

TEMPEH DE FARELO DE SOJA

ELY NAHAS

Orientador: DR. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Abril, 1978

A meus pais,
à Maria Amália,
à Flávia e
ao Fábio.

A G R A D E C I M E N T O S

É com satisfação que agradeço a todas as pe
soas e entidades que contribuíram para a realização deste traba
lho:

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, pela orientaç
ção e estímulo durante todo o decurso do mesmo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Dutra de Oliveira, pel
as facilidades proporcionadas para a realização do ensaio
biológico;

À Profa. Dra. Maria Amélia Chaib Moraes, pela
participação e auxílio no desenvolvimento da parte experimenta
l no setor de análise sensorial;

À Profa. Dra. Ruth dos Santos Garrutti, pelo
planejamento da análise sensorial e facilidades no uso do respe
ctivo laboratório;

Aos colegas Profs. José F. Durigan, José F. Pedr
as, José O. Machado, Manoel Victor F. Lemos, Pedro M. Lacava
va, Ruben Pablo Schocken e Sérgio N. Kronka, pelas valiosas
sugestões.

Aos Srs. Antonio Luiz Sartori e Izaltino Rocha
e Silva Filho e à Srta. Eliana Aparecida M. Ferreira, pelos
auxílios prestados;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veteriná
rias "Campus" de Jaboticabal, onde este trabalho foi realizado
do;

Aos demais professores, colegas e pessoas que
direta ou indiretamente contribuíram para a sua execução.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Torta e farelo de soja.....	5
3.2. Tempeh.....	6
3.2.1. Tipo de materiais utilizados e seu <u>pre</u> <u>paro</u>	7
3.2.2. Espécies de fungos utilizadas.....	9
3.2.3. Inóculo.....	10
3.2.4. Recipientes de fermentação.....	11
3.2.5. Temperatura e tempo de fermentação.....	12
3.2.6. Características bioquímicas e <u>biolôgi</u> <u>cas</u>	13
3.2.7. Utilização.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Material.....	16
4.1.1. Farelo de soja tostado.....	16
4.1.2. Suplementos.....	16
4.1.3. Soja em grão.....	17
4.2. Métodos.....	17
4.2.1. Procedimento tecnológico.....	17
4.2.1.1. Produção do tempeh de farelo de soja.....	17
4.2.1.2. Produção de tempeh de grãos de soja.....	18
4.2.1.3. Tratamentos.....	18

	Página
4.2.1.4. Desenvolvimento de <i>R. oligosporus</i> no farelo adicionado dos diversos suplementos.....	19
4.2.1.5. Rendimento e perdas.....	19
4.2.2. Análises bioquímicas.....	20
4.2.2.1. Material para as análises.....	20
4.2.2.2. Umidade.....	20
4.2.2.3. pH.....	20
4.2.2.4. Cinzas.....	20
4.2.2.5. Matéria graxa.....	20
4.2.2.6. Proteína total.....	21
4.2.2.7. Proteína verdadeira.....	21
4.2.2.8. Proteína dispersa.....	22
4.2.2.9. Fibra crua.....	22
4.2.2.10. Carboidratos.....	22
4.2.3. Avaliação biológica da qualidade da proteína.....	22
4.2.3.1. Coeficiente de utilização proteica (CUP).....	22
4.2.4. Análise sensorial.....	23
4.2.5. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Tempeh de farelo de soja.....	26
5.2. Rendimento, pH e umidade.....	33
5.3. Composição centesimal.....	36
5.4. Valor nutritivo.....	40
5.5. Análise sensorial.....	43
6. CONCLUSÕES.....	45
7. SUMMARY.....	47
8. LITERATURA CITADA.....	49

1. RESUMO

Verificou-se a possibilidade de fermentação do farelo de soja, subproduto da indústria de óleo, a fim de se produzir um produto similar ao tempeh, alimento oriental, originalmente elaborado a partir de grãos de soja cozidos. O processo tecnológico mostrou a necessidade de adição ao farelo de soja de no mínimo 30% de um suplemento de carboidrato, dos quais foram utilizados farinha de mandioca, fubá e farelinho de arroz, de 3,5% de ácido cítrico a fim de reduzir o pH para 4,5 e de 150% de água destilada do peso da mistura farelo-suplemento. Após fermentação, que foi conduzida em placas de Petri por meio de *Rhizopus oligosporus*, à temperatura de 35 - 37°C, por 24 horas, obteve-se um produto que se chamou de tempeh de farelo de soja (TFS), que se assemelhou a um bolo compacto, de coloração branca e de odor agradável, de frutas, algo alcoólico.

Analisou-se o TFS, em cotejo com o tempeh e o farelo de soja, quanto às características bioquímicas, biológicas e sensoriais. Os resultados mostraram um produto com igual teor de proteína total, menor teor de óleo e quantidades superiores de fibra crua, cinzas e carboidratos que o tempeh. A fermentação não variou a composição centesimal do farelo, exceto para matéria graxa, e nem melhorou o teor de

proteína crua quando se comparou o TFS com o farelo, porém, aumentou de 3,3 - 3,5 vezes o teor de proteína dispersa indicando uma melhoria da digestibilidade do TFS. O coeficiente de utilização protéica não foi alterado pela fermentação, porém se mostrou equivalente ao padrão de caseína e superior ao tempeh. A análise sensorial revelou que o TFS é de aceitação regular, à semelhança do tempeh.

2. INTRODUÇÃO

Ao se consultar a literatura sobre nutrição, verifica-se que inúmeros problemas são levantados, em todas as partes do mundo, ressaltando as diversas formas de conseqüências de uma alimentação deficiente ou desequilibrada. Dentre essas conseqüências, a mais grave está na necessidade de se satisfazer os requerimentos protéicos, principalmente de crianças dos seis meses aos seis anos e de mulheres em gestação ou lactação. A deficiência de proteínas constitui o fator mais importante da mortalidade infantil, acarretando também retardamento no desenvolvimento físico e mental, predispondo crianças e adultos às enfermidades e tornando adultos incapacitados ou com baixa produtividade para o trabalho.

Com base nesses aspectos, inúmeros países vem se esforçando em encontrar soluções no sentido de resolver os vários problemas nutrimentais e melhorar os padrões alimentares de diversas partes do mundo, inclusive no Brasil. Para isso, programas integrados são desenvolvidos sob a égide de organismos internacionais como UNICEF (United Nations International Children's Fund), FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World's Health Organization) e nacionais como PRONAN (Programa Nacional de Alimentação e Nutrição, instituído a 30/03/1973), com a ajuda, ainda, de diversas fundações particulares.

Devido aos fatores limitantes de se conseguir proteína de origem animal, a pesquisa está dirigida para a obtenção de proteínas vegetais, de baixo custo, particularmente de resíduos das sementes de plantas oleaginosas, como soja, amendoim, algodão, côco, gergelim e girassol.

Um dos resíduos mencionados que parece bastante promissor, tanto pela sua riqueza em nutrientes como pela necessidade de pesquisas para seu melhor aproveitamento, é o farelo de soja, subproduto da indústria de óleo. A produção de soja em 1976 foi da ordem de aproximadamente 11.227 mil t, no Brasil (BRASIL. Fundação IBGE, 1976). Deste total 80%, aproximadamente, constituem o resíduo da extração de óleo e que é utilizado, especialmente, na alimentação de animais.

O processamento da soja (grãos) por fermentação microbiana dá um alimento conhecido na Indonésia por tempeh. À semelhança desse produto que é fermentado para produzir tempeh, inúmeros outros alimentos são produzidos por fermentação microbiana, em várias partes do mundo, a partir dos mais diferentes substratos, como amendoim, trigo, arroz, cidra, leite, milho, etc.

Tendo em vista as qualidades nutritivas da soja, as vantagens que o processo fermentativo de preparo desse alimento oferece, pretendeu-se, nesse trabalho, avaliar os efeitos desse método sobre a elaboração de tempeh de farelo de soja, subproduto da indústria de óleo, bem como caracterizar suas qualidades bioquímicas, nutrimentais e organolépticas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Torta e farelo de soja

Segundo ROHR (1973), as tortas ou farelos são produtos resultantes da extração de óleo, possuindo em geral reduzido teor de óleo e com seu componente protéico ligeiramente acidificado. A diferenciação entre esses produtos, ainda segundo o mesmo autor, baseia-se no tipo de extração: na torta, a extração é realizada por prensas mecânicas e no farelo é por solvente com posterior moagem. Uma variação nesses processos, verificada na indústria, consiste na extração da maior quantidade de óleo por prensas, e depois por solvente.

O teor de proteína varia de 40,5 - 49,0% (PION, s/d; ORR e ADAIR, 1967) ou, ainda, de 40 a 55% (COSTA et alii, 1976). O teor de aminoácidos da torta de soja (PION, s/d) aproxima-se ao da soja em grão (PION, 1973; EVANS e BANDEMER, 1967) apresentando, portanto, as mesmas deficiências nos aminoácidos sulfurados.

O valor nutritivo da soja decorre de suas proteínas, por serem muito semelhantes às animais e humanas (BRASIL. Ministério do Interior (b), s/d). Quanto ao farelo da soja, o seu alto teor de proteína de boa qualidade (COSTA et alii, 1976) tornam-no um alimento bastante promissor no sentido de satisfazer as necessidades protéicas.

Devido ao aquecimento, tanto na extração do óleo por prensas como por solvente, ocorre desnaturação, apresentando assim menor teor de proteína solúvel que a soja em grão (BELTER e SMITH, 1952). Porém, o aquecimento da soja no processo de extração melhora o valor protéico, porque ocorre destruição de fatores antinutricionais como o inibidor de tripsina e a atividade de urease (van BUREN et alii, 1964). Segundo COSTA et alii (1967), no processo de extração há realização da tostagem do farelo, onde se conjuga tempo-temperatura-umidade com a finalidade estrita de inibir fatores antinutricionais que ocorrem na soja.

3.2. Tempeh

Produto de grande importância para a Indonésia e Surinam e de relativa importância para a Holanda, constitui o resultado da fermentação fúngica dos grãos de soja previamente cozidos. Seu valor nutritivo tem dado ensejo à realização de inúmeras pesquisas em diversos países do globo, como Estados Unidos, Japão, Indonésia, Holanda e outros, inclusive o Brasil.

O método original do preparo do tempeh na Indonésia consta em linhas gerais do seguinte (STEINKRAUS et alii, 1960; DJIEN e HESSELTINE, 1961; HESSELTINE, 1965): a soja é imersa em água fria, corrente ou não, por uma noite ou em água quente por tempo curto. A casca dos grãos, imersos na água, é removida manualmente ou através da pisadura com os pés descalços, de onde fica flutuando e é eliminada. A seguir, a soja é fervida por cerca de meia hora a fim de amolecê-la e destruir os microrganismos contaminantes. A água de cozimento é eliminada e então a soja é espalhada em camadas finas para evaporação da água da superfície. A soja assim seca é inoculada através de raspagens da superfície do produto já fermentado e posteriormente mantida envolta em

folhas de banana para fermentar em lugar quente. O tempeh resultante é um bolo compacto que pode ser cortado, seco ou não, assado, cozido ou frito.

Os métodos utilizados em laboratório (e moderadamente) variam de autor para autor. O fluxograma apresentado na Fig. 1, adaptado de HESSELTINE e WANG (1967) menciona as etapas gerais do processo.

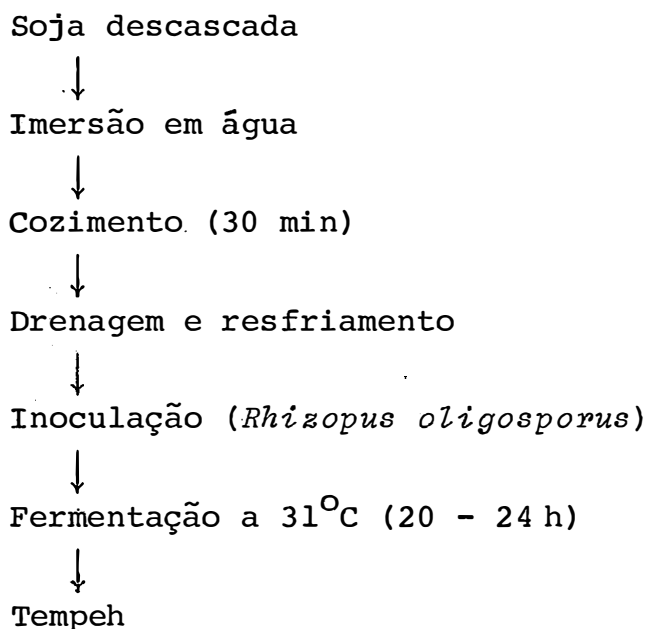


Fig. 1 - Fluxograma de produção do tempeh (HESSELTINE e WANG, 1967).

Com base na literatura consultada, pode-se subdividir o processo geral de produção de tempeh em etapas que serão apresentadas a seguir:

3.2.1. Tipo de materiais utilizados e seu preparo

De modo geral, a soja em grão constitui o material predominante para o preparo do tempeh, então denominado tempeh kedele (kedelle = grão de soja). Porém a literatura menciona, ainda, o uso da torta de côco (van VEEN e SHAEFER, 1950) e de copra (HESSELTINE, 1965).

Foi empregada a soja das variedades Araçatuba (LEITÃO et alii, 1967/68; CAMARGO, 1969), Clark (HACKLER et alii, 1964; STEINKRAUS et alii, 1965), Harosoy (MURATA et alii, 1967), Hawkeye (SMITH et alii, 1964; MARTINELLI e HESSELTINE, 1964) ou Seneca (STEINKRAUS et alii, 1960), sendo que os grãos podiam ser utilizados inteiros, quebrados em 6 a 8 pedaços ("grits") ou na forma de lascas ("chips") (SMITH et alii, 1964). A soja em grãos, previamente selecionada e lavada, é adicionada água na proporção, respectivamente, de 1:3 e ácido láctico no teor de 1% (STEINKRAUS et alii, 1960; ROELOFSEN e TALENS, 1964) ou até pH 4,0 (LEITÃO et alii, 1967/68), mantendo-se assim por uma noite ou 24 horas. HACKLER et alii (1964) incluíram uma fase anterior compreendida pela secagem da soja em estufa com circulação de ar quente, a 104°C por 10 min, seguida de moagem para a retirada da casca. MURATA et alii (1967) utilizaram ácido acético no teor de 0,25%, em vez de ácido láctico, com posterior fervura por 2 horas, seguida de imersão em solução quente de ácido acético a 0,25% por 5 min.

Após o período de imersão, a solução ácida é drenada, procede-se ao descascamento dos grãos, operação que é facilitada se realizada em recipiente com água corrente ou não de modo que a casca, que flutua, é eliminada. Segundo ROELOFSEN e TALENS (1964), após a fase de imersão, a soja é fervida por 10 min, seguindo-se a retirada da água e descascamento.

Retirada a casca, a soja é fervida a 100°C, empregando-se a mesma solução de ácido láctico, pelo período de tempo de 90 min (STEINKRAUS et alii, 1960; HACKLER et alii, 1964) ou 40 min (LEITÃO et alii, 1967/68). A seguir, elimina-se a solução de fervura e deixa-se esfriar os grãos, estendidos sobre toalhas de modo a permitir a secagem superficial, até a temperatura baixar a 31 ou 37°C, quando serão inoculados. A secagem pode ser realizada, também, segundo ROELOFSEN e TALENS (1964), em estufa a 60°C até que a umidade anterior

de 64% diminua para 55%. HACKLER et alii (1964) procederam ao resfriamento rápido dos grãos, mantendo-os a 5°C.

WANG e HESSELTINE (1966) e WANG et alii (1968) obtiveram, respectivamente, tempeh de trigo e de uma mistura de trigo com soja, a partir de produtos lavados e quebrados; o tempo de fervura foi de 12 min para o trigo e de 25 min para a soja.

3.2.2. Espécies de fungos utilizadas

DJIEN e HESSELTINE (1961) mencionam que ao menos quatro espécies podem ser utilizadas para produzir tempeh: *Rhizopus stolonifer*, *R. oligosporus*, *R. oryzae* e *R. arrhizus*. HESSELTINE (1965) acrescenta mais duas espécies à lista anterior, *R. formosaensis* e *R. achlamydosporus*, porém, menciona que, embora outros fungos pudessem ser isolados de tempeh, apenas *Rhizopus* produziria esse produto, sendo *R. oligosporus* a principal espécie usada na Indonésia.

Apesar disso, STEINKRAUS et alii (1965) obtiveram as mesmas mudanças químicas, porém não as mesmas características organoléticas, com a utilização do fungo *Neurospora* sp, isolado de um alimento indonésio chamado "ontjom", para fermentação de soja. DIOKNO PALO e PALO (1968) testaram, ainda, duas espécies de fungo filipinas, *Rhizopus* sp A-12680 e *Cunninghamella elegans* A-12679 com *R. stolonifer*, concluindo que a primeira espécie produz um tempeh mais compacto, com melhor "flavor" e maior crescimento fúngico que as demais.

van VEEN e SHAEFER (1950) mencionam *R. oryzae* como a espécie utilizada na ilha de Java. Na Holanda, ROELOFSEN e TALENS (1964) empregaram a espécie *R. arrhizus*. As demais citações bibliográficas mencionam a utilização da espécie *R. oligosporus* NRRL 2710, isolada de tempeh da Indonésia. CAMARGO (1969) estudou, com base na atividade proteolítica, 43 variedades de fungos, concluindo que *R. oligosporus* SAITO foi a única espécie que apresentou resultados positivos para todos os ensaios realizados.

3.2.3. Inóculo

O tipo e a quantidade de inóculo são variáveis. Os tipos utilizados são os seguintes: A) meio de cultura esporulado, liofilizado e pulverizado (STEINKRAUS et alii, 1960 e 1965; HACKLER et alii, 1964); B) tempeh seco ou liofilizado e pulverizado (ROELOFSEN e TALENS, 1964; MURATA et alii, 1967); C) suspensão de esporos obtida pela adição de água destilada ao meio de cultura inclinado e esporulado (HESSELTINE, 1965; MARTINELLI e HESSELTINE, 1964; WANG e HESSELTINE, 1966). Embora a diversidade de tipos de inóculo utilizada pelos autores, o tipo C tem sido empregado em cultivos em escala de laboratório e os tipos A e B, em maior escala. A quantidade de inóculo variou do seguinte modo: 1% do peso da soja crua de (A) (MURATA et alii, 1967); o inóculo B foi utilizado nos teores de 2g (HACKLER et alii, 1964) ou 3g (STEINKRAUS et alii, 1965) por kg de soja crua e 1g/kg de soja cozida (STEINKRAUS et alii, 1960); o inóculo (C) foi empregado na quantidade de 2 ml/100g de soja (MARTINELLI e HESSELTINE, 1964), 0,5 ml/35g de trigo (WANG e HESSELTINE, 1966) ou 1g/40 g de soja (CAMARGO, 1969).

Após a inoculação, procede-se à mistura para distribuição do fungo pelos grãos de soja cozida.

Para preparar o meio de cultura, STEINKRAUS et alii (1960) utilizaram 100 g de farinha de trigo umidecida com 300 ml de uma solução ácida (onde foi previamente imersa soja), esterilizada a 120°C por 20 min. O fungo semeado nesse meio de cultura é mantido a 37°C por 7 dias (com o que obtiveram esporulação pesada), sendo posteriormente liofilizado e moído (20 mesh). Uma variação desse método foi utilizada por STEINKRAUS et alii (1965), apresentada no fluxograma da Fig. 2.

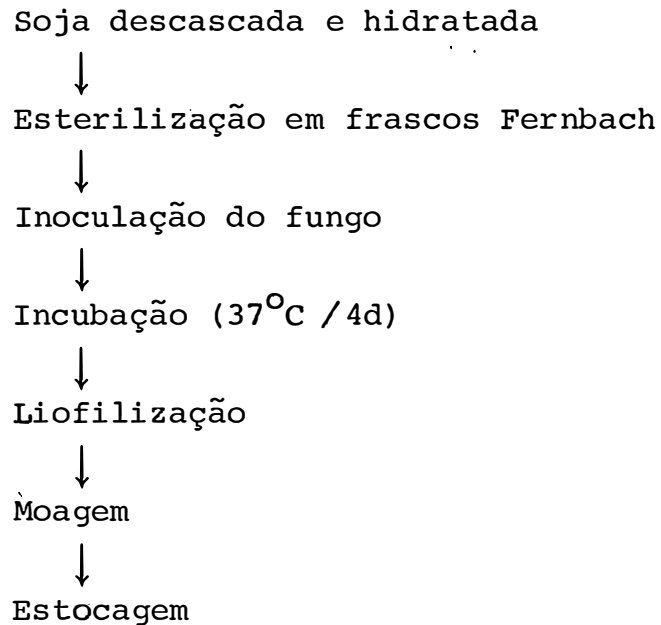


Fig. 2 - Produção de inóculo de *R. oligosporus*, segundo STEINKRAUS et alii (1965).

3.2.4. Recipientes de fermentação

Para a produção de um bom tempeh, há necessidade de um perfeito controle da aeração: excesso de aeração favorece a esporulação, o que é indesejável; com falta de aeração, o fungo não se desenvolve. Esses aspectos tem levado os pesquisadores a tentarem as condições ótimas de aeração. Em escala de laboratório, WANG e HESSELTINE (1966), HESSELTINE (1965) e CAMARGO (1969) relataram o uso de placas de Petri como recipiente de fermentação, desde que se tome o cuidado de deixar um mínimo de espaço vazio entre a soja e a tampa da placa (CAMARGO, 1969). Outros tipos de recipientes mencionados pela bibliografia, bandejas de aço inoxidável, de plástico ou de madeira e sacos plásticos foram utilizados para produção de tempeh em maior quantidade, dependendo das possibilidades e das finalidades do trabalho. STEINKRAUS et alii (1960) utilizaram bandejas metálicas com furos de aproximadamente 3,0 mm, a cada 5,0 cm, no fundo e tampa; HACKLER et alii

(1964) usaram bandejas de tampa metálica de 25,4 x 35,6 x 6,4 cm e 2,54 cm de profundidade, ou então, bandejas com fundo de malha de 35,6 x 79,3 x 1,27 cm; ROELOFSEN e TALENS (1964) empregaram caixas de polietileno de 10 x 20 x 3 cm, com tampa bem ajustada, com 6 furos de 2 mm de diâmetro na tampa e fundo; MARTINELLI e HESSELTINE (1964), além das bandejas metálicas, utilizaram sacos plásticos (20 x 38 e 13 x 21 cm) e tubos plásticos (10 cm de diâmetro) sendo a perfuração recomendada de 0,6 mm de diâmetro apresentando a distância de 1,3 cm entre centros; STEINKRAUS et alii (1965) empregaram recipientes para 3 kg de soja com 35 x 81 x 13 cm, cobertos com papel encerado; ainda, CAMARGO (1969) utilizou bandeja com fundo de Eucatex e divisões de madeira, de 44 x 34 x 6 cm, tendo 5 divisões iguais, com capacidade de 500 g de soja cada.

3.2.5. Temperatura e tempo de fermentação

A temperatura utilizada, conforme literatura consultada, para fermentação da soja variou de 27 a 37°C o que implicou numa amplitude de tempo para que o tempeh estivesse pronto, entre 18 e 24 horas. STEINKRAUS et alii (1960) utilizaram a temperatura de 37°C por 24 horas e HACKLER et alii (1964) empregando a mesma temperatura de fermentação, obtiveram uma redução do tempo para 18 horas, quando foi controlado o nível de umidade relativa em 80%. MURATA et alii (1967) afirmaram ter obtido um produto mais palatável com 48 horas de fermentação a 37°C. HESSELTINE (1965), WANG e HESSELTINE (1966), WANG et alii (1968) e CAMARGO (1969) utilizaram temperaturas entre 31 - 32°C, deixando fermentar por 20 a 24 horas. ROELOFSEN e TALENS (1964) empregaram um procedimento diferente, qual seja manter os recipientes de fermentação por 24 horas a 27°C e depois invertê-los e deixá-los por mais 24 horas.

Segundo MARTINELLI e HESSELTINE (1964), para produção de tempeh foram necessárias 80 horas a 25°C, 26 a

28°C e 22 - 24 horas a 31 e 37°C. Temperaturas superiores a 37°C favorecem o crescimento de bactérias contaminantes. A 31°C, a soja deveria permanecer por 15 - 16 horas na estufa e depois ser retirada para completar a fermentação à temperatura ambiente, porque durante o desenvolvimento do fungo a temperatura se eleva a 47 ou 49°C (STEINKRAUS et alii, 1960 e MARTINELLI e HESSELTINE, 1964) com perigo da inibição do fungo.

3.2.6. Características bioquímicas e biológicas

Com relação às transformações que ocorrem durante a fermentação, verifica-se um aumento no teor de fibra (STEINKRAUS et alii, 1960 e MURATA et alii, 1967) e de sólidos solúveis (STEINKRAUS et alii, 1960 e HESSELTINE, 1965). De um modo geral, o teor de nitrogênio não varia (STEINKRAUS et alii, 1965; WANG e HESSELTINE, 1966; MURATA et alii, 1967; LEITÃO et alii, 1967/68; CAMARGO, 1969). Por outro lado, verifica-se uma forte ação proteolítica (HESSELTINE, 1965; WANG e HESSELTINE, 1966), tendo o teor de aminoácidos livres aumentado de 1 a 85 vezes (MURATA et alii, 1967). Ocorre também forte ação lipolítica evidenciada pelo aumento no teor de ácidos graxos (WAGENKNECHT et alii, 1961; MURATA et alii, 1967; LEITÃO et alii, 1967/68). Com relação às vitaminas, há um aumento no teor de niacina e riboflavina (ROELOFSEN e TALENS, 1964; WANG e HESSELTINE, 1966; MURATA et alii, 1967) e de vitaminas B₆, ácido nicotínico e ácido pantotênico (MURATA et alii, 1967). De modo geral, o teor de tiamina ou se reduziu ou não aumentou.

Comparando o valor nutritivo do tempeh, WANG et alii (1968) confirmaram uma melhoria no crescimento de ratos alimentados com esse produto e no "PER", enquanto que SMITH et alii (1964) observaram redução no peso e no "PER" e HACKLER et alii (1964) e CAMARGO (1969) não obtiveram variação nessas características.

Os problemas de digestibilidade da soja são superados pelo produto fermentado, como ressaltado por HESSELTINE (1965), pelo fato do tempeh ter sido consumido por prisioneiros de guerra que mesmo sofrendo de disenteria e edemia nutricional conseguiram assimilar por este modo a soja.

3.2.7. Utilização

Segundo STEINKRAUS et alii (1960), o tempeh fresco e cru tem um odor limpo e agradável e um "flavor" semelhante a queijo. O produto frito possui um "flavor" de amêndoas aceitável. A esse respeito, CAMARGO (1969) concluiu, através de análise sensorial, pela aceitabilidade do tempeh, sendo que a variedade de soja Hardee apresentou melhor textura entre as outras variedades ensaiadas.

Como mencionam van VEEN e SHAEFER (1950), o tempeh não é consumido cru. Pode ser cortado, seco ou não, cozido ou frito (DJIEN e HESSELTINE, 1961). Porém, como o produto é perecível, deve ser consumido logo após a fermentação ou, então, conforme assinala HESSELTINE (1965), pode ser liofilizado ou aquecido levemente para destruir o fungo ou enzimas e então congelado. Nesse sentido, van VEEN e SHAEFER (1950) sugerem aquecimento a 150°C por aproximadamente 10 min.

A forma mais comum de consumir o tempeh, segundo o seu país de origem, é frito. Para isso STEINKRAUS et alii (1960 e 1965), ao realizarem a análise sensorial, cortaram o tempeh em fatias, salgaram em uma solução de sal a 10% e fritaram em excesso de óleo a 190°C até obter leve coloração castanha e encrespamento. CAMARGO (1969) analisou o tempeh produzido de diversas variedades de soja, tendo também empregado material cortado em fatias o qual foi frito em óleo de milho até coloração amarelo-dourada, com pequena adição de sal.

STEINKRAUS et alii (1965) mencionam que na Indonésia o tempeh desidratado (2 - 4% umidade) pode ser usado

frito ou cortado em cubos, misturado com vegetais e consumido com uma sopa onde ele se reidrata completamente em menos de 30 min a 100°C. Esses autores obtiveram o tempeh desidratado em 1/2 - 2 horas colocando cubos do material de 2,5 cm de lado em estufa com circulação forçada de ar, a 93°C. Mencionam também que essa última forma de consumo não foi aceita pelo povo norte-americano que preferiu misturá-lo com 25% de arroz ou 50% de milho doce desidratado, na forma de sopa.

Finalmente, ILJAS et alii (1970) mostraram que não há diferença na aceitação do tempeh conservado por congelamento, enlatamento ou desidratação. Para esses ensaios, esses autores fritaram o material cortado em fatias, após salga por imersão em salmoura a 5%, em óleo de amendoim, a 177°C por 4 min.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Farelo de soja tostado

É o produto resultante da extração de óleo dos grãos de soja, com posterior moagem (ROHR, 1973). O farelo de soja tostado ou, simplesmente, farelo (denominação também adotada neste trabalho) foi adquirido no Departamento de Zoootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) do "Campus" de Jaboticabal. Para a sua fermentação, o farelo foi inspecionado para eliminação de gravetos, grumos e outras sujidades e para as análises químicas foi moído para se obter uma fração granulométrica inferior a 1 mm (AOAC, 1965).

4.1.2. Suplementos

Foram utilizados farinha de mandioca, fubã e farelinho de arroz, adquiridos no comércio local. As especificações dos dois primeiros foram normalizadas pelo Decreto nº 52504, de 28 de julho de 1970, publicado no Diário Oficial do Estado de São Paulo (ano LXXX - nº 142 - p. 2) em 1º de agosto de 1970:

a) Farinha de mandioca: produto obtido pela ligeira torração da raladura das raízes da mandioca (*Manihot utilissima*) previamente descascadas, lavadas e isentas do radical cianeto.

b) Fubã de milho ou fubã: produto obtido pela moagem do grão de milho (*Zea mays* L.) desgerminado ou não.

c) Farelinho de arroz: produto resultante da industrialização do arroz, nas operações de polimento e brunimento (BRASIL. Ministério do Interior (a) s/d).

4.1.3. Soja em grão

Variedade Santa Rosa, obtida no Departamento de Fitotecnia da F.C.A.V. "Campus" de Jaboticabal.

4.2. Métodos

4.2.1. Procedimento tecnológico

4.2.1.1. Produção de tempeh de farelo de soja

Para fermentação do farelo de soja seguiu-se a seguinte marcha: ao farelo adicionou-se 30% em peso do suplemento e homogeneizou-se bem, obtendo-se assim uma mistura que foi adicionada a uma solução-suspensão de água destilada (volume de 150% do peso da mistura) contendo 3,5% de ácido cítrico do peso da mistura e esporos do fungo *Rhizopus oligosporus* SAITO (NRRL 2710). A suspensão de esporos e a quantidade de inóculo foi obtida, com algumas modificações, conforme MARTINELLI e HESSELTINE (1964) do seguinte modo: a uma cultura do fungo, em meio de malte inclinado, com 5 - 7 dias de idade, adicionou-se 4 ml de solução esterilizada de tween a 0,001%; a seguir, procedeu-se à raspagem dos esporos do fungo com alça de platina, obtendo-se a suspensão respectiva a qual foi utilizada para 100 g de mistura.

Após a adição da mistura à solução-suspensão de água destilada, procedeu-se ao seu revolvimento com uma colher, obtendo-se uma massa solta, a qual foi acondicionada de maneira frouxa, sem compactação, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e levada à estufa para fermentação a 35 - 37°C, por 24 horas.

O uso de suplementos, ácido cítrico e água destilada com o farelo serão discutidos no capítulo correspondente.

4.2.1.2. Produção de tempeh de grãos de soja

Utilizou-se a técnica de HESSELTINE et alii (1966), que constou do seguinte: aos grãos de soja descascados e a seguir lavados adicionou-se água na proporção de 1:5, mantendo-se por uma noite; posteriormente, foram feitas novas lavagens e a soja foi cozida na mesma proporção de água por 30 min; após esse período de tempo, a água foi eliminada e a soja vertida em panos esterilizados para eliminar o excesso de água; quando fria, à temperatura de 35 - 40°C, foi inoculada e acondicionada em placas de Petri para fermentação, conforme técnica descrita em 4.2.1.1. O período de fermentação, nesse caso, foi de aproximadamente 20 horas.

4.2.1.3. Tratamentos

Com base no proposto neste trabalho, foram estabelecidos os seguintes tratamentos:

Nº Ordem	Denominação adotada	Tratamento
1	Farelo	-farelo de soja tostado (con <u>tr</u> ole I)
2	Farelo tratado	-farelo de soja processado con <u>for</u> me 4.2.1.1., porém não in <u>oc</u> ulado (Controle II).
3	Tempeh	-grãos de soja tratados con <u>for</u> me 4.2.1.2. - tempeh de grãos de soja (controle III)
4	T. mandioca	-farelo de soja suplementado com 30% de farinha de mandio <u>ca</u> , processado conforme 4.2.1.1.
5	T. fubá	-idem, idem com fubá
6	T. arroz	-idem, idem com farelinho de arroz

4.2.1.4. Desenvolvimento de *R. oligosporus* no farelo adicionado dos diversos suplementos

Com o objetivo de obter alguns dados sobre o desenvolvimento de *R. oligosporus* sobre o farelo com e sem suplementação, foram medidos o pH e a temperatura a intervalos de 10 horas ou seja, nos tempos 0 - 10 - 20 - 30 e 40 horas.

4.2.1.5. Rendimentos e perdas

O rendimento foi calculado com base no peso inicial de 100 g de farelo suplementado, farelo tratado ou ainda de soja respectivamente, e o peso final após fermentação. As perdas, em porcentagem, durante a fermentação, foram anotadas, pesando-se o conteúdo das placas de Petri antes e após a fermentação.

4.2.2. Análises bioquímicas

4.2.2.1. Material para as análises

Após fermentação, o material foi seco em estufa com circulação forçada de ar, a 60 - 70°C, por uma noite. A seguir, triturado de modo a obter-se granulometria inferior a 1 mm (AOAC, 1965) e guardado em frascos herméticos.

4.2.2.2. Umidade

Foi determinada segundo técnica da AOAC (1965), em que 5 g do material, acondicionados em cartuchos de papel de filtro, foram secos em estufa a 100 - 105°C até peso constante.

4.2.2.3. pH

Utilizou-se o processo eletrométrico recomendado pela AOAC (1965) em que 10 g do material foram adicionados a 100 ml de água destilada com agitação esporádica por 30 min e posterior descanso por 10 min; o pH foi determinado no percolado, utilizando-se pH metro Horiba D 5.

4.2.2.4. Cinzas

De acordo com a AOAC, incinerou-se 2 g do material seco em mufla, à temperatura de 550 - 600°C por 6 horas.

4.2.2.5. Matéria graxa

Foi utilizado o método recomendado pela AOAC (1965), segundo o qual 5 g de material seco (ver item 4.2.2.2.), contidos em cartucho de papel de filtro S & S 597 de 15 cm de diâmetro, foram colocados em extrator de Soxhlet, por 6 horas; o teor da matéria graxa foi calculado com base na diferença de peso do balão de Soxhlet, antes e depois da extração.

4.2.2.6. Proteína total

Foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl, adaptado por SARRUGE e HAAG (s/d) e que constou do seguinte: 0,1 g do material desengordurado foi tratado com 7 ml da mistura digestora (3,6 g de selenito de sódio, 4,0 g de sulfato de cobre, 4,8 g de sulfato de sódio dissolvidos em 175 ml de água destilada e 200 ml de ácido sulfúrico) e, posteriormente, digerido em digestor infra-vermelho BUCHI, obtendo-se uma solução límpida; essa solução foi tratada com 15 ml de solução de NaOH 18 N, em destilador BUCHI, recebendo-se o destilado em 10 ml de uma solução a 2% de ácido bórico-indicadores (soluções alcoólicas de verde bromocresol e vermelho de metila a 0,1%, respectivamente), o qual foi posteriormente titulado com uma solução de H_2SO_4 0,5 N, obtendo-se a porcentagem de N na amostra.

O teor de proteína foi calculado multiplicando-se a % de N pelo fator 6,25 (HART e FISHER, 1971).

4.2.2.7. Proteína verdadeira

Foi determinada pelo método do biureto (AOAC, 1965) que constou, em linhas gerais, do seguinte: 0,3 g de material desengordurado foi tratado com 20 ml da solução de NaOH 0,1 N e a seguir agitado por 15 min; do sobrenadante tomou-se 1 ml e tratou-se com 4 ml do reagente de biureto (1,5 g de sulfato de cobre e 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos em 500 ml de água destilada e adicionados a 300 ml de hidróxido de sódio a 10%); após 20 min de repouso, leu-se a absorbância em espectrofotômetro SPECTRONIC 80 a 540 mm. As concentrações do material analisado foram obtidas a partir de uma curva padrão, previamente determinada, utilizando-se solução de albumina bovina na concentração de 10 mg/ml.

4.2.2.8. Proteína dispersa

Utilizou-se a técnica da AOCS (1964) que consistiu, em resumo, em se suspender 20 g do material seco em 300 ml de água destilada e agitar à 8.500 rpm por 10 min; a seguir, tomou-se 50 ml do líquido e centrifugou-se por 10 min a 2.700 rpm; retirou-se, finalmente, 15 ml do sobrenadante para balão de Kjeldahl e determinou-se o teor de proteína conforme descrito em 4.2.2.5.

4.2.2.9. Fibra crua

Utilizou-se o método da AACC (1969), em que 2g de material desengordurado foram digeridos com 200 ml solução H_2SO_4 1,25%, seguindo-se filtração sob vácuo, através de pano (algodão); o material retido foi lavado com 200 ml de solução NaOH (1,25%) e digerido nessa solução por mais 30 min; a seguir, filtrou-se através do cadinho de Gooch com camada filtrante de amianto; o cadinho foi seco em estufa a 100 - 105°C por 2 h e a seguir levado à mufla a 550 - 600°C por 2 horas. A fração fibra foi calculada com base na diferença de peso do cadinho, antes e depois da incineração.

4.2.2.10. Carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado com base na diferença entre a soma dos teores de cinza, matéria graxa, proteína e fibra e o valor 100.

4.2.3. Avaliação biológica da qualidade de proteína

4.2.3.1. Coeficiente de utilização protéica (CUP)

Foi determinado com base na metodologia da AOAC (1965): utilizou-se ratos da raça Whister, machos, recém desmamados, mantidos em gaiolas individuais e em número de 6 por tratamento; a variação entre as médias de peso dos ratos

foi de, no máximo, 5 g. Com base na composição do material objeto de estudo, obtido conforme 4.2.2.1., as rações foram preparadas de modo a se obter 10% de proteínas, 8% de óleo (as deficiências foram completas com óleo de algodão), 5% de cinzas (as deficiências foram completas com misturas salina), 1% de mistura vitamínica, 5% de umidade, 1% de fibra e 70% de carboidratos (as deficiências foram completas com amido de milho). O grupo testemunha recebeu, na mesma proporção proteica, caseína como fonte de proteína.

No sentido de obter uma homogeneidade no preparo das rações, procedeu-se do seguinte modo: adicionou-se o óleo a uma parte do amido e misturou-se manualmente a fim de desmanchar os grumos e obter perfeita distribuição do óleo; a seguir, misturando, foram adicionados progressivamente a mistura salina, a mistura vitamínica, o produto a ser analisado e, finalmente, o resto do amido. A ração assim pronta foi mantida a 20°C.

O período de ensaio foi de 4 semanas. Registrou-se o peso de cada rato no início do ensaio e o peso do rato e quantidade de ração consumida a cada 7 dias e no último dia de ensaio. Ração e água foram ministradas à vontade.

4.2.4. Análise sensorial

O preparo do material obedeceu à técnica de ILJAS et alii (1970): após a fermentação, os produtos foram cortados em cubos com 2,5 cm de lado e submetidos a ação do calor (120°C/10 min) para inativação enzimática; posteriormente, foram secos em estufa com circulação forçada de ar (60 - 65°C/8 - 10 h). Devido a secagem, a dimensão lateral dos cubos reduziu-se para 2 cm, medida essa requerida para a análise sensorial. O material seco foi guardado em sacos plásticos, mantidos à temperatura ambiente. Para a fritura, o material foi imerso em uma solução salina a 5% por um período de tempo de 30 min (TFS) e 5 min (tempeh).

A fritura foi realizada em óleo de arroz, à temperatura de 100°C por 1 min, em recipientes separados, um para cada tratamento.

Para a análise sensorial, utilizou-se o método de escala hedônica de 9 pontos para medir a preferência de sabor, segundo técnica de JORGE e GARRUTTI (1964). Para isso, após a fritura, os tratamentos foram colocados em pires numerados (numeração casualizada) de fundo escuro, na quantidade de um pedaço de cada tratamento por pires e servidos (os 4 tratamentos) a 10 provadores, localizados em cabines isoladas a fim de evitar troca de informações. Após a degustação do material, cada provador preencheu o questionário de avaliação (Fig. 3) previamente incluído nas cabines, junto com as amostras.

4.2.5. Análise estatística

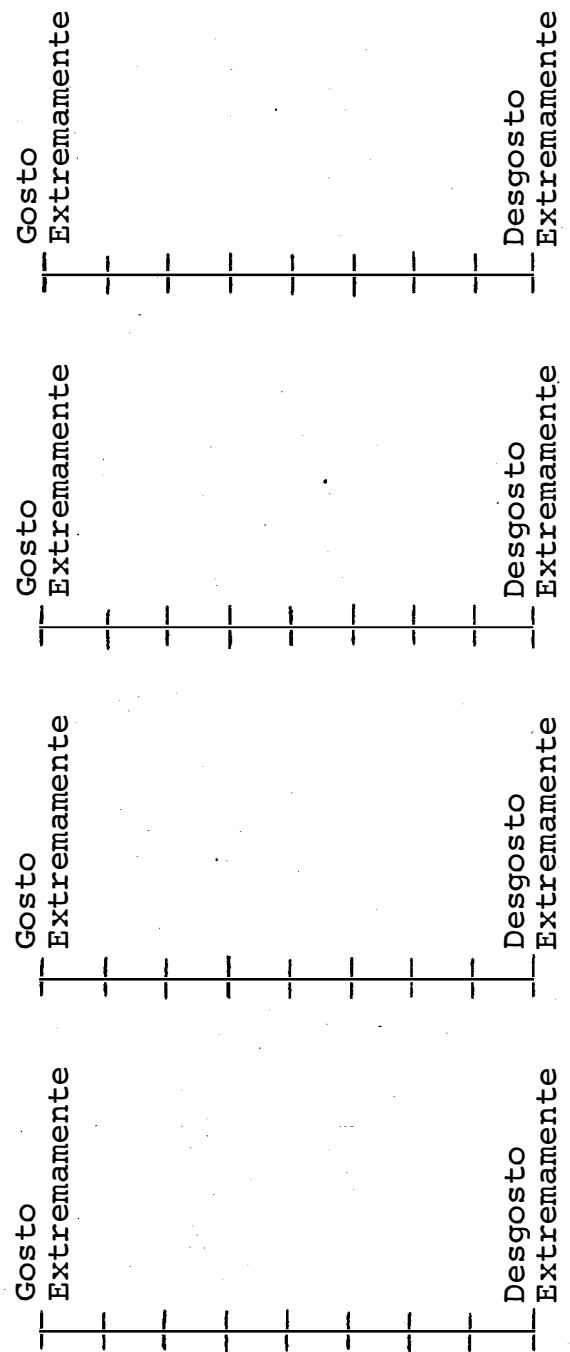
Para a análise sensorial, utilizou-se delineamentos de blocos ao acaso, com 6 repetições e para as demais análises foi empregado delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, conforme PIMENTEL GOMES (1966). Os resultados, obtidos em porcentagem, foram convertidos em $\text{arc sen } \sqrt{P/100}$ (em que P é a porcentagem) para fins de distribuição binomial.

Utilizou-se um nível de significância de 5%, sendo que as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Tukey.

Nome: _____ Sessão nº _____ Data ____/____/____

Você receberá 4 amostras. Por favor, prove-as na ordem em que elas são servidas e indique para cada uma delas o quanto você gostou.

Nº da amostra: _____



Comentário: _____

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Tempeh de farelo de soja

Após fermentação, o TFS apresentou-se com coloração branca (Fig. 4), devido ao micélio do fungo que cresceu externamente ao mesmo. Porém, a colocação da mistura na placa de Petri, de modo frouxo, proporcionou uma aeração suficiente para o desenvolvimento do fungo no interior da mesma, unindo os grânulos do farelo suplementado, de modo a se obter um aspecto de bolo compacto. Esses aspectos são semelhantes aos obtidos com o tempeh, com a diferença que este mostra os grãos de soja distribuídos na massa branca e aquele dos grânulos de farelo com a coloração típica castanha. Também, a textura do TFS é macia, enquanto que no tempeh é mais dura, devido aos grãos de soja. O odor do tempeh é descrito por STEINKRAUS et alii (1960) como "limpo e agradável e um aroma semelhante a queijo". No caso do TFS observou-se odor de frutas, algo alcoólico, a semelhança do que foi obtido por van VEEN et alii (1958) e NAHAS et alii (1978 a) com o "ontjom" (produto fermentado de torta de amendoim), ou ainda uma fragância de frutas, ésteres e ácidos doces mencionada por QUINN e BEUCHAT (1975), na fermentação de farinha de amendoim desengordurada pelo fungo *Neurospora sitophila*. É possível que esse aroma

seja devido, como mencionam QUINN et alii (1975), a compostos voláteis de baixo peso molecular, como ácidos, dióxido de carbono, ésteres, aldeídos, cetonas e outros produtos.

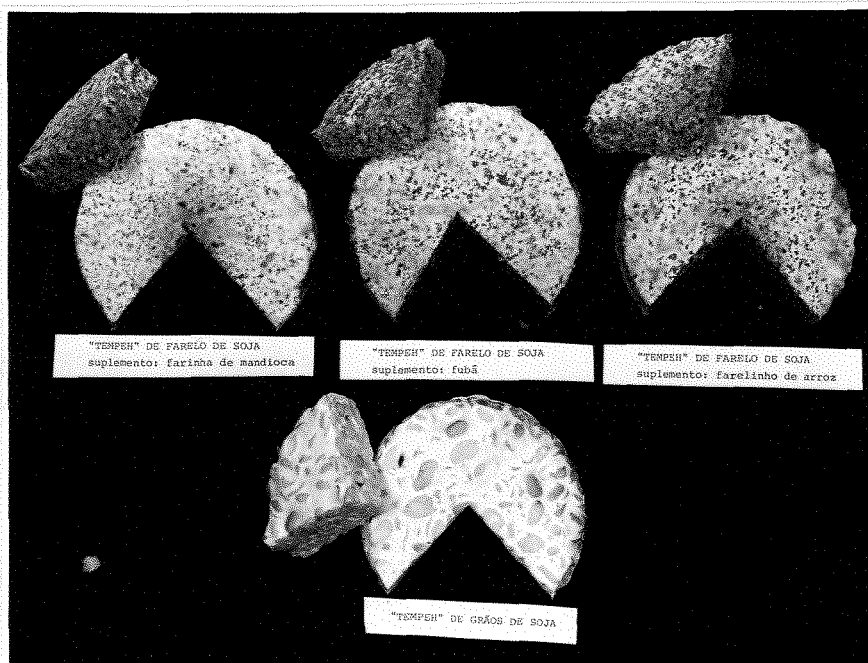


Fig. 4 - O TFS apresenta-se com coloração branca devido ao micélio que recobre a sua superfície, a semelhança do tempeh.

Algumas variáveis foram consideradas para se obter uma boa fermentação do farelo de soja:

pH - a acidificação do farelo de soja foi necessária para inibir o crescimento de microrganismos indesejãveis que produziriam odores e aspecto desagradáveis ao produto fermentado. A redução do pH para aproximadamente 4,5 foi suficiente para se conseguir o efeito desejado, sem inibir o desenvolvimento do fungo, uma vez que está dentro da faixa ótima (pH 2,6 a 5,3) do *R. oligosporus* (SORENSEN e HESSELTINE,

1966). O pH 4,5 foi obtido com a adição de 3,5% de ácido cítrico do peso da mistura de farelo de soja suplementado.

A acidificação para um nível de pH de 4,5 - 5,0 em torta ou farelo de amendoim foi também empregada por VAN VEEN et alii (1958) e QUINN e BEUCHAT (1975), por meio de ácido cítrico, e por NAHAS et alii (1978 a), por meio de ácido tartárico, a fim de favorecer o desenvolvimento de *Neurospora sitophila*.

A esterilização do farelo, como medida para se evitar subfermentação, prejudica o material, tornando-o com aspecto enegrecido ou de queimado.

Suplementação - a necessidade de se adicionar um suplemento para se produzir TFS pode ser deduzida pelos valores de pH e temperatura apresentados na tabela 1, os quais poderão ser melhor visualizados através dos gráficos das figuras 5 e 6. A fim de se comparar o desenvolvimento do fungo no farelo suplementado ou não, houve necessidade (apenas para esse ensaio) de se inocular o tratamento farelo, conforme técnica descrita em 4.2.1.1.

Observa-se na tabela 1 que para o farelo tratado (inoculado), houve uma elevação do pH de 4,6 para 6,3, após 20 horas de fermentação e para 7,7, após 30 horas, estabilizando-se a seguir. Nos demais tratamentos suplementados, a maior elevação de pH coincidiu com a fase de maior desenvolvimento, porém, essa ascensão não foi tão brusca como observado no farelo tratado (inoculado): com 20 horas de fermentação, anotou-se os valores de 4,6 (T. mandioca), 5,0 (T. fubá) e 5,4 (T. arroz). O pH continuou em ascensão nesses tratamentos, porém, sempre foi inferior ao farelo tratado.

A temperatura inicial anotada na mistura em fermentação foi a do ambiente (27°C). Com 10 horas de fermentação, não se percebeu ainda desenvolvimento fúngico e a temperatura verificada (35°C) foi devida à equiparação da temperatura da mistura com a da estufa de incubação. Com 20 horas,

Tabela 1 - Efeito da adição ou não de suplemento no desenvolvimento de *R. oligosporus* ^{a/}.

Horas de fermentação	Tratamentos							
	Farelo tratado ^{b/}		T. mandioca		T. fubã		T. arroz	
	pH	Temp. ^{c/} (°C)	pH	Temp.(°C)	pH	Temp.(°C)	pH	Temp.(°C)
0	4,6	27,0	4,6	27,0	4,7	27,0	4,7	27,0
10	4,6	35,0	4,6	35,0	4,7	35,0	4,7	35,0
20	6,3	38,2	4,6	44,1	5,0	43,0	5,4	43,0
30	7,7	42,0	5,3	44,3	5,8	42,2	5,8	41,3
40	7,7	40,2	5,9	40,2	6,2	40,0	6,8	40,0

a/ Médias de 3 repetições.

b/ Apenas para esse ensaio, o farelo tratado foi inoculado.

c/ Temperatura.

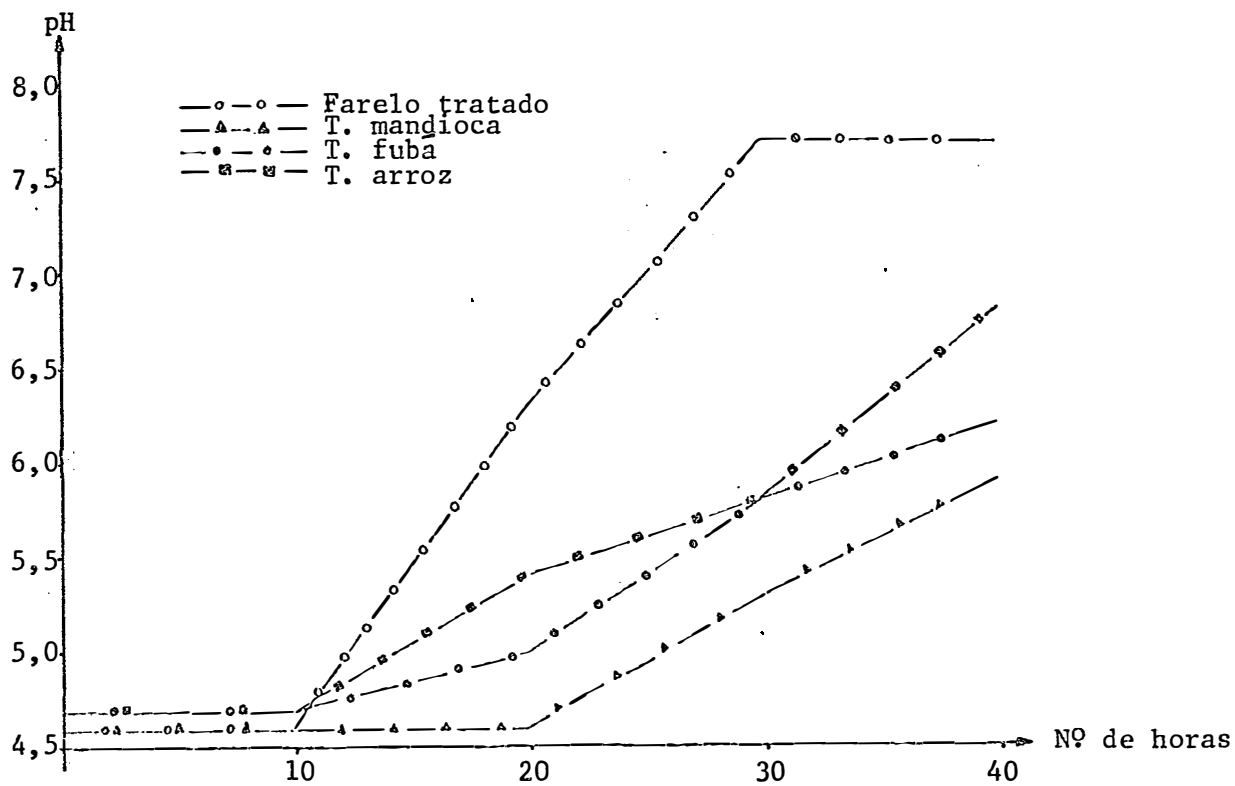


Fig. 5 - Variação do pH durante o desenvolvimento de *R. oligosporus* em farelo de soja suplementado ou não.

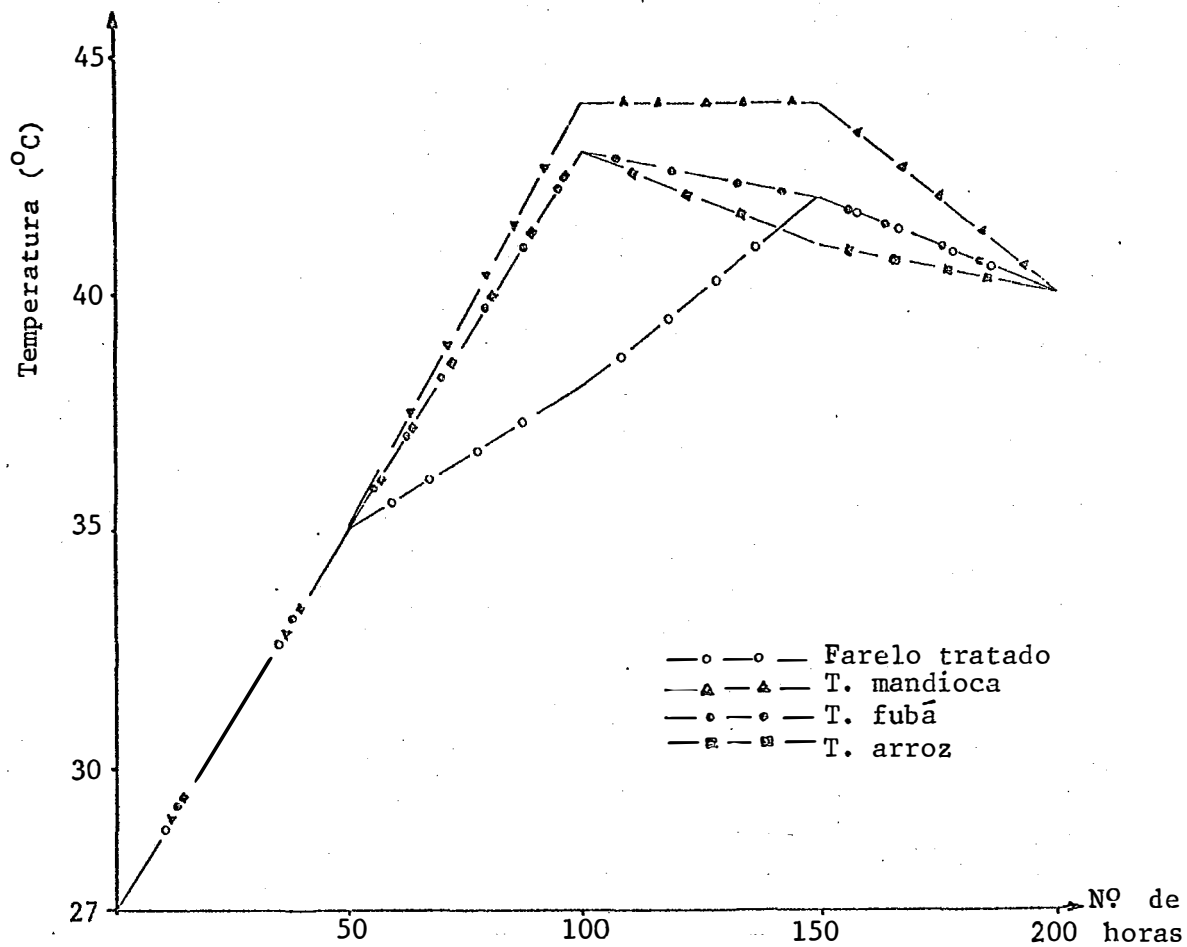


Fig. 6 - Variação da temperatura durante o desenvolvimento de *R. oligosporus* em farelo de soja suplementado ou não.

foram atingidas as temperaturas máximas nos tratamentos suplementados, em torno de 43 - 44°C, quando se observou um crescimento intenso do fungo, que se distribuía por toda a placa. Ao mesmo tempo, no farelo tratado a temperatura anotada foi de 38,2°C, com um crescimento incipiente do fungo. A partir de 30 horas de fermentação, a temperatura das placas com farelo suplementado sofreu decréscimo gradativo indicando um retrocesso da atividade do fungo e, nesse tempo (30 horas), no farelo tratado anotou-se a temperatura máxima de 42°C, porém, observando-se ainda pouco progresso no desenvolvimento do fungo e forte odor de amônea.

A elevação mais rápida da temperatura no TFS que no farelo tratado constitui o resultado de uma maior atividade metabólica e, por conseguinte, maior desenvolvimento do fungo.

A temperatura atingida no TFS, de 44°C, não inibe o fungo o qual ainda se desenvolve satisfatoriamente até 45°C, como relatam STEINKRAUS et alii (1960).

O melhor desenvolvimento de *R. oligosporus* no farelo suplementado sugere uma melhor proporção na relação C/N apresentada por esse material. Como esse fungo não utiliza carboidratos da soja (SORENSEN e HESSELTINE, 1966), no farelo (não suplementado) o mesmo utilizaria proteínas como fonte de energia, as quais seriam desdobradas, acarretando elevada produção de amônea e consequente elevação do pH. WANG et alii (1968), a esse respeito, relatam maior consumo de carboidratos do trigo em tempêh feito da mistura desse cereal com soja.

De qualquer forma uma elevação do pH sempre é esperada devido à atividade proteolítica do *R. oligosporus* (van VEEN e SHAEFER, 1950; HESSELTINE, 1965; e WANG e HESSELTINE, 1965).

Os dados de variação da temperatura verificados no TFS corroboram os encontrados por STEINKRAUS et alii (1960) e CAMARGO (1969) na fermentação de grãos de soja, os

quais encontraram temperaturas máximas com 18 - 20 horas e depois diminuição das mesmas.

Com base no desenvolvimento do fungo e nos resultados verificados na tabela 1, adotou-se o período de fermentação de 24 horas. O uso de suplemento na base de 30% do peso do farelo correspondeu à quantidade mínima necessária para se obter uma boa fermentação do material de estudo.

Umidade - tendo em vista as necessidades de umidade pelo fungo serem relativamente altas (STEINKRAUS et alii, 1960) e com base nos ensaios tecnológicos, optou-se pela adição de 150% de água destilada do peso da mistura de farelo suplementado ou não porque: a) uma quantidade maior torna a mistura mais compacta, acarretando problemas de aeração e, portanto, de desenvolvimento interno do fungo, embora favoreça o crescimento na superfície do substrato; b) corresponde a um teor de umidade de 60% do peso total, teor esse próximo ao obtido na fermentação da soja em grão, em torno de 62 - 67%, segundo CAMARGO (1969).

5.2. Rendimento, pH e umidade

Os dados resumidos resultantes das análises de pH e de umidade, os rendimentos calculados referentes ao farelo, farelo tratado, tempeh e TFS estão apresentados na tabela 2.

Pelos dados da tabela 2, observa-se que o farelo suplementado apresentou um rendimento superior ao tempeh, da ordem de 65 a 70%, o que era esperado uma vez que no preparo desse produto ocorrem perdas por descascamento, maceração, cozimento e fermentação, que podem chegar a 43% (SMITH et alii, 1964) conforme o processo de preparo utilizado, perdas essas que não ocorrem, exceto a última, no farelo.

Tabela 2 - Rendimento, pH e umidade do farelo, farelo tratado, tempeh e TFS.

Nº Ordem	Tratamento	Rendimento ^{a/} (g)	Perdas na fermentação (%)	pH	Umidade (%)
1	Farelo	250,43	1,22	6,3	-
2	Farelo tratado	250,43	1,22	4,9	62,86
3	Tempeh	176,18	0,95	7,4	66,19
4	T. mandioca	241,04	7,94	5,1	66,05
5	T. fubã	246,50	6,08	5,3	64,68
6	T. arroz	245,04	6,64	5,3	63,59

^{a/} Peso de 100g de farelo, farelo suplementado ou soja em grão após fermentação.

Dados de rendimento aqui obtidos podem ser relacionados com os da literatura: assim, STEINKRAUS et alii (1960) obtiveram de 100 g de soja um rendimento de 174 g de tempeh e CAMARGO (1969), de 166 a 185 g, portanto semelhantes aos obtidos neste trabalho. Por outro lado, verifica-se um rendimento elevado para os farelos fermentados; assim, NAHAS et alii (1978 b) obtiveram um rendimento de 273 a 294 g a partir da fermentação do farelo de amendoim.

As perdas durante a fermentação foram 6 a 8 vezes superiores nos farelos suplementados que no farelo tratado ou tempeh. Comparando-se os dados dos TFS com o respectivo controle (farelo tratado), é de se supor que, além das perdas de umidade, haja evaporação de constituintes voláteis, que seriam formados em maior quantidade nos farelos suplementados, devido a maior superfície de exposição apresentada pelos grânulos do farelo à ação das enzimas do fungo.

A maior perda no T. mandioca (Tukey, 5%) resultou em menor rendimento nesse tratamento quando comparado com T. fubã ou T. arroz (tabela 2).

SMITH et alii (1964), confirmando os dados aqui obtidos, relatam perdas nos grãos de soja fermentados que variam de 0,8 a 3,4%, as quais se elevaram para 2 - 5% em "chips" (grão de soja subdividido em 6 - 8 partes). Por sua vez, STEINKRAUS (1964) relata perdas na fermentação de 1,7% no tempeh.

O pH do farelo de soja, de 6,3 (tabela 2) foi abaixado pelas razões anteriormente discutidas, para 4,5 - 4,6. A incubação em estufa do farelo tratado ou a fermentação dos farelos suplementados elevaram o pH para níveis de 4,9 e 5,1 - 5,3, respectivamente, enquanto que no tempeh registrou-se o pH de 7,4. A elevação do pH no farelo tratado deve-se a transformações decorrentes de contaminantes. A maior elevação do pH no tempeh que no TFS, deve-se ao pH inicial dos grãos de soja ser mais elevado (em torno de 6,8).

Essa variação no pH foi também obtida por STEINKRAUS et alii (1965), ao proceder a fermentação da soja pelo uso de *Neurospora* sp e de *R. oligosporus* quando o pH se elevou de 4,6 - 4,7 até acima de 7,0, e por WANG e HESSELTINE (1965), para a produção de tempeh de trigo, quando o pH caiu de 6,8 para 5,7 e, então, gradualmente subiu até 6,7.

Exceto para o T. arroz que apresentou um teor de umidade de cerca de 64%, os demais farelos suplementados e o tempeh não diferiram significativamente, apresentando aproximadamente 65 - 66% de umidade. Como mencionam STEINKRAUS et alii (1960) e CAMARGO (1969), esse elevado teor de umidade torna o tempeh bastante perecível, devendo o mesmo ser prontamente conservado após fermentação, fato esse também observado no TFS, apesar de apresentar pH ligeiramente inferior.

5.3. Composição centesimal

Os valores médios da composição centesimal do farelo, farelo tratado, tempeh e TFS estão na tabela 3, que inclui também os teores de proteína verdadeira e dispersa.

A análise estatística (teste F) mostrou que houve diferença significativa entre pelo menos duas médias em todos os itens analisados da composição centesimal, exceto para proteína total.

Um exame dos dados da tabela 3 mostra que, de modo geral, o tempeh apresenta maior teor de matéria graxa, enquanto que os farelos suplementados possuem valores superiores dos demais itens da composição centesimal, quais sejam, cinza, fibra crua e carboidrato.

O exame dos dados apresentados pela literatura consultada revela uma similitude com os encontrados neste trabalho. Assim, os resultados da análise do farelo estão enquadrados dentro dos limites apresentados por PION (s/d) e bastante próximos aos dados relatados por ORR e ADAIR (1967) e COSTA et alii (1976).

Tabela 3 - Composição centesimal, proteína verdadeira e dispersa do farelo, farelo tratado, tempeh e TFS.

Nº Ordem	Tratamento	g por 100 gramas de matéria seca						
		M. graxa	Cinza	Fibra crua	Proteína Total Verdadeira	Dispersa	Carboidrato ^{a/}	
1	Farelo	2,56	6,42	7,96	41,19	35,00	3,78	41,87
2	Farelo tratado	2,12	6,37	7,65	43,07	33,70	5,64	40,76
3	Tempeh	23,92	2,96	3,34	40,61	39,07	9,65	29,18
4	T. mandioca	2,55	5,95	7,28	39,23	34,05	12,37	45,00
5	T. fubã	3,01	5,61	7,22	40,48	36,00	12,86	43,68
6	T. arroz	7,09	7,24	7,88	40,49	32,85	13,26	37,30

a/ Obtido por diferença.

Não se notou diferença significativa nas características analisadas (Tukey, 5%) entre o farelo e o farelo tratado, exceto para matéria graxa, mostrando que não houve influência da temperatura de incubação do material. A diminuição no teor de matéria graxa pode ser o resultado da subfermentação ocorrida, como mencionado anteriormente, com utilização desse componente pelos microrganismos presentes ou liberação de substâncias que são arrastadas pelo extrato etéreo.

De modo geral, como era esperado, os demais tratamentos diferenciaram-se entre si e com os controles. A adição dos diversos suplementos ao farelo conferiu uma composição diferente ao produto fermentado, como verificado nas análises realizadas. Conforme constatação bibliográfica (BRASIL, Ministério do Interior (a), s/d; MORRISON, 1966 e TOSELLO, 1975), os suplementos utilizados possuem alto teor de carboidratos (acima de 70% para o fubá e farinha de mandioca e 41% para o farelinho de arroz), os quais foram utilizados para o desenvolvimento do fungo, conforme discutido anteriormente. O maior teor de cinza para o T. arroz decorre do maior conteúdo desse componente no farelinho de arroz. STEINKRAUS et alii (1960), MURATA et alii (1967) e WANG et alii (1968) relatam uma aumento no teor de fibras, devido ao micélio fúngico. Nos nossos ensaios, verificou-se uma redução no teor de fibra crua em T. mandioca e T. fubá, em relação ao farelo, enquanto que no T. arroz foi estatisticamente igual ao farelo. Explica-se porque farinha de mandioca e fubá possuem baixo teor de fibras, enquanto que o farelinho de arroz apresenta alto conteúdo desse componente, conduzindo dessa forma aos teores apresentados.

Com relação à composição do tempeh analisado, verificou-se que se aproxima da apresentada por STEINKRAUS et alii (1960 e 1965), MURATA et alii (1967), LEITÃO et alii (1967/68), CAMARGO (1969) e van BUREN et alii (1972), excetuando o teor de proteína, que se mostrou ligeiramente inferior,

porém, mais próximo ao apresentado pelo último autor (em tor no de 41,5%).

O teor inferior de óleo nos farelos suplementa dos constitui uma desvantagem em relação ao tempeh, por quan to o óleo de soja é considerado altamente desejável na dieta (ELDER e RATHMANN, 1962).

Apesar dos teores de proteína total dos suple mentos serem inferiores ao do farelo, não se constatou dife rença significativa dessa característica entre TFS, farelo e tempeh, apresentando valores que variaram de 39 a 43%.

Com relação à proteína verdadeira, não se ob servou diferença significativa entre os controles farelo e farelo tratado, cujo teor variou de 34 - 35%. A adição de fu bã elevou o teor de proteína verdadeira do farelo para 36%, porém não de forma significativa. O T. mandioca apresentou um valor estatisticamente igual e o T. arroz inferior ao fare lo, respectivamente. Por outro lado, o tempeh superou os de mais tratamentos com um teor de proteína verdadeira de 39%.

Os dados de proteína dispersa mostraram que por ação de *R. oligosporus* houve aumento significativo desse valor quando comparado com os do TFS e do farelo. Assim, o teor de proteína dispersa foi de 3,3 - 3,5 vezes maior no TFS que no farelo. Verificou-se, ainda, um teor 1,3 - 1,4 vezes maior no TFS que no tempeh, devido a maior ação enzimática co mo discutido anteriormente. Esses resultados vêm confirmar os relatos de van VEEN e SHAEFER (1950), HESSELTINE (1965), WANG e HESSELTINE (1965) e CAMARGO (1969) sobre a atividade proteolítica do *R. oligosporus*. Dados numéricos coletados na literatura mostram um aumento no teor de N solúvel (não foram encontrados dados de proteína dispersa) durante a fermentação do tempeh, de 0,5 para 2 - 2,5% (STEINKRAUS et alii, 1960 e HESSELTINE, 1965) enquanto que van BUREN et alii (1972) veri ficaram um aumento no teor de proteína crua solúvel, em 24 ho ras de fermentação, de 1,85 para 13,9%, portanto, confirmando os resultados aqui obtidos.

5.4. Valor nutritivo

As médias de ganho de peso e de consumo de ração pelos ratos de ensaio e os respectivos C.U.P. do farelo, farelo tratado, tempeh, TFS e a caseína tomada como padrão estão na tabela 4.

Tabela 4 - Ganho de peso, consumo de ração e C.U.P. de farelo, farelo tratado, tempeh, TFS e caseína padrão.

Nº Ordem	Tratamento	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	C.U.P.
1	Farelo	37,8	214,9	1,88
2	Farelo tratado	35,8	203,0	1,77
3	Tempeh	37,8	252,5	1,78
4	T. mandioca	48,0	242,9	1,87
5	T. fubá	52,7	234,9	2,39
6	T. arroz	33,8	210,4	1,80
7	Caseína	63,9	234,1	2,50

Analisando-se os dados da tabela 4, pode-se verificar que o consumo de ração de T. mandioca, T. fubá e caseína foi mais ou menos próximo (234 - 243 g), enquanto que o tempeh foi o mais consumido (253 g) e o farelo, farelo tratado junto com o T. arroz foram os menos consumidos (203 - 215 g) pelos ratos de ensaio.

Embora o tempeh fosse o mais consumido, apresentou um ganho de peso (de 38 g) relativamente baixo. Como se observa na Fig. 7, onde foi traçado o ganho semanal de peso dos ratos de ensaio, T. fubã e caseína mostram uma característica ascendente, enquanto que nos demais tratamentos ocorreu uma queda no crescimento a partir da 2ª semana de ensaio. Entretanto, no T. mandioca, os ratos apresentaram um ganho de peso superior aos demais tratamentos (exceto caseína) já a partir da 2ª semana, ganho esse que declinou no final do ensaio (4ª semana).

É de se notar que apenas T. mandioca (48 g) e T. fubã (aproximadamente 53 g) proporcionaram um ganho de peso superior ao farelo (38 g). Esse tipo de resultado foi também observado por WANG et alii (1968) com trigo fermentado com *R. oligosporus*, van VEEN et alii (1968) com torta de amendoim fermentada e CAMARGO (1969) com tempeh de soja das variedades Hardee e L-1556.

Apesar dos resultados conseguidos com T. mandioca e T. fubã, não se obteve diferença significativa entre o C.U.P. desses tratamentos com o do farelo, os quais apresentaram, respectivamente, os valores de 1,87, 2,39 e 1,88. Também, não foi encontrada diferença estatística (Tukey, 5%) entre esses valores e o padrão caseína (C.U.P.=2,50). O farelo garantiu um valor C.U.P. de 1,88 devido ao maior ganho de peso dos ratos em relação ao consumo de ração, quando comparado com outros tratamentos. Por outro lado, farelo tratado (1,77), tempeh (1,78) e T. arroz (1,80) foram significativamente inferiores ao farelo.

Esses resultados levam a concluir que embora a fermentação não tivesse melhorado a qualidade do farelo suplementado (havendo, ainda, redução do seu valor), por outro lado ocorreu um substancial ganho de peso dos ratos no T. mandioca e T. fubã e que pelo menos esse último tratamento apresentou um C.U.P. tão alto (2,39) quanto ao da caseína (2,50), indicando uma distribuição mais equilibrada dos aminoácidos do

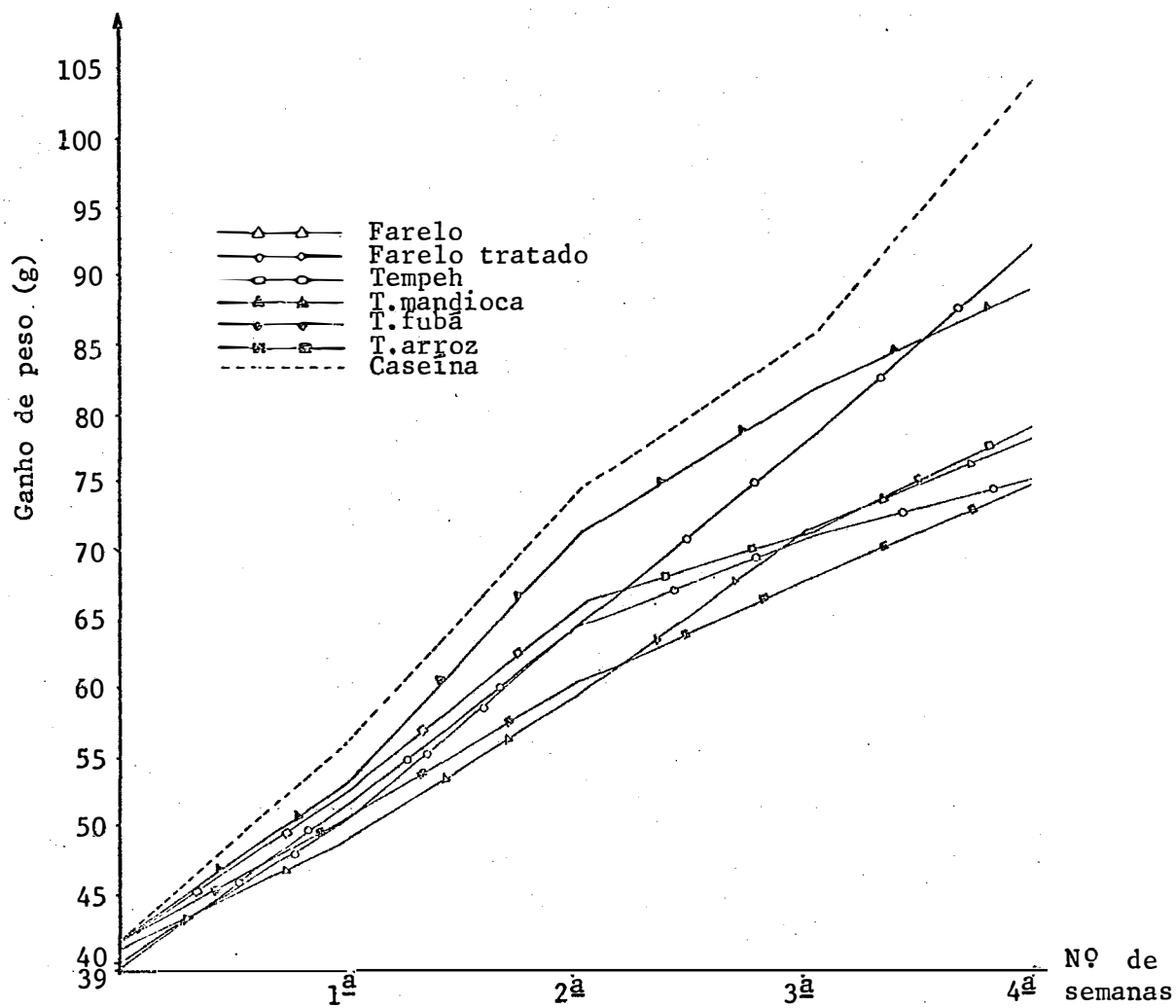


Fig. 7 - Ganho semanal de peso verificado nos ratos de ensaio ao consumirem farelo, farelo tratado, tempeh, TFS e caseína.

farelo quando suplementado com fubá e uma melhoria da qualidade do farelo (não apontada estatisticamente).

Corroborando os dados aqui encontrados, verifica-se que, de modo geral, a fermentação da soja não melhora o valor biológico do alimento. Assim, os dados de C.U.P. apresentados por HACKLER et alii (1964), SMITH et alii (1964), WANG et alii (1968), CAMARGO (1969) e MURATA et alii (1970) mostraram que não ocorre melhoria desse índice o qual pode, ainda, ser reduzido. Por outro lado, WANG et alii (1968) menciona que o C.U.P. do trigo foi aumentado por fermentação.

5.5. Análise sensorial

Na tabela 5 estão relacionadas as médias das notas atribuídas pelos provadores ao tempeh, T. mandioca, T. fubá e T. arroz.

Tabela 5 - Médias das notas atribuídas pelos provadores ao tempeh, T. mandioca, T. fubá e T. arroz.

Nº Ordem	Tratamento	Médias
1	Tempeh	4,7
2	T. mandioca	4,3
3	T. fubá	4,4
4	T. arroz	3,8

A análise estatística mostrou que não houve preferência na aceitação dos diferentes alimentos estudados; tempeh ou TFS, sendo que as médias das notas atribuídas pelos

provadores variaram de 3,8 a 4,7. Os resultados obtidos mostraram também que a aceitação de qualquer produto analisado está abaixo da média da escala hedônica (valor 1 a 9) adotada. Os comentários anotados pelos provadores nas fichas de avaliação foram poucos e não chegaram a ser conclusivos. Entretanto, a tabulação desses comentários revelou algumas características que foram mencionadas com maior frequência, qual seja textura dura para o tempeh, textura mole ou muito mole para o T. arroz e sabor bom, regular ou harmonioso para T. mandioca e T. fubá.

CAMRGO (1969), num teste de preferência de tempeh feito com várias variedades de soja, conseguiu uma cotação mais alta que a obtida neste trabalho, cotação essa que variou entre 5 a 9, na escala de 10 pontos adotada. Esse autor utilizou a técnica de fritura do material fresco, técnica essa que foi experimentada nos trabalhos preliminares, mas o material assim frito mostrou-se encharcado de óleo e foi preferido ao material frito, mas seco previamente. ILJAS et alii (1970) não encontraram diferença significativa na análise sensorial do tempeh preparado dessas duas formas com a vantagem do produto seco ser conservado mais facilmente. É interessante ressaltar que apesar do tempeh ser um produto com restrições de uso no Brasil, apresenta determinadas características organolépticas conforme assinalam van VEEN e SHAEFER (1950) e HESSELTINE (1965) que o tornaram altamente aceito na Europa e nos Estados Unidos, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

1- No processo tecnológico de preparo do tempeh de farelo de soja (TFS) verificou-se a necessidade da adição de um suplemento de carboidrato, na quantidade mínima de 30% do peso de farelo, da acidificação a um pH 4,5, conseguida com a adição de 3,5% de ácido cítrico do peso de mistura (farelo-suplemento) e de se manter um nível de umidade para fermentação, em torno de 60%.

2- O TFS possui aspecto de um bolo de coloração branca onde os grânulos de farelo aparecem unidos pelo micélio do fungo, a semelhança do tempeh. Difere deste, na textura, que é mais macia, e no odor, que é de frutas, algo alcohólico.

3- O rendimento do TFS é 24 - 26% superior ao tempeh, o teor de umidade é bastante próximo (63 - 66%) e o pH é levemente ácido (5,1 - 5,3%) no TFS e praticamente neutro no tempeh (tabela 2).

4- A análise da composição centesimal (tabela 3) mostrou que o teor de proteína total foi estatisticamente igual no farelo, tempeh e TFS. Por outro lado, os demais itens da composição centesimal, exceto matéria graxa, aparece

ram em maior quantidade no farelo e TFS que no tempeh (tabela 3).

5- O teor de proteína verdadeira foi superior no tempeh (39%) que no TFS (32 - 36%). Apenas o TFS suplementado como fubã mostrou-se superior ao farelo (36% x 35%), porém não significativamente.

6- A fermentação proporcionou um aumento de 3,3 - 3,5 vezes no teor de proteína dispersa e 1,3 - 1,4 vezes maior no TFS que no tempeh, indicando um aumento da digestibilidade no produto fermentado.

7- Não se verificou melhoria do valor biológico da proteína do farelo (C.U.P. = 1,88) relativo aos tratamentos suplementados de fubã (2,39) e de mandioca (1,87), os quais se mostraram estatisticamente iguais ao padrão de caseína. Embora esses valores sejam superiores ao do tempeh (1,78) e do T. arroz (1,80).

8- Pela análise sensorial, o TFS foi regularmente aceito pelos provadores (tabela 5), não havendo preferência quando cotejado com o tempeh.

7. SUMMARY

The possibility of fermentation of soybean meal (by product of the oil industry) to produce a tempeh like product, an oriental food, originally made of cooked soybean grains, was tried. The technological process has shown the necessity of addition to the soybean meal, a minimum of 30% of a supplement as source of carbohydrate, as manioc cassava flour, maize flour and rice bean, 3.5% of citric acid to decrease the pH to 4.5 and also 150% of distilled water considering the weight of the mixture soybean meal-supplement. The mixture was fermented in Petri dishes, at 35 - 37°C during 24 hours using the mold *Rhizopus oligosporus*. After fermentation it has been obtained a product called soybean meal tempeh (TFS) which was like a compact white cake, with a pleasant fruit smell and showing also a something alcoholic smell.

The TFS was analysed in relation to tempeh and soybean meal for its biochemical, biological and the most important sensorial characteristics. The results have shown that the TFS has a similar content of total protein, less oil content and more quantities of crude fiber, ashes and carbohydrates than the tempeh. The fermentation neither changes the percent composition, except for lipids content nor improved

the crude protein content when the TFS was compared with the soybean meal, but the content of the dispersible protein was increased 3.3 - 3.5 times. This suggests an improvement of the digestibility of the TFS. The protein efficiency ratio of the TFS was similar to the soybean meal and that of standard casein and superior to the one of tempeh. The sensorial analysis has shown that TFS was regularly accept like tempeh.

8. LITERATURA CITADA

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. 1969. Aproved method of the AOCS. Minnesota, USA, AACC, s/p (vol. 1).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. 1964. Official and tentative methods of the AOCS. 2^a ed. Chicago, Illinois, AOCS, s/p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1965. Official methods of analysis. William Horwitz. 10^a ed. Washington, AOCS, 957 p.

BELTER, P.A. e A.K. SMITH. 1951. Protein Denaturation in Soybean Meal During Processing. J. Am. Oil Chem. Society 29(5):170-174.

BRASIL. 1976. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, IBGE, 816 p. (vol. 37).

BRASIL. Ministério do Interior (a). s/d. Contribuição ao desenvolvimento da agroindústria. Arroz. Campinas, Fundação Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos, 166 p. (Vol. VIII).

- BRASIL. Ministério do Interior (b). s/d. Contribuição ao desenvolvimento da agroindústria. Soja. Campinas, Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, 173 p. (vol. X).
- CAMARGO, R. 1969. Contribuição ao estudo de dois alimentos orientais - o tempeh e o tofu - obtidos da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Tese para Livre Docência. Piracicaba, ESALQ, 88 p.
- COSTA, S.I.; D.G. QUAST; N.A. NORETTI; W.L. CANTO e R.V. COBBE. 1976. O emprego da soja na alimentação humana. Bol. Inst. Tec. Alimentos, 46:1-24.
- DIOKNO-PALO, N. e M.A. PALO. 1968. Two Philippine species of Phycomycetes in tempeh production from soybean. Philippine J. Sci., 97(1):1-17.
- DJIEN, K.S. e C.W. HESSELTINE. 1961. Indonesian fermented foods. Soybean Digest, 22(1):14-15.
- ELDER, A.L. e D.M. RATHMANN. 1962. Seed oils in human nutrition. Economic Botany, 16(3):196-205.
- EVANS, R.J. e S.L. BANDEMER. 1967. Nutritive values of some oilseed proteins. Cereal Chemistry, 44(5):417-426.
- HACKLER, L.R.; K.H. STEINKRAUS; J.P. BUREN e D.B. HAND. 1964. Studies on the utilization of tempeh protein by weanling rats. J. Nutrition, 82:452-456.
- HART, F.L. e H.J. FISHER. 1971. Modern food analysis. New York, Springer-Verlag, 519 p.

- HESELTIME, C.W. 1965. A millenium of fungi, food, and fermentation. Mycologia, 57(2):149-197.
- HESELTIME, C.W.; G. HAVEN e A. MARTINELLI JR. 1966. Methods for producing tempeh. Patente nº 3.228.773. Estados Unidos, 3 p.
- HESELTIME, C.W. e H.L. WANG. 1967. Traditional fermented foods Biotech. Bioeng. IX:275-288.
- ILJAS, N.; A.C. PENG e W.A. GOULD. 1970. Tempeh. Find ways to preserve Indonesian soy food. Ohio Report, 55:22-23.
- JORGE, J.P.N. e R.S. GARUTTI. 1964. Métodos estatísticos aplicadós à análise sensorial de alimentos e bebidas. Bol. Inst. Agron. Campinas, nº 137. 9 p.
- LEITÃO, M.F.F.; T.J.B. MENEZES e J.S. TANGO. 1967/68. Produção de "tempeh", produto fermentado de soja. Col. do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas), 2:333-339.
- MARTINELLI, A. e C.W. HESSELTIME. 1964. Tempeh fermentation: package and tray fermentations. Fd. Technol. 18(5): 167-171.
- MORRISON, F.B. 1966. Alimentos e alimentação dos animais. Trad. de J.S. Veiga. 2ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 892 p.
- MURATA, K.; H. IKEHATA e T. MIYAMOTO. 1967. Studies on the nutritional value of tempeh. J. of Food Sci. 32:580-586.
- NAHAS, E.; R. CAMARGO e R.P. SCHOCKEN. 1978 a. Fermentação do farelo de amendoim. I. Ensaio tecnológico. Científica, 6(1). (no prelo).

- NAHAS, E.; R. CAMARGO e J.J. OLIVEIRA JR. 1978 b. Fermentação do farelo de amendoim. II. Composição centesimal e valor nutritivo. Científica. (no prelo).
- ORR, E. e D. AIDAR. 1967. The production of protein foods and concentrates from oilseeds. Tropical Products Institute. G 31. 104 p. + ap.
- PIMENTEL GOMES, F. 1966. Curso de Estatística Experimental. 3^a ed. Piracicaba, ESALQ. 404 p.
- PION, R. 1973. Composition des aliments vegetaux en protides et en acides amenés. Revue Française de Dietetique, 66: 3-15.
- PION, R. s/d. Composition et teneur en acides amines des tourteaux. INRA, p. 27-34.
- QUINN, M.R. e L.R. BEUCHAT. 1975. Functional property changes resulting from fungal fermentation of peanut flour. J. Food Sci., 40:475-478.
- QUINN, M.R.; L.R. BEUCHAT; J. MILLER; C.T. YOUNG e R.E. WORTHINGTON. 1975. Fungal fermentation of peanut flour: effects on chemical composition and nutritive value. J. Food Sci. 40:470-474.
- ROELOFSEN, P.A. e A. TALENS. 1964. Changes in some vitamins during molding of soybeans by *Rhizopus oryzae* in the production of tempeh kedele. J. Food Sci. 29(2):224-226.
- ROHR, R. 1973. Óleos e gorduras vegetais. Seus protudos protéicos. UNICAMP. 184 p.

- SARRUGE, J.R. e H.P. HAAG. s/d. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ, 56 p.
- SMITH, A.K.; J.J. RACKIS; C.W. HESSELTINE, M. SMITH; D. J. ROBBINS e A.N. BOOTH. 1964. Tempeh: nutritive value in relation to processing. Cereal Chemistry, 41:173-181.
- SORENSEN, W.G. e C.W. HESSELTINE. 1966. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. Mycologia, 58:681-689.
- STEINKRAUS, K.H. 1964. Research on Tempeh Technology in the United States. Japan, International Symposium on Oilseed Protein Foods. 8p.
- STEINKRAUS, K.H.; C.Y. LEE e P.A. BUCK. 1965. Soybean fermentation by the ontjom mod *Neurospora*. Food Technol. 19: 119-120.
- STEINKRAUS, K.H.; J.P. van BUREN; L.R. HACKLER e D.B. HAND. 1965. A pilot-plant process for the production of dehydrated tempeh. Fd. Technol. 19(1):63-68.
- STEINKRAUS, K.H.; Y.B. HWA; J.P. van BUREN; M.I. PROVVIDENTI e D.B. HAND. 1960. Studies on tempeh an Indonesian fermented soybean food. Fd. Research, 25:777-788.
- TOSELLO, A. 1975. Alimentos básicos: cereais, alimentos privilegiados da natureza. ABIA/SAPRO, Bol. Informativo, 21: 17-32.
- van BUREN, J.P.; L.R. HACKLER e K.H. STEINKRAUS. 1972. Solubilization of soybean tempeh constituents during fermentation. Cereal Chem. 49(2):208-211.

- van BUREN, J.P.; K.H. STEINKRAUS; L.R. HACKLER; I. ELRAWI e D.B. HAND. 1964. Heat effects on soymilk. Indices of protein quality in dried soymilks. J. Agr. Fd. Chem. 12(6):524-528.
- van VEEN, A.G.; D.C.W. GRAHAM e K.H. STEINKRAUS. 1968. Fermented peanut press cake. Cereal Sci. Today, 13(3):96-99.
- van VEEN, A.G. e G. SCHAEFER. 1950. The influence of the tempeh fungus on the soybean. Documenta Neerlandica et Morbis Tropicis, 11(3):271-281.
- WANG, H.L. e C.W. HESSELTINE. 1965. Studies on the extra cellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. Can. J. Microbiol. 11:727-732.
- WAGENKNECHT, A.C.; L.R. MATTICK; L.M. LEWIN; D.B. HAND e K.H. STEINKRAUS. 1961. Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. J. Fd. Sci. 26(4):373-376.
- WANG, H.L. e C.W. HESSELTINE. 1966. Wheat tempeh. Cereal Chemistry. 43:563-570.
- WANG, H.L.; D.I. RUTTLE e C.W. HESSELTINE. 1968. Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. J. Nutrition. 96:109-114.