valor considerável de proteína, alto valor de carboidrato, baixo teor de lipídios, bom valor de fibras e alimento com capacidade antioxidante relevante. A recomendação do consumo de *tempeh* deve ser baseada em estudos científicos que demonstrem seus efeitos benéficos à saúde.

Palavras-chave: composição centesimal, capacidade antioxidante, cianocobalamina, cor, textura.

NUTRITIONAL CHARACTERIZATION AND BIOACTIVE CHARACTERISTICS OF TEMPERATUS COMPOUNDS OF CARIOCA BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND YELLOW SOYBEAN TEMPEH (*Glycine max* L.)

ABSTRACT

Tempeh is a food with an important role in the diet of vegetarians, vegans and those who appreciate it. This work was developed to determine and to relate the nutritional properties, content of bioactive substances, color and instrumental texture of the tempehs produced from carioca beans and conventional soybean. 50% soybean / 50% soybean (TFS), 100% soybean (TF) and commercial samples of 100% soybean (TS) were obtained from Rezende-RJ . Analyzes of moisture, ash, water activity, pH, titratable acidity, ethereal extract, crude protein, fiber, carbohydrates, energy, minerals, vitamin B12, antioxidant activity, tannins, oligosaccharides, color and textures were performed. In the results, between TF and TS where there was a significant difference mainly in lipids (1,555%), proteins (260%) and carbohydrates (521%). The total fiber content of TF is 34% smaller than TS. The content of molybdenum is outstanding, exceeding the daily recommendation in all samples, TS presents with the highest concentration of minerals, followed by TFS and TF. The antioxyd ability of TF (14.77%) and TS (11.28%) in the DPPH method, in the ABTS, TF (31.62%) and TS (48.89%) method presented the relevant antioxidant capacity samples. For the vitamin B12 content, TF (0.38 µg / 100 g) and TS (0.42 µg / 100 g) were low, as the literature values showed higher values, a probable loss during the heat treatment Of tempeh. There was no significant difference in relation to the cohesiveness, chewing and resistance of the samples. The brightness of TS is 1543% greater than TF, probably due to the higher fat content in soybean. Already the * of the TS has a shade closer to the green than TF and the TF has a value of b * greater than TS. One can consider common bean tempeh, a food with considerable protein value, high carbohydrate value, low lipid content, good fiber value and food with relevant antioxidant capacity. The recommended consumption of tempeh should be based on scientific studies demonstrating its beneficial effects on health.

Key words: centesimal composition, antioxidant capacity, cyanocobalamin, color, texture.

1 INTRODUÇÃO

A busca por hábitos de consumo mais saudáveis, produtos funcionais e saborosos vêm aumentando ao longo do tempo, podendo ser destacados os alimentos fermentados que desempenham papel importante neste cenário (CRUZ, 2014).

O *tempeh* é um alimento de fermentação sólida, onde o fungo *Rhizopus oligosporus* desempenha papel importante na composição nutricional deste alimento, reduzindo fatores antinutricionais, produzindo vitaminas, compostos bioativos, enzimas e tornando macronutrientes mais biodisponíveis (JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Tradicionalmente o *tempeh* é produzido com soja, porém pode ser produzido com outros substratos, não sendo comum, no entanto, há um interesse no *tempeh* alternativo com ervilhas, feijão, milho, arroz, lentilha e cevada (KRISNAWATI, 2015). Devido o Brasil ser um detentor de tecnologias e grande produtor de feijão, o desenvolvimento de *tempeh* à base de feijão torna-se atrativo tanto para a indústria quanto para os consumidores.

O feijão possui alto teor de fibras, auxiliam na proteção contra o câncer de mama, diminuição do risco de constipação, doenças coronárias e evitam o aumento dos níveis de glicose (SOARES et al., 2008).

Pesquisas que desenvolvem novos produtos alimentícios exigem uma caracterização nutricional para que se possam identificar características benéficas, a fim de promover melhorias para a população, de forma que a inovação traga desenvolvimento econômico, nutricional e ambiental.

Contudo, este trabalho foi desenvolvido para determinar e relacionar as propriedades nutricionais e teor de substâncias bioativas dos *tempehs* produzidos a partir de grãos de feijão comum carioca cv. Pérola e de soja;

2 MATERIAL E METODOS

Os *tempehs* utilizados foram produzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade Metropolitana de Anápolis, Anápolis GO. Foram produzidos *tempehs* de feijão comum cv. Pérola, sem casca em diferentes proporções: 50% feijão/soja (TFS) e 100% feijão (TF) e o *tempeh* comercial de 100% soja (TS), foi adquirido de empresa em Rezende RJ.

Depois de elaborados os *tempehs* foram liofilizados e as análises realizadas no Laboratório de Grãos e Subprodutos da Embrapa Arroz e Feijão, localizado em Santo Antônio

de Goiás, GO. Todas as análises foram realizadas em triplicata, salvaguarda de fibras e conforme métodos descritos nas normas da AOAC (1997).

2.1 Métodos da Análise Centesimal

O teste de umidade foi realizado pelo método de secagem em estufa a 105 °C até peso constante.

Determinação de resíduo por incineração (Cinzas) realizada pelo método gravimétrico de incineração, em forno mufla a 550 °C.

A atividade de água foi determinada, utilizando-se aparelho AQUALAB® (CX-2 - DECAGON) a 25 °C.

A determinação do pH foi realizada, utilizando-se potenciômetro digital KASVI® (k39-2014), leitura direta com imersão do eletrodo no béquer contendo 100mL de água destilada e 10 g de amostra macerada.

A acidez titulável realizada em solução normal determinada em (hidróxido de sódio 0,1 N) utilizando fenolftaleína como indicador.

O Extrato Etéreo foi determinado pela extração contínua em aparelho de Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente e posterior evaporação em estufa a 105 °C.

Proteína Bruta Total foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl empregando-se o fator 6,25 para conversão em proteína do teor de nitrogênio total.

A fibra alimentar total foi analisada pelo método gravimétrico-enzimático estabelecido pela AOAC (2005), adaptado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (EMBRAPA, 2008), onde baseia-se na digestão enzimática da amostra com α -amilase termoresistente, protease e amiloglucosidade, seguida de precipitação em etanol e filtração. Esta análise foi realizada em quadruplicata.

O teor de carboidratos foi calculado por diferença soma dos teores dos componentes: umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e fibras da totalidade do conjunto, previsto pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360, 2 de dezembro de 2003 (ANVISA, 2003), por meio da Equação 2.

$$\%carboidratos = 100 - (\%umidade + \%cinzas + \%proteína + \%extrato\ etéreo + \%fibras) \text{ (Eq.2)}$$

Valor Energético Total (VET) foi estimado utilizando-se os fatores para conversão ATWATER: 4 kcal.g⁻¹ para proteínas, 4 kcal g⁻¹ para carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para lipídios.

A análise de minerais foi executada no Laboratório de Análises Agroambientais – Embrapa Arroz e Feijão, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2006). Quantificadas por espectrofotometria de absorção atômica, que consiste na digestão nitroperclórica com a solução de HNO₃: HClO₄. Um grama de amostra foi pesado e serão adicionados 10 mL de solução nitroperclórica 4:1 v/v destes ácidos concentrados. As amostras foram colocadas em bloco digestor com aquecimento e exaustão, sendo mantidas nesta condição até a formação de uma solução límpida. Após a digestão, o material foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e o volume, completado com água deionizada. Os elementos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, em espectrofotômetro e o elemento potássio foi determinado por espectrofotometria de chama, em fotômetro de chama. Os teores dos minerais foram calculados utilizando-se uma curva padrão com concentração conhecida para cada elemento analisado.

Vitamina B₁₂ foi determinado pelo método de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), segundo AOAC (2010) no laboratório Centro de Qualidade Analítica em Campinas SP. O preparo do padrão se dá pela diluição de cianocobalamina em água e a determinação em coluna *Acquity* UPLC BEH C18. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de água e metanol na proporção de 80 para 20 a um fluxo de 0,5 mL/min e o comprimento de onda de leitura das análises cromatográficas foi de 550,0 nm.

Para determinação do teor de tanino, foi utilizado o método descrito por Hagerman e Butler (1978). O extrato da amostra foi obtido a partir da adição de 10 mL de água destilada em 1 g de amostra, aquecido em banho-maria por 30 minutos à temperatura entre 80 °C e 90 °C, e posteriormente centrifugada durante 5 minutos. Em seguida, foi misturado 1 mL do extrato com 2 mL de solução de albumina sob agitação, e deixados em repouso por 15 minutos. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 956 rpm, para desprezar o sobrenadante e dissolver o precipitado em 4 mL da solução SDS/Trietanolamina. A solução obtida foi homogeneizada com 1 mL de FeCl₃, mantida em repouso por mais ou menos 20 minutos para realização da leitura em espectrofotômetro a 510 nm, obtendo-se assim a concentração de taninos a partir de uma curva padrão de ácido tânico.

O potencial antioxidante foi determinado pelo método do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), segundo Brand-Williams (1995). O grau de descoloração do radical DPPH, a 517 nm pela ação dos antioxidantes, foi medido por espectrofotômetro nos extratos etéreo,

etanólico e aquoso, com concentração de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e os resultados expressos em % de descoloração. As leituras das absorvâncias das amostras a 517 nm, em espectrofotômetro, foram realizadas após 20 minutos de reação.

A atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi feita conforme metodologia descrita pela EMBRAPA (2007). A partir do extrato que foi obtido, em ambiente escuro, foi adicionado alíquota em tubos de ensaio com 3,0 mL do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, homogeneizado em agitador de tubos. Leitura (734 nm) no espectrofotômetro. Foi plotado a absorvância no gráfico. Em seguida, foi determinada a equação da reta. Para calcular a AAT, foi substituída na equação da reta a absorvância equivalente ao padrão trolox.

Para Rafinose, Verbascose e Estaquiose, os experimentos foram realizados por ressonância magnética nuclear no Instituto de Química da UFG segundo Filho (2010). A quantificação da rafinose, estaquiose e verbascose, foi feita a partir da massa de TMSP-d4 utilizado como padrão interno nas análises. Conhecendo a quantidade de TMSP-d4 utilizada, a integração de seu sinal e o valor da integral dos sinais de cada hidrogênio anomérico da unidade glicose de cada uma das moléculas dos oligossacarídeos, sendo calculadas por proporcionalidade, as concentrações destes açúcares.

A textura foi qualificada de acordo com Naia (2015) em texturômetro Textura- TPA Texture Profile Analysis®. As análises foram realizadas com o produto (*tempeh*) pronto, utilizando-se 10 fatias (20 mm) de cada amostra para a análise de corte e 10 pedaços cilíndricos com 35 mm de diâmetro para a análise de compressão. Para a compressão foi utilizada carga: 30 kg, sonda 11 mm, velocidade de pré teste: 2 mm/s, velocidade teste: 1 mm/s, pós: 2 mm/s.

A cor foi avaliada em colorímetro HUNTER LAB®, modelo Color Quest XE e os resultados foram expressos pelos parâmetros L^* , a^* , b^* . A luminosidade ou brilho (L^*) representa quão claro ou escuro é o produto, variando de preto (0) ao branco (100). Os valores das coordenadas de cromaticidade (a^*) variam do verde (-60) ao vermelho (+60) e os valores de croma b^* variam do azul (-60) ao amarelo (+60). Análise foi em triplicata.

2.2 Análise Estatística

O tratamento estatístico foi inteiramente casualizado, utilizando-se 3 repetições. Os resultados obtidos para os parâmetros dos *tempehs* de feijão sem casca, em diferentes

proporções de grãos foi efetuado pelo uso do *software* SISVAR®, sendo os resultados expressos em média±desvio-padrão, efetuando-se a análise de variância (ANOVA) e teste F para comparação dos valores médios obtidos nos diferentes tratamentos segundo teste de Tukey ($p<0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados se apresentam nas tabelas de 9 a 16.

Tabela 9. Determinação de Umidade (%) antes liofilização, Umidade (%) após liofilização, atividade de água antes liofilização, atividade de água após liofilização, determinação do pH e acidez titulável.

Identificação	Umidade (%) antes liofilização	Umidade (%) após liofilização	Aw antes liofilização	Aw após liofilização	pH	Acidez (°D)
TFS	59,57 ^a	2,957±0,10 ^a	0,73±0,05 ^a	0,51±0,03 ^a	6,11 ±0,19 ^a	1,11 ±0,17 ^a
TF	60,19 ^a	3,03±0,08 ^a	0,60±0,06 ^{b,a}	0,45±0,05 ^{b,a}	5,96±0,08 ^a	1,21±0,10 ^a
TS	60,92 ^a	2,56±0,1 ^a	0,51±0,03 ^b	0,37±0,02 ^b	6,12 ±0,28 ^a	1,14 ±0,11 ^a

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p<0,05$).

O percentual de umidade dos *tempehs*, observados no processo de liofilização, não teve diferença significativa entre as amostras, o que é compreendido, pois os grãos foram hidratados até o nível máximo de absorção de forma igualitária. A atividade de água na amostra TS foi menor em comparação a TFS, o que pode ser devido à fermentação dos *tempehs*, uma vez que o TS fermentou mais rapidamente demonstrando que o fungo desenvolve melhor nestas condições. Os resultados são semelhantes aos encontrados por Paredes – Lopez et al., (1987) na fermentação de feijão preto, onde o pH variou de 5,81 a 7,13 e umidade em torno de 63,3%, assim como Reyes-Bastidas et al.,(2010) que em *tempeh* de feijão comum encontraram pH 6,34 e atividade de água 0,58.

O conceito de atividade de água é valorizado em estudos sobre alterações dos alimentos, por estar diretamente relacionado com o desenvolvimento e a atividade metabólica dos microrganismos, principalmente bactérias. De acordo com Ordoñez et al., (2005) alimentos com atividade de água inferior a 0,60 são microbiologicamente estáveis, pois essa atividade de água é considerada limitante para o desenvolvimento bactérias patogênicas.

Tabela 10. Determinação de Resíduo por Incineração (Cinzas), Determinação de Extrato Etéreo, Proteína Bruta Total, Carboidratos e Valor calórico.

Identificação	Cinzas (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Proteínas (g/100g)	CHO (g/100g)	Kcal/100g
TFS	2,83±0,03 ^a	11,36±0,63 ^b	33,05±0,47 ^b	52,75 ^b	445,44 ^b
TF	2,57±0,02 ^b	1,6±0,20 ^c	22,71±0,35 ^c	73,11 ^a	397,68 ^c
TS	2,03±0,01 ^c	24,89±0,30 ^a	59,05±0,38 ^a	14,02 ^c	516,29 ^a

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

As características nutricionais dos TFS, TF e TS são naturalmente diferentes devido aos componentes de seus substratos. Levando em consideração essa questão, vale ressaltar a diferença do conteúdo de cinzas totais, lipídios, proteínas e carboidratos, principalmente entre TF e TS. Todos os valores para TFS são medianos em relação a TF e TS, uma vez que o *tempeh* é composto por 50% das matérias – primas.

Houve diferença significativa em todas as amostras, porém vale ressaltar diferença entre lipídios de TF e TS (1.555%), proteínas (260%) e carboidratos (521%).

A amostra TF contém menos calorias que a amostra TFS, justificado principalmente pelo teor de lipídios. No trabalho de Owens em 2015, foi descrito que teor de gordura do *tempeh* de soja é cerca de 25%, podendo ser uma desvantagem, uma vez que há a necessidade de redução da ingestão de calorias. Porém, os ácidos graxos presentes são principalmente mono ou poli-insaturados, que são mais saudáveis que os ácidos graxos saturados, podendo destacar a presença dos essenciais como o ácido linolênico.

Benassi (2011) cita em seu trabalho que o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou, em 1999, a alegação de que em uma dieta pobre em gorduras insaturada, só o consumo diário de 25 g de proteína de soja, pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

Toledo (2008) analisou a composição do feijão cozido e verificou valor de cinzas de 4,16% ± 0,01, para proteínas: 20,35% ± 0,71 e lipídios: 1,60% ± 0,01. O valor de lipídio é coerente com os de *tempeh* de feijão, as proteínas do *tempeh* superam as do feijão sem fermentação e a cinzas possuem menor valor no *tempeh*.

Gamboa-Gómez et al., (2015) que produziram farinha de *tempeh* com feijão comum das cultivares *Bayo victoria* (BV) e *Pinto durango* (PD) observaram umidade BV (8,10%) e PD (7,70%), cinzas BV (4,40%) e PD (4,60%), proteínas BV (23,40%) e PD (22,70%),

carboidratos BV (55,99%) e PD (57,10%), lipídios BV (0,79%) e PD (0,99%) e fibras BV (3,50%) e PD (2,90%), resultados similares aos encontrados neste estudo.

De acordo com Astuti et al.,(2000), o teor de proteína de *tempeh* de soja e de grão de soja são praticamente o mesmo. Devido à ação da enzima protease produzida pelo fungo durante a fermentação, o teor de proteína solúvel aumenta acentuadamente. O teor de nitrogênio solúvel em soja não fermentada é de 3,5 mg/g, em comparação com 8,7 mg/g em *tempeh*. O *Rhizopus* usa aminoácidos como fonte de nitrogênio para seu crescimento, por isso o conteúdo total de aminoácidos diminui, mas os aminoácidos livres aumentam.

Ainda segundo Reyes-Bastidas et al.,(2010), que estudaram os efeitos da fermentação em estado sólido (SSF) sobre as propriedades físico - químicas, nutricionais e antioxidantes da farinha de feijão, houve aumento do teor de proteínas (21,7%), diminuição dos lipídeos (-38,4%), carboidratos (-3,5%) e atividade antioxidante de (38%).

Paredes-Lopez et al.,(1987), produziram e analisaram *tempeh* a partir de feijão preto Querétaro 78, observando apenas pequenas alterações em proteína bruta total ao longo de 72hs de fermentação. No entanto, apesar das dificuldades em solubilizar as proteínas de feijão, as proteínas solúveis aumentaram de 1,1% no início para 11,8% ao final da fermentação. Isto indica que a degradação extensiva de proteínas ocorreu durante o processo de fermentação, solubilizando cerca de 41% da proteína bruta total.

Tabela 11. Determinação de Fibras Alimentares

Identificação	fibra alimentar insolúvel (g/100g)	fibra alimentar solúvel (g/100g)	fibra alimentar total (g/100g)
TFS	20,04 ^b	3,25 ^b	23,29 ^b
TF	11,95 ^c	4,14 ^a	16,09 ^c
TS	22,39 ^a	2,69 ^c	25,09 ^a

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Pode-se observar que o teor de fibras nos TFS e TS é relevante para uma dieta que requer fibras, com praticamente 1/5 de fibras insolúveis e ¼ de fibras. A diferença entre TS e TF é de 34% para fibras totais.

De acordo com estudo realizado por Fabara (2011), o conteúdo de fibras em *tempeh* de soja fresco foi de 1,4%, *tempeh* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) teve uma percentagem de 6,15% e *tempeh* de quinoa e feijão contém uma percentagem de 4,10%, o que demonstra um aumento da quantidade percentual de fibra, assim como em TFS pela contribuição do feijão.

De acordo com Zago (2014), as fibras são componentes agrupados em polímeros solúveis (pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses) e insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina), não amiláceos e ligninas de vegetais que não são digeríveis pelas enzimas digestivas e sofrem fermentação completa ou parcial no intestino grosso. As fibras solúveis elevam a excreção de ácidos biliares, diminuem as contrações séricas da lipoproteína de baixa densidade (LDL), removendo do fígado o colesterol do sangue para sintetizá-los, aumenta o trânsito intestinal diminuindo a absorção do colesterol. As fibras insolúveis aumentam a sensação de saciedade, diminuindo a ingestão calórica, retém água e aumentam o volume fecal, diminuindo o tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal. Pesquisas indicam que as fibras são benéficas na redução do risco de úlceras duodenais e no tratamento dessas lesões, além de reduzem as concentrações séricas de estrogênio protegendo contra o câncer de cólon.

De acordo com a Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, que considera o "Regulamento Técnico Sobre A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas E Minerais" da ANVISA, segue a Tabela 12 que compara os minerais encontrados nos *tempehs* com as necessidades diárias para indivíduo adulto.

Tabela 12. Determinação Minerais em *Tempehs* e Recomendação Diária para Adulto

Identificação	TFS	TF	TS	IDR Adulto
N (g/kg)	59,13±1,59 ^b	31,78±1,77 ^c	85±1,39 ^a	-
P (g/kg)	4,40±0,17 ^b	4,17±0,19 ^c	5,57±0,04 ^a	700 mg
K (g/kg)	5,69±0,06 ^b	6,99±1,43 ^a	1,58±0,01 ^c	-
Ca (g/kg)	1,36±0,02 ^b	0,61±0,16 ^c	2,17±0,00 ^a	1 g
Mg (mg/kg)	1,44±0,05 ^a	1,36±0,12 ^b	1,18±0,00 ^c	260 mg
B (mg/kg)	9,50±0,30 ^b	6,31±0,27 ^c	11,87±0,15 ^a	-
Cu (mg/kg)	7,75±0,23 ^b	5,69±0,14 ^c	9,29±0,07 ^a	900 ug
Fe (mg/kg)	41,54±1,10 ^c	44,36±3,00 ^b	64,6±3,54 ^a	14 mg
Mn (mg/kg)	17,21±0,17 ^b	13,26±0,94 ^c	23,78±0,20 ^a	2,3 mg
Zn (mg/kg)	32,26±0,88 ^b	30,24±1,02 ^c	53,69±0,73 ^a	7 mg
Mo (ug/kg)	1636,79±172,22 ^a	499,08±79,82 ^c	534,44±52,91 ^b	45 ug

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

De acordo com a RDC nº 269, não há referências para nitrogênio, potássio e bório. O elemento fósforo apresentou concentração relativamente boa, assim como o cobre, para todas as amostras. Destaca-se em todas as amostras de *tempeh* o conteúdo de molibdênio,

ultrapassando a recomendação diária. Para os demais elementos há presença de minerais importantes para a alimentação humana, porém o valor pode ser considerado baixo. Dentre as amostras, o TS apresenta-se com a maior concentração de minerais, seguido pelo TFS e TF.

De acordo com Santana (2004), enzimas com molibdênio promovem a transferência de oxigênio entre a água e o substrato em uma reação de oxi-redução, catalisa a remoção do ferro da apoferritina num processo anaeróbio em presença da enzima, 85% de uma dose oral de molibdênio são absorvidos e é armazenado principalmente no fígado. O molibdênio não apresenta toxicidade e pode ser eliminado pelo cobre. Altas doses podem causar sintomas de gota.

Em um estudo com sementes de tremoço descascadas, observou-se que o potássio adicional estimulou o crescimento de *R. oligosporus* (PENALOZA et al., 1991).

Apesar do conteúdo de ferro em feijão ser, pela literatura, maior que o da soja, de acordo com Astuti et al., (2000), maior parte do ferro na soja está presente como ferro orgânico e está ligado a proteínas e outros compostos orgânicos. A proteína é quebrada resultando em aminoácidos livres, peptídeo ou proteínas simples. Como resultado, o ferro é liberado do complexo de ferroproteínas, aumentando assim o ferro solúvel. Os teores de minerais, principalmente (ferro, cálcio e cobre) não são influenciados pelo processo de fermentação, porém sua solubilidade aumenta acentuadamente. O ferro solúvel total aumenta de 24,29% na soja não fermentada para 40,52% no *tempeh*, aumento de 66,51%. O teor de cálcio diminui durante a fermentação, mas não é claramente compreendido.

Segundo Almeida (2002), sabe-se que um grande número de elementos minerais é essencial para a nutrição humana, podendo-se mencionar, o cálcio e o magnésio, que atuam na formação de ossos, dentes e tecidos. O potássio, quando associado ao sódio, regulariza o funcionamento do sistema muscular e os batimentos cardíacos. Alguns dos elementos minerais são encontrados em quantidades relativamente baixas no corpo humano como é o caso do zinco, ferro, cobalto e manganês.

Zinco e manganês servem como ativadores de reações metabólicas catalisadas por enzimas, sendo, portanto, elementos importantes para a reprodução e o crescimento. O ferro é um componente das moléculas de hemoglobina, mioglobina, citocromo e de alguns sistemas enzimáticos, desempenhando um papel essencial no transporte de oxigênio e respiração celular.

Para o teor de vitamina B₁₂, foram analisadas somente as amostras TF (0,38 µg/100 g) e TS (0,42 µg/100 g), não havendo diferença significativa entre as amostras. Esperava-se

valor maior, já que os valores de literatura demonstram valores acima dos obtidos nesta pesquisa. A perda de vitamina B₁₂ pode estar relacionada ao processamento térmico que foi empregado no *tempeh*, pois segundo estudos realizados por Silva e Almeida (2000) a vitamina B₁₂ em leite foi moderadamente instável à exposição à luz, calor e a perdas por lixiviação. Davidek et al., (1990), observaram elevadas perdas de cobalamina, na faixa de 66,6 a 71,0%, durante a esterilização de carne de porco (bife) e no leite, esterilizado a 120 °C por 13 min, foram observadas perdas que variaram de 77 a 95%.

O valor de vitamina B₁₂ obtido nos *tempehs* analisados foi muito baixo ao preconizado pela RDC 269, que recomenda ingestão diária de 2,4 µg, sendo necessária ingestão de grande quantidade de *tempehs* para se alcançar o nível desejado, claro sem considerar outra fonte de alimentação.

Areekul (1990) analisou *tempeh* de soja em Jacarta, Indonésia e encontrou valores entre 0,18 e 4,1 µg de análogos de vitamina B₁₂ por 100 g. O USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2010) menciona um valor de 0,08 µg / 100 g de *tempeh* fresco, o que é também muito baixo. De acordo com Nout (2005), usando métodos mais específicos, os níveis de vitamina B₁₂ no *tempeh* de soja são estimados na faixa de 0,2-4,0 µg/100 g.

A vitamina B₁₂ é investigada em *tempehs* devido o *Rhizopus oligosporus* ser sintetizador desta vitamina (subproduto de sua fermentação), assim como de outras vitaminas do complexo B. Porém, ressalta-se o estudo da cianocobalamina por esta apresentar o maior nível de deficiência em pessoas que possuem restrições alimentares com o consumo de carne, do complexo B (VANNUCCHI, 2010). Sachdev (2005) indicou que com uma dose de vitamina B₁₂ de 0,02 a 1,0 mg /dias, os níveis de homocisteína podem ser reduzidos em cerca de 7%. A vitamina B₁₂ é essencial para síntese de DNA e criação de glóbulos vermelhos (MOLINA, 2012). É componente principal do metabolismo de ácidos graxos, carboidratos e ácidos nucléicos, importante para o sistema nervoso central (GRÖBER et al., 2013). Em estudos a vitamina B₁₂ converte a homocisteína em cisteína ou metionina, o que é importante, pois alto nível de homocisteína no sangue pode acarretar doença vascular, atrofia cerebral, comprometimento cognitivo, doença de Alzheimer, depressão e várias doenças neuropsiquiátricas (JAGASIA, 2015).

Para a análise de taninos, o *tempeh* obteve resultado muito baixo TFS (0, 208%), TF (0,052%) e TS (0,032%), sendo considerado indetectável. Este resultado se dá pelo fato da fermentação e a retirada da casca do feijão diminuíram significativamente o conteúdo de

fatores antinutricionais. Os taninos são fatores antinutricionais que prejudicam a digestibilidade da proteína das leguminosas e estão concentrados principalmente nos tegumentos dos grãos (OLIVEIRA, 2010). O processo de produção de *tempeh*, principalmente a fase de remoção do tegumento e o cozimento, diminuem o teor de taninos, segundo Starzynska-Janiszewska et al., (2013). Estes autores verificaram que o conteúdo de taninos medidos em *tempeh* produzidos com feijão comum com casca foi, em média, 41%.

Tabela 13.- Atividade antioxidante dos *tempehs*

Identificação	Atividade Antioxidante ABTS (%)	Atividade Antioxidante DPPH (%)
TFS	28,97 ^b	13,40 ^b
TF	31,62 ^c	14,77 ^a
TS	48,89 ^a	11,28 ^c

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

As amostras tiveram diferença significativa entre si nos dois métodos analisados, demonstrando o TF maior capacidade antioxidante no método DPPH e o TFS no método ABTS. Essa discrepância nos resultados se dá, devido o método DPPH medir a descoloração do reagente DPPH e o método ABTS medir a capacidade antioxidante baseada na habilidade das substâncias em inativar radicais, no caso o radical ABTS (ABTS•) e seus valores serem inversamente proporcionais.

Os processos oxidativos têm sido associados às doenças degenerativas, envelhecimento, à cardiopatias e à depressão do sistema imunológico. Antioxidantes são substâncias capazes de retardar estes, pois reagem com os radicais livres inibindo a etapa de propagação da reação de oxidação.

De acordo com Owens (2015), o *tempeh* de feijão preto possui maior teor de antioxidantes do que o feito de soja convencional, sendo os de feijão, com atividade antioxidante de 14% de inibição de radicais livres em comparação com grãos de soja amarela com apenas 11%, dados de Xu e Chang (2007). Ainda em Owens (2015), o mesmo cita que Nurrahman et al., (2012), observaram níveis muito mais elevados, de 37% em *tempeh* de soja preta e 25% em *tempeh* de soja amarelo.

As análises dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose, por ressonância magnética nuclear foram comprometidas pela interferência de outras substâncias que

compõem os *tempehs*, fazendo com que houvesse uma superposição de sinais, que não permitiram o bom funcionamento dessa metodologia.

De acordo com Oliveira (2010), os oligossacarídeos rafinose e estaquiose representam cerca de 4 e 36%, respectivamente do total de açúcares encontrados na soja. Já no feijão apresentam rafinose (0,30%), estaquiose (2,43%) e verbascose (0,07%).

A presença desses oligossacarídeos não redutores é a maior causa de flatulência causada pelo consumo de leguminosas. Durante o processo de fabricação do *tempeh* esses oligossacarídeos são solubilizados na água de maceração. Embora sejam considerados antinutrientes, Morais e Silva (1996) afirmaram que eles promovem o desenvolvimento de *Bacillus bifidus* no lúmen intestinal, reduzindo os riscos de câncer de cólon. Rehms e Barz (1995) observaram que o *Rhizopus oligosporus* produz enzimas, capazes de degradar rafinose e estaquiose.

A necessidade de se comparar o *tempeh* de feijão com o *tempeh* de soja se faz, a fim de se identificar quais os requisitos nutricionais e tecnológicos se diferem entre eles. Por isso, as análises de textura e cor, são importantes para que se estabeleça requisitos que possam apresentar dados e estes auxiliem na comparação da eficiência da produção das amostras.

A determinação do perfil de textura é importante em avaliações de consistência e estabilidade, fornecendo informações sobre a estrutura do produto (SHOEMAKER et al., 1992). Nas Tabelas 14 e 15, estão apresentados os resultados de textura e cor. Pode-se observar que não houve diferença significativa em relação à coesividade, mastigabilidade e resistência das amostras.

No resultado de dureza, adesividade e gomosidade das amostras, TS apresentou resultado maior que TF, isso se deve ao maior teor de proteínas e lipídios de TS, pois

Naia (2015) analisou *tempeh* de soja, ervilha e tremoço. De acordo com sua pesquisa, o *tempeh* de soja obteve coesividade de 0,25, para ervilha 0,26 e tremoço 0,31, valores estes discrepantes em relação ao encontrados neste trabalho.

Claudino e Bertoloni (2013) avaliaram o perfil de amostras de hambúrguer bovino e observaram dureza (8983,14), mastigabilidade (5318,48), gomosidade (646,78) e elasticidade (0,93), valores esses muito discrepantes dos *tempehs*, o que é aceitável pois se trata de matérias – primas completamente diferentes.

As proteínas são as responsáveis pela estrutura física de muitos alimentos. É de grande importância, visto que dá corpo aos produtos elaborados, devido a separação de cadeias

polipeptídicas das proteínas globulares e, posterior estabilização dessas cadeias, mediante a criação de ligações intermoleculares (ORDOÑEZ et al., 2005)

Tabela 14. Determinação de Textura em N (Newtons)

Identificação	Dureza	Adesividade	Elasticidade	
TF	2,39±0,71 ^b	68,31±22,50 ^b	0,48±0,21 ^a	
TS	13,42±1,87 ^a	524,94±82,23 ^a	0,17±0,01 ^b	
Identificação	Coesividade	Gomosidade	Mastigabilidade	Resistência
TF	0,14±0,05 ^a	0,35±0,18 ^b	0,19±0,15 ^a	0,01±0,01 ^a
TS	0,08±0,01 ^a	1,21±0,33 ^a	0,20±0,06 ^a	0,01±0,00 ^a

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 15. Determinação de cor L*, a*, b* dos *tempeh*

Identificação	L*	a*	b*
TF	4,28±0,05 ^a	-0,99±0,18 ^b	21,81±0,15 ^a
TS	66,01±0,01 ^b	-1,99±0,03 ^a	17,20±0,06 ^b

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A cor branca do micélio contribui com os resultados encontrados. O brilho do TS é 1543% maior que TF, provalvemente devido ao maior teor de gordura presente na soja.

Em relação a a*, TS possui tonalidade mais aproximada ao verde que TF, ambos com resultado distante do vermelho. O TF apresentou valor de b* maior que TS, ambos mais aproximados da cor amarelo que azul. Apesar dos *tempehs* apresentarem pontos marrons devido a preparo em frigideira, não foi observado no teste de cor tendência para o tom vermelho, pois a cor amarela é predominando em toda a amostra.

Em seu trabalho, Srapinkornburee et al., (2009) desenvolveram *tempeh* de feijão vermelho e observaram L* (23,90), a* (7,65) e b* (7,80), valores esses diferentes do encontrados nesta pesquisa, porém condizentes com o tipo de feijão (vermelho) e com a influência do branco do micélio.

4 CONCLUSÃO

De acordo com este estudo, pode-se considerar o *tempeh* de feijão comum, um alimento com valor considerável de proteína, minerais, alto valor de carboidrato, baixo teor de lipídios, bom valor de fibras e um alimento com capacidade antioxidante relevante. A recomendação do consumo de *tempeh* deve ser baseada em estudos científicos que demonstrem seus efeitos benéficos à saúde e a investigação científica contínua proporciona uma melhor concepção e uma maior ciência sobre a identificação dos componentes benéficos, mecanismos de ação, função, aspectos nutricionais e de saúde do *tempeh*.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Goiás e à EMBRAPA Arroz e Feijão pelo apoio científico, e utilização do Laboratório de Grãos e Subprodutos e à Faculdade Metropolitana de Anápolis.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução – RDC n.º 360, de 23 de dezembro de 2003. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional.**

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** AOAC International, USA, 16th Edition, 3rd Revision, volume II, 1997.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists.** 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of Analysis.** 18 ed. Washington DC USA, 2006.

AOAC - Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis.** 19th ed. Washington: AOAC, 2010.

AREEKUL et al., The source and content of vitamin B12 in the *tempehs*. **J Med Assoc Thai** 1990 Mar;73(3):152-6.

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

BENASSI, Vera de Toledo. **Seleção de cultivares de soja para produção de tofu, de acordo com as características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais do produto**. Tese de doutorado- Universidade Estadual de Londrina – Londrina, 2011. 183 f. : il.

BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT – Food Science and Technology**, 1995. London, v. 28, n. 1,p. 25-30.

CLAUDINO, F. B; BERTOLONI, W. Perfil De Textura E Composição De Hambúrgueres Elaborados Com Diferentes Teores De Gordura E Plasma Sanguíneo Bovino. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.2, p.01-08, 2013

CRUZ, IVONE LOPES. **Desenvolvimento de um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a produção de tempeh em pequena escala a partir de diferentes leguminosas**.2014. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia alimentar.Universidade de Lisboa, Lisboa- Portugal

DAVÍDEK J, VELÍSEK J, POKORNÝ J. Chemical change during food processing. Amsterdam: **Elsevier Science**; 1990.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Metodologia científica:determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4p. (Comunicado técnico, 128).

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Procedimento operacional padrão para determinação de fibras solúvel e insolúvel**. Sidinéa Cordeiro de Freitas... [et al., Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2008. 28p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0103-6068 ; 94)

FABARA, C. M.; PROAÑO, A.G. **Evaluación nutricional de tempeh obtenido por fermentación de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) Y QUINUA (*Chenopodium quinoa*) CON *Rhizopus oligosporus***. Universidad Estatal de Bolivar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Guaranda – Ecuador 2011.

FAGUNDES, E. S. AITA; SOUZA, J. G; BLUMKE, A. C; BLASI, T. C. A Soja Como Alimento Funcional. **VI Seminário de Nutrição Unifra**. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria-RS, 2012;

FILHO, E. G. A. **Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*)**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2010.

GRÖBER, U., KISTERS, K., & SCHMIDT, J. (2013). Neuro enhancement with Vitamin B12—Underestimated Neurological Significance. **Nutrients**,5(12), 5031–5045.

HAGERMAN. A.E.; BUTTER. L.G. Protein precipitation method for the qualitative determination of tannins. 1978. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 26: 809 - 812.

JAGASIA, D., FERRANDO, V. Z., **Tempeh: a tempting potential vitamin B₁₂ treat. An exploration of legumes and vitamin B₁₂**.2015. Institution enförkostvetenskap, Besöksadress: BMC, Husargatan, Uppsala.

JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C., HERNANDÉZ-SÁNCHEZ, H., E DÁVILA-ORTIZ, G. 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**, 2007. 87:1315–1322

KRISNAWATI, A. and MUCHLISH, M.A.P. Selection of soybean genotypes by seed size and its prospects for industrial raw material in Indonesia. **Food Science**. 2015p.355 – 363. The First International Symposium on Food and Agro-biodiversity

MOLINA, V., MÉDICI, M., FONT DE VALDEZ, G., & TARANTO, M. P. (2012). Soybean-based functional food with vitamin B12-producing lactic acid bacteria. **Journal of Functional Foods**,4(4), 831–836.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1996. 259 p.

NAIA, I. I. P. **Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de tempeh de soja**. 2015. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p

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

OLIVEIRA, Marcelo Alvares de. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/ cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana.**Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 23-29, jan./mar. 2010

ORDÓÑEZ, J.A. et al., **Tecnologia de alimentos**. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

OWENS, J. D, ASTUTI, M and KUSWANTO, K.R.**Tempe and Related Products**. Memoirs of the Tokyo University of Agriculture 2015.

PAREDES -LOPEZ, O; GWYNETH I . H and MONTES –RIVERA, R..Development of a Fermentation Procedure to Produce a Tempe-Related Food Using Common Beans as Substrate. **Biotechnology Letters**. Vol 9 No 5 333-338 (1987)

- PENALOZA, W., DAVEY, C.L., HEDGER, J.N. and KELL, D.B. (1991) Stimulation by potassium ions of the growth of *Rhizopus oligosporus* during liquid- and solid-substrate fermentations. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 7, 260–268.
- REHMS, H; BARZ, W. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. **Appl Microbiol Biotechnol** (1995) 44: 47
- REYES-BASTIDAS, M.; REYES-FERNÁNDEZ, E. Z.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; MILÁN-CARRILLO, J.; LOARCA-PIÑA, G. F.; REYES-MORENO, C. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science & Technology International**, v. 16, n. 5, p. 427-434, 2010.
- SANTANA, R.A. Papel **Do Molibdênio Na Anemia Da Infância**. Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Tese de Doutorado. RECIFE, 2004.
- SILVA PH, ALMEIDA, MC. Estabilidade térmica do leite. In: **Anais do Congresso Nacional de Laticínios**; 2000. Juiz de Fora, Brasil, Juiz de Fora: EPAMIG – Centro Tecnológico – ILTC; 2000. p. 65-70.
- SOARES, L. A; BASSINELLO, P.Z; KOAKUZU, S. N; EIFERT, E. C; PELOSO, M. J. D. Fibra Alimentar em Feijão Comum e Feijão Caupi. Documentos, **Instituto Agrônomo de**
- SHOEMAKER, C. F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A. C. Rheological characterization of dairy products. *Food Technol.*, v. 46, n. 1, p. 98- 104. 1992.**Campinas**. Campinas, p.85, 2008.
- TOLEDO, T. C. F. and CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Chemical and nutritional evaluation of Carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked by different methods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. Campinas, 28(2): 355-360, abr.-jun.
- VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Cobalamina (Vitamina B12). **ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**. Série de Publicações ILSI Brasil. Volume 13 São Paulo - SP – Brasil, 2010.
- ZAGO, M. F. C. **Aproveitamento de resíduo agroindustrial de jabuticaba no desenvolvimento de formulação de cookie para a alimentação escolar**. 2014. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

CAPÍTULO 5- AVALIAÇÃO SENSORIAL DE *TEMPEHS* DE SOJA (*Glycine max* L.) E FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

RESUMO

O *tempeh* é um produto de fermentação sólida dos grãos de soja através do *Rhizopus oligosporus*, podendo ser preparado adicionando temperos ou em outras aplicações como hambúrguer. *Tempeh* de diferentes matérias-primas vêm chamando a atenção de pesquisadores e principalmente da indústria. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a aceitação de hambúrguer elaborado com *tempeh* de feijão comum, comparando com o *tempeh* tradicional de soja. Os *tempehs* foram fabricados a partir de feijão carioca cv Pérola, sem tegumento (TF) armazenados e escurecidos e amostras comerciais de *tempeh* de soja (TS), foram adquiridos em Resende-RJ. Na confecção dos hambúrgueres, os ingredientes foram utilizados na mesma quantidade para ambos os *tempehs*, assim como o modo de preparo (grelhados). Para a avaliação sensorial foram recrutados 82 provadores que nunca haviam consumido hambúrguer de *tempeh*, os mesmos deveriam avaliar os *tempehs* quanto à aceitação dos seguintes atributos (aparência, aroma, sabor e impressão global), utilizando-se escala hedônica de nove pontos e uma pergunta sobre intenção de compra. As amostras foram submetidas a análise microbiológica, Coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp, de acordo com RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, mesmo essa legislação não contemplando especificamente o produto *tempeh*. Os resultados das análises microbiológicas apresentam-se dentro do padrão estabelecido pela legislação, estando os *tempehs*, aptos para o consumo. Os hambúrgueres apresentaram formato firme, consistente e um tom marrom com característica crocante. O TS obteve nota maior que TF, apresentando melhor desempenho em todos os outros atributos. Tanto sabor quanto odor desagradável (*off flavor*) dos produtos são atribuídos à ação das enzimas lipoxigenases que formam hidroperóxidos dos ácidos graxos poliinsaturados. O armazenamento do feijão pode ter resultado na perda de qualidade (de sabores e odores) e outra hipótese para a baixa aceitação dos hambúrgueres de *tempeh* é que possui um tempo de cozimento menor em relação ao tempo de feijão e soja doméstico, não sendo hidrolisadas as isoflavonas que provocam amargor e adstringência. A necessidade de aprimoramento da técnica de produção de *tempeh* para a confecção dos hambúrgueres é importante para obter maior aceitabilidade deste novo produto.

Palavras-chave: aceitação, intenção de compra, *tempeh* de feijão, *off flavor*.

SENSORY EVALUATION OF SOYBEAN TEMPEHS (*Glycine max* L.) AND COMMON BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)

ABSTRACT

Tempeh is a solid fermentation product of soybeans through *Rhizopus oligosporus*, which can be prepared by adding seasoning or in other applications such as hamburger. *Tempeh*'s different raw materials have come to catch the attention of researchers and especially the industry. This work aims to evaluate the acceptance of burger prepared with common bean *tempeh*, comparing with traditional soybean *tempeh*. The *tempehs* were manufactured from carioca cv Pérola, without tegument (TF) stored and darkened and commercial samples of soybean *tempeh* (TS), were purchased in Resende-RJ. In the making of the burgers, the ingredients were used in the same amount for both *tempehs*, as well as the way of preparation (grilled). For the sensory evaluation, 82 tasters who had never consumed *tempeh* hamburger were recruited, they should evaluate *tempehs* regarding the acceptance of the following attributes (appearance, aroma, taste and overall impression) using a nine-point hedonic scale and a question About purchase intent. The samples were submitted to microbiological analysis, Coliformes at 45 °C, Coagulase positive staphylococci and *Salmonella* sp, in accordance with RDC No. 12 of January 2, 2001, even though this legislation did not specifically contemplate the *tempeh* product. The results of the microbiological analyzes are within the standard established by the legislation, and the *tempehs* are fit for consumption. The burgers had a firm, consistent shape and crisp brown tone. TS had a higher score than TF, presenting better performance in all other attributes. Both flavor and off-flavor of the products are attributed to the action of lipoxygenase enzymes that form hydroperoxides of polyunsaturated fatty acids. Beans storage may have resulted in loss of quality (of flavors and odors) and another hypothesis for the low acceptance of *tempeh* hamburgers is that it has a shorter cooking time in relation to the time of bean and domestic soybean, and the Isoflavones that cause bitterness and astringency. The need to improve the technique of producing *tempeh* for making hamburgers is important in order to obtain greater acceptability of this new product.

Key words: acceptance, purchase intention, bean *tempeh*, off flavor.

1 INTRODUÇÃO

O *tempeh* é um produto de fermentação sólida de origem Indonésia, mais especificamente da ilha de Java, fabricado originalmente por grãos de soja através do fungo *Rhizopus oligosporus*, possui inúmeras qualidades nutricionais, especialmente substâncias bioativas (OWENS, 2015). Ele pode ser preparado adicionando temperos para elaboração de pratos culinários ou pode ser consumido fresco. Possíveis aplicações do *tempeh* são recheio de pizza, elaboração de estrogonofe, formulação de hambúrguer, espetinho de *tempeh*, ou substituição de proteínas nas mais diversas receitas, tornando os públicos veganos e vegetarianos os que mais consomem *tempeh* (LOTUS, 2012).

Apesar de haver *tempehs* de diversos grãos, o *tempeh* de soja é o de maior produção. Estudos sobre *tempeh* de diferentes matérias-primas vêm chamando a atenção de pesquisadores e principalmente da indústria, uma vez que a diversificação e o aproveitamento de subprodutos são de grande interesse científico, econômico e social. O Brasil detém tecnologia de produção e é um importante produtor de feijão, tornando grandiosas as possibilidades de uso deste grão na diversificação de novos produtos.

Para o desenvolvimento de novos alimentos é necessário compreender que o consumo é um acontecimento complexo influenciado por vários fatores, onde as propriedades sensoriais têm sido terminantes na seleção de um produto pelo consumidor.

Segundo Dantas et al., (2010), a determinação da aceitação pelo consumidor é parte crucial no desenvolvimento ou melhoramento de um produto e envolve uma série de procedimentos. Entre os métodos mais empregados para medida da aceitação de produtos está a escala hedônica, onde o consumidor expressa sua aceitação pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida que varie gradativamente com base nos termos gosta e desgosta (NUNES, 2015). A disposição de comprar, leva em consideração atributos com a aparência, aroma, sabor, uniformidade de cor e tamanho (DANTAS et al., 2005).

Diante da expectativa do aproveitamento do feijão comum na obtenção de produtos para a alimentação humana, este trabalho tem o objetivo avaliar a aceitação de hambúrguer elaborado com *tempeh* de feijão comum, por análise sensorial, comparando com o *tempeh* tradicional de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram produzidos *tempehs* de feijão sem tegumento (TF), de grãos de feijão carioca cv Pérola, considerada padrão comercial, que foram multiplicados na safra 2015/2015 na Fazenda Capivara, na Embrapa Arroz e Feijão, tendo sido colhidos para o experimento 15 Kg. Os grãos foram armazenados em temperatura ambiente e utilizados após 18 meses da colheita. Os grãos de feijão carioca apresentaram-se mais escurecidos no momento do estudo, o que é um indicativo de envelhecimento de grão.

A cepa de *Rhizopus oligosporus* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, em Campinas (SP). Como amostras de referência de *tempeh* de soja (TS), foram adquiridos produtos comerciais (congelados) do mesmo lote junto ao fabricante Rezende/RJ.

2.1 Fabricação dos *Tempehs*

Os *tempehs* foram fabricados segundo o método utilizado por Starzynska-Janiszewska et al., (2013) conforme Figura 17. Utilizou-se 200 g de feijão, a limpeza foi em água corrente, na hidratação/maceração os grãos foram submersos em 1000 mL de água esterilizada na temperatura ambiente com adição de 20 mL vinagre de álcool comercial contendo ácido acético (5%) por 20 horas. Para a retirada da água superficial aos grãos foram escorridos e secos manualmente em papel toalha. A retirada do tegumento foi realizada manualmente. O tratamento térmico os grãos foram acondicionados em béquer e tampados com papel laminado e esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C. Os grãos foram drenados e arrefecidos até temperatura ambiente. As leguminosas foram colocadas em sacos plásticos de polietileno, em seguida, inoculou-se 20 g do inóculo previamente produzido com a farinha de arroz e cepa de *Rhizopus oligosporus*, em cada saco. Após o acondicionamento, os sacos foram selados e pequenos furos foram feitos com um garfo de modo a permitir o contato com oxigênio do fungo. Por fim, os grãos foram incubados em estufa à 30 °C e monitorados a fim de verificar visualmente o desenvolvimento do micélio (cerca de 30 hs). Depois do *tempeh* pronto foram confeccionados os hambúrgueres.

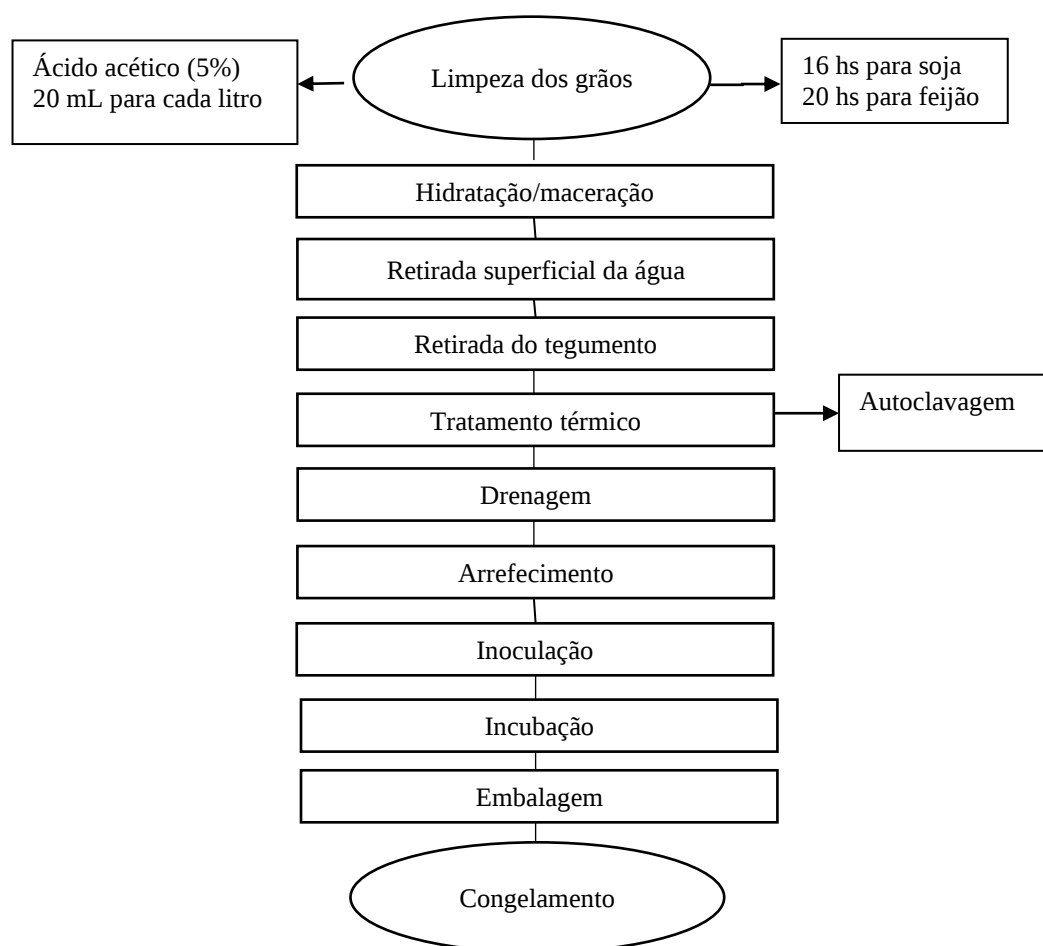


Figura 17. Fluxograma: Etapas da fabricação do *tempeh* de feijão

2.2 Confeção dos Hambúrgueres

Para a análise sensorial, optou-se por confeccionar hambúrgueres, pois este alimento é de fácil manuseio e de grande popularidade entre o público pesquisado. Os ingredientes (Tabela 16) foram utilizados na mesma quantidade e o mesmo modo de preparo para ambos os *tempehs*, feijão e soja. Todos os ingredientes foram homogeneizados em multiprocessador culinário Mondial® e moldados manualmente. Os hambúrgueres foram grelhados em frigideira anti-aderente, untados com azeite até que ficassem dourados em ambos os lados. Cada 100 g de *tempeh* renderam em média 11 hambúrgueres.

Tabela 16. Ingredientes do hambúrguer de *tempeh*

Ingredientes	Quantidade
<i>Tempeh</i> (soja ou feijão)	100 g
Sal	2 g
Pimenta	2 g
Cebola desidratada	3 g
Alho desidratado	3 g
Salsinha desidratada	4 g
Cebolinha desidratada	4 g
Azeite	50 mL

2.3 Análise Microbiológica

Antes da análise sensorial, as amostras foram submetidas a análise microbiológica para garantir a inocuidade das amostras. Contemplaram-se análises de Coliformes a 45 °C, *Estafilococos* coagulase positiva e *Salmonella* sp, de acordo com Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa (BRASIL, 2001), Nesta legislação, não é contemplado especificamente o produto *tempeh*, porém pode-se tomar como padrão microbiológico alimento fermentado similar.

2.4 Análise Sensorial

Os *tempehs* foram utilizados como ingredientes na preparação de “hambúrgueres”, os quais foram avaliados por provadores não treinados (82 pessoas) quanto à aceitação dos seguintes atributos (aparência, aroma, sabor e impressão global), utilizando-se escala hedônica de nove pontos (9- gostei muitíssimo, 8- gostei muito, 7- gostei moderadamente, 6- gostei ligeiramente, 5- nem gostei nem desgostei, 4- desgostei ligeiramente, 3- desgostei ligeiramente, 3- desgostei moderadamente, 2- desgostei muito e 1- desgostei muitíssimo) e uma pergunta sobre intenção de compra (eu certamente compraria este produto; eu provavelmente compraria este produto; tenho dúvidas se compraria ou não este produto; eu provavelmente não compraria este produto; eu certamente não compraria este produto).

Os participantes foram estudantes do curso de Farmácia da Faculdade Metropolitana de Anápolis, colaboradores da EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, estudantes da UFG ou qualquer pessoa que desejasse participar. Foram recrutados de forma aleatória, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que não estejam consumindo medicamento, não fossem fumantes, enfermos ou gestantes. Os provadores preencheram um TERMO DE LIVRE

CONSENTIMENTO (ANEXO A) e o PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (ANEXO B) e antes de receberem as amostras foram instruídos como deveriam realizar o teste.

A análise sensorial foi realizada na Faculdade Metropolitana de Anápolis, Laboratório de Tecnologia de Alimentos e na EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, no Laboratório Cozinha Experimental, localizado em Santo Antônio de Goiás, GO. Os laboratórios possuem cabines próprias para a análise, assim como luz adequada e cozinha de apoio. Foram apresentadas 2 amostras, sendo a primeira de *tempeh* de feijão (TF) e a segunda de *tempeh* de soja (TS). Um questionário e as amostras foram distribuídas, juntamente com um copo de água e as amostras servidas em pratos descartáveis.

Para cada resposta do atributo estipulou-se uma nota: gostei muitíssimo: 10; gostei muito: 8; gostei moderadamente: 7; gostei ligeiramente:6; nem gostei nem desgostei:5; desgostei ligeiramente: 4; desgostei ligeiramente:3; desgostei moderadamente: 2; desgostei muito: 1 e desgostei muitíssimo:0. Para esta nota foi calculada a média e atribuída ao parâmetro analisado.

O projeto foi submetido à avaliação e aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás sob protocolo nº 60631116.6.0000.5083.

2.5 Análise Estatística

O tratamento estatístico foi inteiramente casualizado, utilizando-se 3 repetições. Os resultados obtidos para os parâmetros dos *tempehs* de feijão sem casca e *tempeh* de soja foi efetuado pelo uso do *software* SISVAR®, sendo os resultados expressos em média±desvio-padrão, efetuando-se a análise de variância (ANOVA) e teste F para comparação dos valores médios obtidos nos diferentes tratamentos segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises microbiológicas apresentam-se dentro do padrão estabelecido pela legislação, conforme demonstrado na Tabela 17, estando os *tempehs*, aptos para o consumo.

Tabela 17. Resultados e padrão microbiológico para *tempeh*

Micro-organismos	<i>Tempeh</i> de Feijão	<i>Tempeh</i> de Soja	Padrão microbiológico
Coliformes a 45 °C/g	≤10UFC	≤10UFC	10 ² UFC/g
Estaf.coag.positiva/g	≤10UFC	≤10UFC	10 ² UFC/g
Salmonella sp/25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g

Fonte: Adaptado de RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001

Os hambúrgueres em ambas as amostras apresentaram formato firme, consistente e um tom marrom com característica crocante com formação de crosta, conforme Figura18.

**Figura 18-** Hambúrguer de *tempeh* de feijão

Para os resultados de aparência demonstrados na Figura 19, do total de provadores, 75,60% gostaram da aparência do TF, em intensidades diferentes, sendo 24,39% dos provadores gostaram muitíssimo. Resultado semelhante ao TS, onde 74,39% gostaram da aparência do produto em diferentes intensidades, sendo que 28% gostaram muitíssimo. Deste total de provadores, 10 desgostaram do TF e 8 do TS. A aparência é a primeira avaliação do consumidor com um produto, geralmente, é com a apresentação visual que o provador, em seu imaginário, seleciona os sabores que espera sentir. Todo produto possui uma aparência e uma cor esperadas que são associadas às reações pessoais de aceitação, indiferença ou rejeição. A aparência dos hambúrgueres de *tempeh* é agradável e remete os hambúrgueres de carne de frango.

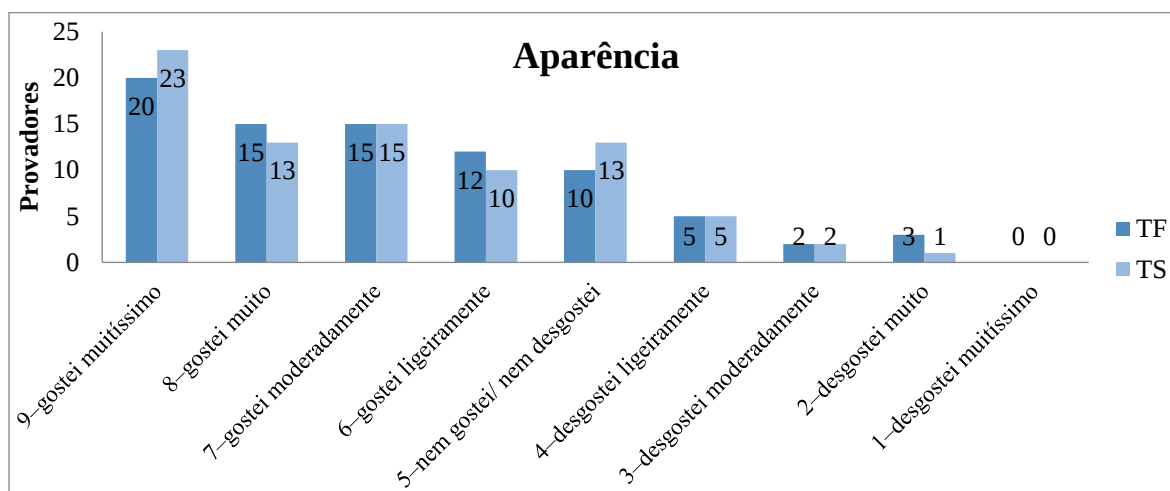


Figura 19 – Avaliação sensorial quanto à aparência dos hambúrgueres de *tempeh*

Quanto à avaliação do aroma, 56,09% gostaram do aroma do TF, de modo geral, sendo somente 8,53% dos provadores gostaram muitíssimo. Resultado bem discrepante em relação ao TS, onde 68,29% gostaram do aroma do produto em diferentes intensidades, sendo, 24,39% gostaram muitíssimo. Do total de provadores, 24 desgostaram do TF e 17 do TS, resultados esses que podem ser observados na Figura 20.

Este fato pode ser explicado pelo odor do feijão não fazer parte da memória olfativa ligada ao aroma de hambúrguer já experimentado pelo provador. Quando se imagina ou visualiza um alimento, automaticamente o aroma e sabor são buscados no subconsciente e ao prová-lo espera-se um aroma parecido com o já conhecido (TEIXIRA, 2009).

Tanto sabor quanto odor desagradável (*off flavor*) dos produtos da soja são atribuídos à ação das enzimas lipoxigenases que formam hidroperóxidos dos ácidos graxos poliinsaturados (RACKIS, 1979).

O armazenamento do feijão pode ter resultado na perda de qualidade (de sabores e odores), valor nutricional e funcionalidade. Lipídios insaturados têm alto poder de oxidação e dão origem a hidroperóxidos e, posteriormente, a aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos, torna-os susceptíveis ao desenvolvimento de *off flavor* durante a estocagem. A geração de *off flavor*, apesar da inativação enzimática pelo calor do processo, indica que a oxidação de ácidos graxos insaturados nos feijões armazenados resultou da oxidação não enzimática (PIRES, 2002).

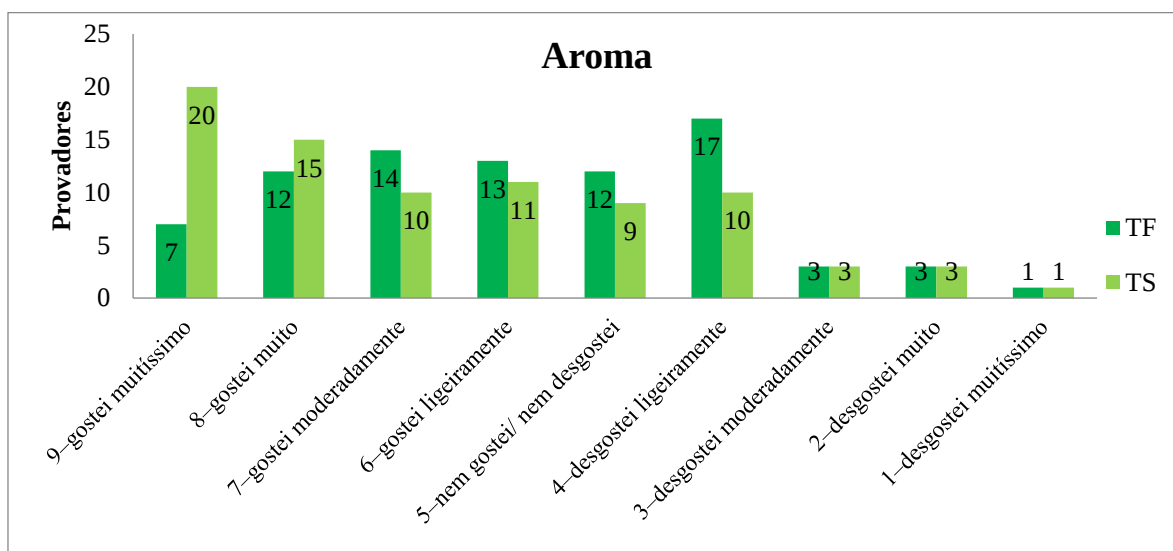


Figura 20 - Avaliação sensorial quanto ao aroma dos hambúrgueres de *tempeh*

Quanto à avaliação do sabor, de acordo com a Figura 21, 39,02% gostaram do sabor do TF, de modo geral, sendo somente 2,43% dos provadores gostaram muitíssimo. Resultado bem semelhante em relação ao TS, onde 64,63% gostaram do sabor do produto em diferentes intensidades, sendo apenas 2,43% gostaram muitíssimo. Do total de provadores, 35 desgostaram do TF e 17 do TS. A mesma explanação em relação ao aroma vale para o atributo sabor, uma vez que este atributo é mistura de sensações olfativas, gustativas e táteis, mesmo que essas evidências sejam de caráter subjetivo. O sabor de feijão é mais intenso e presente que o da soja, além do provador não associar feijão à hambúrguer. Além disso, nos comentários deixados pelos provadores, foi destacado em 7 ocasiões, um sabor amargo residual nas amostras de TF e TS.

Outra hipótese para a baixa aceitação dos hambúrgueres de *tempeh* é o seu processo de fabricação, que possui um tempo de cozimento menor em relação ao tempo de feijão e soja doméstico.

As técnicas de processamento afetam o tipo e o nível de isoflavonas restantes no produto final. Os produtos fermentados tradicionais (missô, *tempeh*) contêm altos níveis de daidzeína e genisteína (aglucones). A amargura e a adstringência da soja são causadas por saponinas e isoflavonas, respectivamente e a intensidade do sabor desagradável em leite de soja aumenta à medida que a concentração de genisteína e daidzeína aumenta devido à ação hidrolítica da β -glucosidase em precursores de isoflavonas glucosídicas (MATSUURA et al., 1989).

No estudo de Carrão-panizz et al., (1999) o propósito foi determinar os efeitos dos isoflavonóides sobre o sabor da soja. Diferenças no sabor de feijão cru e na adstringência do extrato hidrossolúvel de soja e dos grãos inteiros de soja cozidos, com pré-maceração e pré-aquecimento dos grãos, foram analisadas sensorialmente por escala hedônica. Pré-maceração dos grãos intensificou o sabor de feijão cru nos extratos de soja, reduzindo a percepção de adstringência, que é causada por agliconas, que se desenvolveram em quantidades reduzidas. Os grãos inteiros de soja cozidos sob pressão (1,5 kgf/cm² a 127 °C) não houve formação de agliconas, e, conseqüentemente, não se percebeu diferença na adstringência. Os resultados sugerem que tratamentos que envolvem pré-aquecimento dos grãos favorecem a obtenção de produtos de soja com melhor sabor.

Os *off-flavours* são uma limitação na expansão do uso de produtos a base de soja, este problema decorre da presença de precursores ligados a proteínas da soja, sendo predominante os fosfolípidos, que contêm ácidos graxos poliinsaturados. A autoxidação destes ácidos graxos gera várias classes de compostos voláteis que contribuem para o sabor de “grama” ou “verde”. Além disso, vários compostos polifenólicos, como isoflavonas, saponinas, ácidos fenólicos, conferem gostos amargos e adstringentes a soja (DAMODARAN; ARORA, 2013).

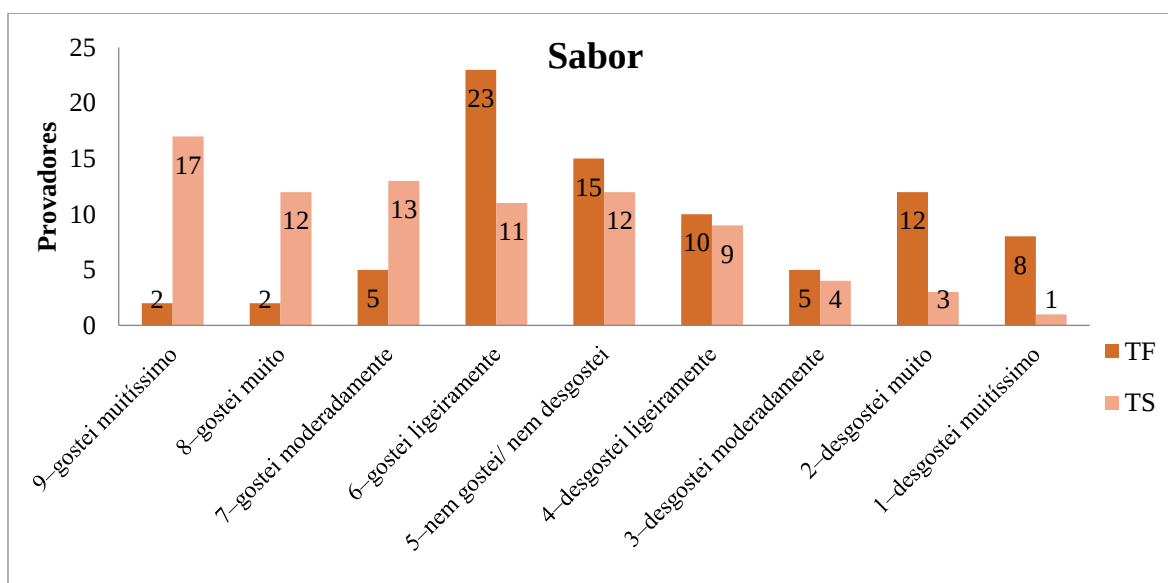


Figura 21 - Avaliação sensorial quanto ao sabor dos hambúrgueres de *tempeh*

Nos resultados da impressão global, exibidos da Figura 22, 51,21% optaram por gostei muitíssimo sobre a impressão global do TF, de modo geral, sendo somente 8,53% dos provadores gostaram muitíssimo. Resultado bem discrepante em relação ao TS, onde 68,29% gostaram da impressão global do produto em diferentes intensidades, sendo, 23,17% gostaram muitíssimo. Do total de provadores, 30 desgostaram do TF e 20 do TS. A impressão global

retrata um apanhado de elementos pré julgados que define a apreciação do provador em relação ao produto. Neste caso, o TS obteve nota maior que TF, apresentando melhor desempenho em todos os outros atributos, como demonstrado na Tabela XVIII.

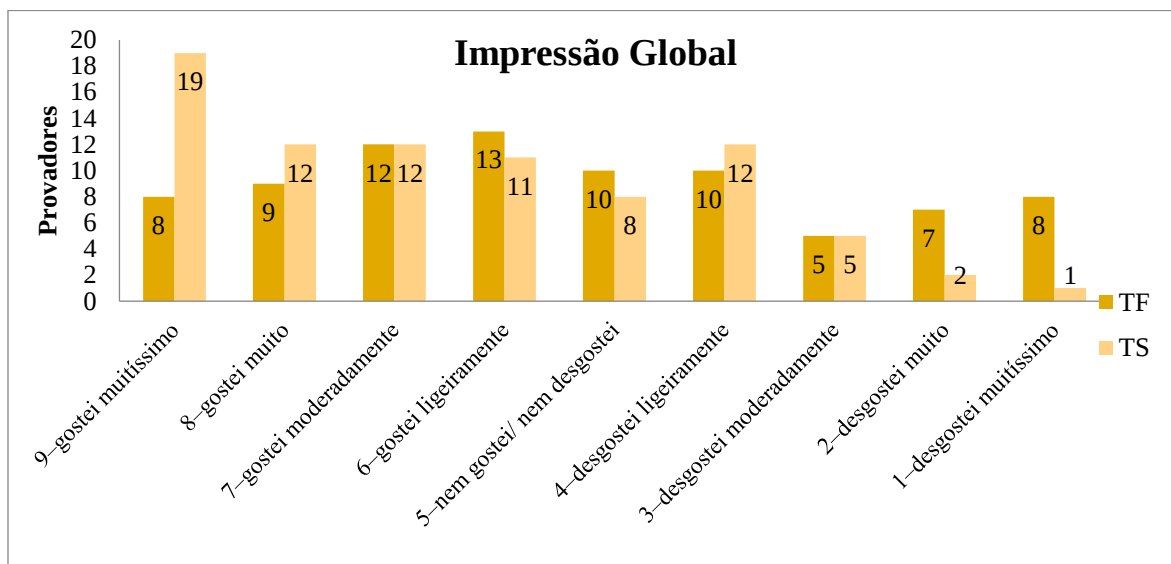


Figura 22 - Avaliação sensorial quanto à impressão global dos hambúrgueres de *tempeh*

Tabela XVIII- Pontuação geral da análise sensorial de hambúrgueres de *tempeh* de feijão e de soja

Identificação	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global
TF	6,84±0,01 ^a	5,84±0,02 ^b	4,5±0,02 ^b	5,28±0,01 ^b
TS	6,93±0,01 ^a	6,54±0,01 ^a	6,35±0,01 ^a	6,40±0,02 ^a

* Médias aritméticas simples, de três determinações ± desvio padrão, seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

Na avaliação geral para os *tempehs*, o TS obteve maior nota média em todos os atributos, porém não houve diferença significativa no atributo aparência, o que demonstra que os dois *tempehs* têm aparências semelhantes. Para que o *tempeh* fosse considerado com boa aceitação, a nota deve ser de valor maior que 5 (cinco). Notas abaixo de 5, foram consideradas insatisfatória para considerar o *tempeh* aceito no julgamento dos provadores, sendo reprovadas.

Honório et al., (2017) elaboraram hambúrguer de feijão com frango e submeteram este produto à avaliação sensorial, observaram que a média das notas variaram de 8,01 para aroma e 8, 27 para textura e a avaliação da intenção de consumo e compra do produto apresentaram médias de 5,973 e 5,797 respectivamente.

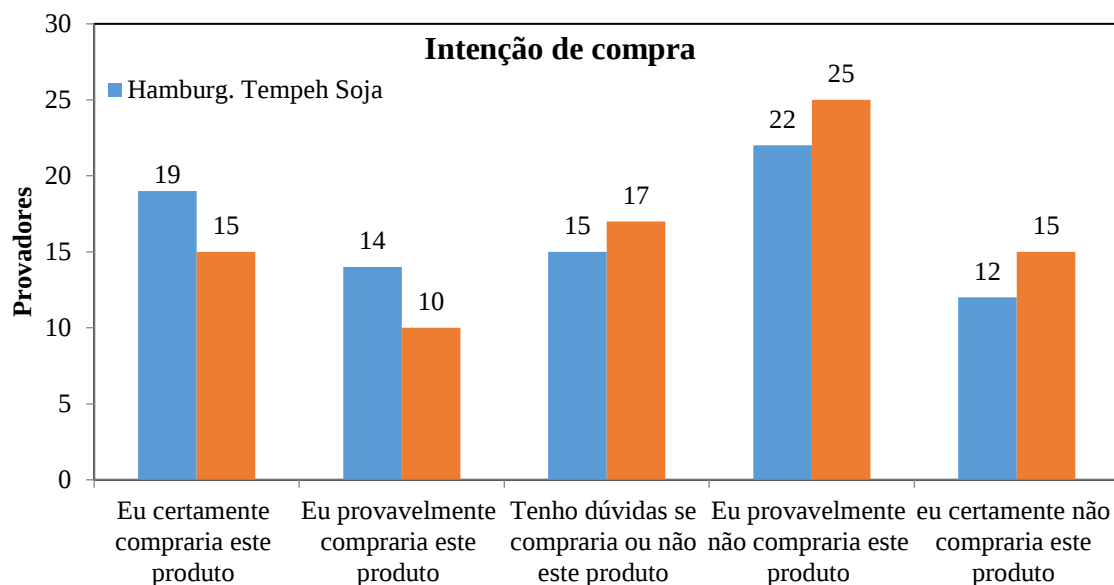


Figura 23 - Avaliação sensorial quanto intenção de compra dos hambúrgueres de *tempeh*

A intenção de compra para o hambúrguer de *tempeh* de soja é maior que o de feijão, o que é condizente com os resultados anteriores. 40,24% dos provadores comprariam o TS e 30,48% comprariam TF. Hambúrguer pode ser uma das possibilidades de aplicação do *tempeh*, porém o fato da intenção de compra não ter sido maior, se deve pelo fato dos consumidores associarem o hambúrguer a características de suculência, odor de fritura e cor mais escura. Ao se depararem com as amostras, a expectativa que se cria para o consumo deste alimento é quebrada pela diferença dos hambúrgueres tradicionais e o de *tempeh*.

Segundo Shurtleff et al., (2011) na década de 1980, hambúrguer de *tempeh* de soja foram utilizados para promover o consumo de *tempeh*. Eram vendidos na Europa e EUA, com apelo de saudável e como substituto de carne bovina.

3 CONCLUSÃO

O *tempeh* de soja obteve resultado melhor em todos os atributos avaliados, porém a necessidade de aprimoramento da técnica de produção de *tempeh* e novos ingredientes para a confecção dos hambúrgueres são importantes para obter maior aceitabilidade deste novo produto. O *tempeh* de feijão comum é um produto inovador que contribui para o aproveitamento de feijões depreciados, além de alternativa para o consumo de alimentos saudáveis. O fomento aos novos produtos de feijão promove a exposição do *tempeh* e desperta à curiosidade do consumidor em consumir produtos não convencionais.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Goiás e à EMBRAPA Arroz e Feijão pelo apoio científico, e utilização do Laboratório de Grãos e Subprodutos e à Faculdade Metropolitana de Anápolis.

REFERENCIAS

DANTAS, M.I.S.; DELIZA, R.; MINIM, V.P.R.; HEDDERLEY, D. Avaliação da intenção de compra de couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.4, p. 762-767, 2005.

DAMODARAN, S.; ARORA, A. Off-flavor precursors in **SOY PROTEIN ISOLATE AND NOVEL** strategies for their removal. **Annual review of food science and technology**. vol. 4:327-346 (volume publication date february 2013) first published online as a review in advance on january 3, 2013.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 2.ed. Curitiba: Champagnat, p.239, 2007

LOTUS. Alimentação Saudável. Sabor e saúde com *tempeh*. **Jornal Lotus**. Disponível em: <http://www.jornallotusbemestar.com.br/jornal/alimentacao-saudavel/sabor-e-saude-com-tempeh>. Acesso em: 06 jun. 2017.

LEITE, R. S. **Farinha de Tempeh Liofilizado ou Torrado na Formulação de Biscoitos de Coco em Substituição Parcial à Farinha de Soja: Elaboração e Caracterização**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos Dissertação de Mestrado, Londrina, 2013.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. P.; FERREIRA, S. H. P.; OLIVEIRA, M. C. N.; KITAMURA, K. **Effects Of Isoflavones On Beany Flavor And Astringency Of Soymilk And Cooked Whole Soybean Grains.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.34, n.6, p.1045-1052, jun. 1999.

OWENS, J. D, ASTUTI, M and KUSWANTO, K.R. **Tempe and Related Products.** Memoirs of the Tokyo University of Agriculture 2015.

PIRES, Christiano Vieira. **Caracterização Bromatológica E Digestibilidade In Vitro De Proteínas De Cultivares De Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** Tese doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais-Brasil 2002.

RACKIS, J. J.; SESSA, D. J; HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. **J. Amer. Oil chem.**, San Diego, v. 56, n. 6, p. 262-271, 1979.

SHURTLEFF, William; AOYAGI, Akiko. **History of tempeh and tempeh products (1815-2011): extensively annotated bibliography and sourcebook.** Soyinfo Center P.O. Box 234 Lafayette, CA 94549-0234 USA (2011).

STARZYNSKA-JANISZEWSKA, Anna; Bozena STODOLAK and Barbara MICKOWSKA. Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of *tempeh* obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Sci Food Agric**2013; 94: 359–366.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *tempeh* poderá ser uma alternativa interessante para o aproveitamento de grãos de baixo valor comercial sendo um produto inovador que contribui para o aproveitamento de feijões depreciados, além de alternativa para o consumo de alimentos saudáveis. A recomendação do consumo de *tempeh* deve ser baseada em estudos científicos que demonstrem seus efeitos benéficos à saúde e a investigação científica contínua proporciona uma melhor concepção e uma maior ciência sobre a identificação dos componentes benéficos, mecanismos de ação, função, aspectos nutricionais e de saúde do *tempeh*. O fomento aos novos produtos de feijão promove a exposição do *tempeh* e desperta à curiosidade do consumidor em consumir produtos não convencionais.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PPGCTA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **UTILIZAÇÃO DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) NA ELABORAÇÃO DE TEMPEH**

Nome da Pesquisadora Orientadora: Priscila Zaczuk Bassinello

Nome da Pesquisadora assistentes/aluna: Aline Oliveira Colombo

Sra/ Sr. _____ está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade desenvolver tempeh de feijão. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através da pesquisadora do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

É importante salientar que o produto é seguro, que não trará riscos a saúde e nem causará efeitos colaterais. Os riscos que podem estar associados a estas análises são o de alergia a qualquer dos seus ingredientes: feijão e produtos fermentados. Não há grupo de risco específico para restrição em relação ao consumo do produto, excluindo-se os alérgicos, como citado anteriormente. Caso ocorra alguma reação adversa após o consumo do produto, o pesquisador responsável assumirá todos os danos provocados à saúde do indivíduo e tomará as providências necessárias, inclusive encaminhamento para atendimento médico e este será feito através do acionamento da equipe de primeiros socorros especializada, o SAMU pelo telefone 192. Orienta-se que após a

PPGCTA – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CNPJ: 01567601 – 0001/43. Campus Samambaia. CEP: 74690-900. Escola de Agronomia. Campus Samambaia. Fone: 062 3521-1000. Goiânia - Goiás



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PPGCTA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



participação o indivíduo permaneça no local de aplicação da análise pelo período de 30 minutos decorridos a partir da ingestão do produto e não realize atividades como dirigir, para que em caso de reações adversas possa ser seguido o procedimento de socorro descrito acima.

O (a) senhor(a) tem o direito de pleitear indenização em caso de danos decorrentes de sua participação na pesquisa.

Ao participar desta pesquisa o (a) senhor (a) colaborará para melhor conhecimento dos atributos sensoriais deste produto. O (a) senhor (a) não terá nenhuma despesa ao participar desta pesquisa bem como nada será pago por sua participação. É garantido o sigilo das informações prestadas, assegurando sua privacidade quanto aos dados confidenciais na pesquisa. O resultado da avaliação dos provadores será de uso exclusivo nesta pesquisa e de acesso restrito aos pesquisadores. No curso da pesquisa o senhor(a) tem os seguintes direitos:

a) Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta;

b) Liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento;

c) Garantia de que caso haja algum dano a sua pessoa, os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável, inclusive acompanhamento médico e hospitalar (se for o caso).

As informações serão apresentadas no trabalho sem que haja a possibilidade de você ser identificado. Os resultados deste estudo servirão como subsídio para a elaboração de trabalhos científicos.

Caso haja, gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelos pesquisadores. Nos casos de dúvidas contate os pesquisadores, a fim de resolver o problema, podendo as ligações ser feitas a cobrar (Pesquisador Principal: Dra. Priscila Zaczuk Bassinello - Tel: (62) 3533-2103, demais pesquisadores: Aline Oliveira Colombo – Tel: (62) 99198-

PPGCTA – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CNPJ: 01567601 – 0001/43. Campus Samambaia. CEP: 74690-900. Escola de Agronomia. Campus Samambaia. Fone: 062 3521-1000, Goiânia - Goiás



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PPGCTA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



1226), ou caso se torne necessário poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (062-35211215). Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

PPGCTA – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CNPJ: 01567601 – 0001/43, Campus Samambaia. CEP: 74690-900. Escola de Agronomia. Campus Samambaia. Fone: 062 3521-1000. Goiânia - Goiás



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PPGCTA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____,
CPF/Matrícula nº _____, após ter recebido todos os
esclarecimentos e assinado o TCLE, confirmo recebimento de todos os esclarecimentos
necessários, e concordo em participar desta pesquisa. Desta forma, assino este termo,
juntamente com o pesquisador, em duas vias de igual teor, ficando uma via sob meu
poder e outra em poder do pesquisador.

Goiânia, _____ de _____ de 2017.



Impressão Digital do Participante

Assinatura do Participante

Assinatura do pesquisador

PPGCTA – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos
CNPJ: 01567601 – 0001/43. Campus Samambaia. CEP: 74690-900. Escola de Agronomia. Campus
Samambaia. Fone: 062 3521-1000. Goiânia - Goiás

ANEXO B



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Utilização do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na elaboração de tempeh

Pesquisador: Aline Oliveira Colombo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 60631116.6.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.978.775

Apresentação do Projeto:

Utilização do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na elaboração de tempeh.

Responsável: Aline Oliveira Colombo. Equipe: Priscila Zaczuk Bassinello. N.CAAE: 60631116.6.0000.5083.

O presente projeto tem o objetivo de desenvolver, por meio de fermentação sólida, tempeh a partir de feijão carioca sem casca e comparar suas

propriedades nutricionais, funcionais, tecnológicas e sensoriais ao tradicional tempeh elaborado com soja.

Importante também para promover a produção de novos produtos elaborados com feijão, alimentos funcionais, diversificando as opções de alimentos e ampliando o potencial de consumo de pulses.

Objetivo da Pesquisa:

presente projeto tem o objetivo de desenvolver, por meio de fermentação sólida, tempeh a partir de feijão carioca sem casca e comparar suas propriedades nutricionais, funcionais, tecnológicas e sensoriais ao tradicional tempeh elaborado com soja.

O tempeh é um alimento fermentado com um fungo do gênero *Rhizopus*, a partir de sementes de soja branca.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como benefícios tem-se o desenvolvimento de novos produtos elaborados com feijão, se

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.978.775

constituindo em alimentos funcionais, diversificando as opções de alimentos e ampliando o potencial de consumo de pulses.

O produto que será desenvolvido já é consumido por populações orientais há centenas de anos, a novidade seria a matéria prima utilizada, porém, esta também já faz parte da dieta da população. Os riscos estão diretamente relacionados à possibilidade de contaminação microbiológica e presença de alergênicos oriundos da composição da matéria prima e ingredientes de elaboração do tempoh.

Comentários: garantem em caso de efeitos adversos o acompanhamento do participante até a unidade de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto encontra-se muito bem estruturado, com metodologia clara e objetiva, porém, no que diz respeito à análise sensorial, será realizada na Faculdade de Nutrição, Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal de Goiás e na EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, no Laboratório Cozinha Experimental, localizado em Santo Antônio de Goiás, GO. Os laboratórios possuem cabines próprias para a análise, assim como luz adequada e cozinha de apoio.”

Os participantes serão colaboradores da EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, estudantes da UFG ou qualquer pessoa que deseje participar. Serão recrutados de forma aleatória, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que não estejam consumindo medicamento ou enfermos. Os provadores preencherão um TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos exigidos.

TCLE: garante o sigilo do participante, o direito à indenização e a forma de acompanhamento

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa, smj deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.978.775

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TCLE_FINALIZADO.pdf	23/03/2017 08:13:25	João Batista de Souza	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_771830.pdf	09/03/2017 10:27:20		Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento.docx	03/03/2017 07:33:21	Aline Oliveira Colombo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_Tempeh.doc	03/03/2017 07:31:30	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Brochura.docx	03/03/2017 07:31:15	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Outros	ANUENCIA_TOTALE.pdf	03/10/2016 20:34:40	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Outros	ANUENCIA_EMBRAPA.pdf	03/10/2016 20:34:19	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Outros	ANUENCIA_EA.pdf	03/10/2016 20:33:59	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Outros	Ficha_Sensorial.pdf	03/10/2016 20:33:17	Aline Oliveira Colombo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	03/10/2016 20:32:54	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	03/10/2016 20:32:29	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	03/10/2016 20:32:01	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	03/10/2016 20:31:37	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Brochura Pesquisa	BROCHURA_PROJETO.pdf	03/10/2016 20:31:25	Aline Oliveira Colombo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/10/2016 20:31:05	Aline Oliveira Colombo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 1.978.775

Não

GOIANIA, 23 de Março de 2017

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com