Produção e caracterização físico-química e funcional de miso com substratos alternativos de produção nacional: Efeito da origem do koji e do tempo de fermentação

Production and physicochemical and functional characterization of miso using domestically produced alternative substrates: Effect of koji source and fermentation time

Yasmin Jorge Corrêa Felipe

ORIENTADO POR: PROF. DOUTOR DUARTE PAULO MARTINS TORRES

1.º CICLO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO | UNIDADE CURRICULAR ESTÁGIO
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO PORTO

TI

PORTO, 2026



Resumo

A fermentação em estado sólido com *Aspergillus oryzae* é a base de alimentos tradicionais como o miso, cujas enzimas promovem transformações nutricionais e sensoriais relevantes. Este trabalho produziu e caracterizou misos de substratos alternativos nacionais, castanha (*Castanea sativa*), feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) e sua mistura, avaliando os efeitos da origem do koji (comercial vs. laboratorial) e do tempo de fermentação. Determinaram-se a atividade da alfa-amílase, os açúcares redutores, os compostos fenólicos totais (TPC), o pH, a atividade da água e a humidade ao longo da fermentação. Os açúcares redutores aumentaram significativamente nos misos com koji comercial (castanha e feijão), enquanto a alfa-amílase variou com a combinação koji×substrato, sem padrão único: aumentou na castanha com koji laboratorial e diminuiu no feijão com koji comercial. O TPC foi sistematicamente superior nos misos com koji laboratorial, possivelmente associado à sua maior atividade da água. O tipo de koji determinou as propriedades físico-químicas e o teor fenólico, enquanto a atividade enzimática dependeu mais do substrato; a castanha revelou-se mais favorável à amilólise e o feijão preto ao potencial fenólico. Ainda que preliminares e limitados pelo reduzido número de réplicas biológicas, os resultados sugerem que estes substratos têm potencial funcional comparável ao de leguminosas alternativas já descritas, podendo a combinação de koji e substrato otimizar o perfil funcional do miso.

Palavras-Chave*: Aspergillus oryzae*; *Phaseolus*; Alfa-Amílases; Fenóis.

Abstract

Solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae* is the basis of traditional foods such as miso, whose enzymes drive significant nutritional and sensory transformations. This work produced and characterised misos made from alternative national substrates: chestnut (*Castanea sativa*), black bean (*Phaseolus vulgaris*) and their mixture, assessing the effect of koji origin (commercial vs laboratory) and fermentation time. Alpha-amylase activity, reducing sugars, total phenolic content (TPC), pH, water activity and moisture were determined throughout the fermentation. Reducing sugars increased significantly in the misos made with commercial koji (chestnut and bean). In contrast, alpha-amylase activity varied across the koji×substrate combinations, with no single pattern: increasing in chestnut with laboratory koji and decreasing in bean with commercial koji. TPC was consistently higher in misos made with laboratory koji, possibly due to its higher water activity. Koji type determined the physico-chemical properties and phenolic content, whereas enzymatic activity depended more on the substrate; chestnut proved more favourable for amylolysis, and black bean for phenolic potential. Although preliminary and limited by the small number of biological replicates, the results suggest that these national substrates have functional potential comparable to that of previously described alternative legumes, and that the combination of koji and substrate can be used to optimise the final functional profile of miso.

Keywords: *Aspergillus oryzae*; *Phaseolus*; alpha-Amylases; Phenols.

Lista de símbolos

Aw / aw - Atividade da água

g – Gramas

ºC - Graus *Celsius*

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanómetro

p/v - Massa por volume

U/g - Unidade de atividade enzimática por grama

v/v - Volume por volume

µL - Microlitro

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

A. oryzae *- Aspergillus oryzae*

ANOVA – Análise de variância

DNS - Ácido 3,5-dinitrossalicílico

DP - Desvio padrão

EGA - Equivalentes de ácido gálico

KC - Koji comercial

KL - Koji laboratorial

ms - Matéria seca

pH - Potencial de hidrogénio

TPC - Teor de fenólicos totais *(Total Phenolic Content)*

Sumário

Introdução *1*

Objetivos *2*

Metodologia *3*

1. Matérias-primas 3
2. Produção do *koji* laboratorial 3
3. Pré-processamento dos substratos 4
4. Formulação e produção do miso 4
5. Desenho experimental 5
6. Atividade da alfa-amílase e açúcares redutores totais 6
   a) Extração enzimática 6
   b) Preparação do reagente de DNS 6
   c) Açúcares redutores totais 6
   d) Atividade da alfa-amílase 7
7. Teor de fenólicos totais 7
8. Análises físico-químicas 8
9. Análise estatística 9

Resultados e discussão *9*

1. A incubação do *koji* 9
2. Produção dos *misos* 11

Conclusões *15*

Referências *16*

Introdução

A fermentação alimentar em estado sólido destaca-se pela sua eficiência na produção de enzimas e metabólitos bioativos, sendo amplamente utilizada nas indústrias alimentar e biotecnológica (1). Neste contexto, o koji ocupa um lugar de destaque, por se tratar de um substrato sólido inoculado com o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, que constitui a base de inúmeros alimentos fermentados tradicionais asiáticos, como o miso, o *sake* e o molho de soja (2,3). Este fungo distingue-se pela sua capacidade de secretar um vasto conjunto de enzimas hidrolíticas, nomeadamente amílases, proteases e lipases, que transformam o substrato, alterando o seu perfil nutricional, sensorial e funcional (4). Entre estas, a alfa-amílase assume particular relevância, hidrolisando as ligações glicosídicas alfa-1,4 do amido e convertendo-o em açúcares redutores que alimentam a fermentação microbiana e contribuem para o desenvolvimento do sabor, do aroma e da cor do produto (2). O miso é um dos produtos fermentados mais representativos desta tradição, obtido pela maturação de koji com sal e um ingrediente principal, tradicionalmente soja ou arroz (3). Constitui, assim, um alimento rico em compostos bioativos, com propriedades antioxidantes documentadas (5). A produção de miso com substratos não convencionais tem sido explorada em estudos recentes, que demonstram que a substituição dos ingredientes tradicionais por leguminosas e cereais alternativos pode resultar em produtos com perfis nutricionais e funcionais igualmente interessantes (5,6).

Neste contexto, a castanha (*Castanea sativa* Mill.) e o feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) surgem como substratos de interesse para a produção de miso de base local. A castanha é rica em amido, tornando-a um substrato adequado para a ação da alfa-amílase, e apresenta um teor relevante de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes potenciadas pelo processo fermentativo (7). O feijão

preto destaca-se pelo elevado teor proteico e pela riqueza em compostos fenólicos, sendo que a sua fermentação com *A. oryzae* promotora de um aumento da atividade antioxidante, associado à transformação de compostos fenólicos durante o processo fermentativo (8). A valorização destes ingredientes de produção nacional insere-se numa tendência de adaptação de técnicas fermentativas tradicionais a contextos alimentares regionais, contribuindo para a sustentabilidade e para a diversificação da oferta alimentar (5,6)

Objetivos

Objetivo geral: Produzir e caracterizar, física-química e funcionalmente, misos elaborados com substratos alternativos de produção nacional, castanha (Castanea sativa Mill.), feijão preto (Phaseolus vulgaris L.) e a sua mistura, avaliando o efeito da origem do koji (comercial vs. inoculado em laboratório), do substrato e do tempo de fermentação, bem como da sua interação, nas propriedades do produto.

Objetivos específicos:

1. Implementar e otimizar os métodos analíticos utilizados na caracterização das amostras, nomeadamente o método do DNS (para os açúcares redutores e para a atividade da alfa-amílase) e o método de Folin-Ciocalteu (para os compostos fenólicos totais).
2. Determinar a atividade da alfa-amílase no koji e nos misos e avaliar a sua evolução ao longo do tempo de fermentação, em função da origem do koji e do substrato.
3. Determinar o teor de açúcares redutores no koji e nos misos e avaliar a sua evolução ao longo da fermentação, em função da origem do koji e do substrato.
4. Quantificar o teor de compostos fenólicos totais no koji e nos misos e avaliar a sua evolução ao longo do tempo de fermentação.

5. Caracterizar as amostras quanto ao pH, à atividade da água e ao teor de humidade.
6. Comparar o efeito do substrato, da origem do koji e da respetiva interação no perfil físico-químico e funcional dos misos ao longo da fermentação.

Metodologia

1. Matérias-primas

Para a produção do koji laboratorial e do miso, foram utilizados como substratos principais castanha (*Castanea sativa*) congelada e feijão preto (*Phaseolus vulgaris*), ambos adquiridos na cadeia de distribuição Pingo Doce (Porto, Portugal), bem como a cevada (*Hordeum vulgare*), adquirida na loja Celeiro, utilizada como substrato de inoculação. O fungo *A. oryzae*, responsável pela fermentação do koji, foi utilizado em duas formas: comercial, adquirido à empresa Fermentation Culture já inoculado em cevada e pronto a usar, e laboratorial, produzido no âmbito deste trabalho conforme descrito na secção seguinte. O sal utilizado na formulação do miso foi sal alimentar comum.

2. Produção do koji laboratorial

O koji laboratorial foi produzido através da inoculação de *A. oryzae* em cevada (*Hordeum vulgare*). A cevada foi previamente demolhada durante a noite e, no dia seguinte, cozida a vapor na Bimby (VORWERK) durante 75 minutos. Após arrefecimento, procedeu-se à inoculação: 0,4 g de esporos de *A. oryzae* foram misturados com 9,5 g de farinha de milho, de forma a facilitar uma distribuição homogénea, e a mistura foi polvilhada sobre os 1820 g de cevada cozida e incorporada manualmente. De seguida, foi recolhida a amostra correspondente ao tempo 0, após o qual a cevada inoculada foi colocada numa bandeja perfurada sobre um pano húmido e coberta com outro, sendo então transferida para uma

câmara de fermentação CAMBRO com temperatura controlada entre os 27ºC e 30ºC e humidade relativa entre 80 e 90%.

Todas as recolhas de amostras foram realizadas em câmara de fluxo laminar, de modo a minimizar o risco de contaminação. Às 24 horas, o koji foi misturado na totalidade, procedimento inerente ao processo de fermentação, e foram recolhidos aproximadamente 20 g de amostra. Nos tempos seguintes (48 e 72 horas), a recolha foi feita a partir de um canto da bandeja, sem perturbar o restante material, retirando igualmente cerca de 20 g. Em todos os pontos temporais, as amostras recolhidas foram acondicionadas em sacos embalados a vácuo até à realização das análises descritas a seguir.

3. Pré-processamento dos substratos

Antes da produção do miso, os substratos foram submetidos a um pré-processamento específico, de acordo com as suas características. A castanha congelada foi descongelada e cozida a vapor na Bimby (VORWERK) durante 60 minutos. O feijão preto foi demolhado durante a noite em água e, no dia seguinte, cozido na Bimby durante 75 minutos. Após a cozedura, ambos os substratos foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente até atingirem aproximadamente 35 °C, temperatura a partir da qual foram considerados adequados para mistura com o koji, evitando assim a inativação do fungo por exposição a temperaturas elevadas.

4. Formulação e produção do miso

A produção de miso baseou-se numa formulação com proporção 1:1 (m/m) entre koji de cevada e substrato (castanha, feijão preto ou uma mistura de ambos), à qual se adicionou sal comum (NaCl) numa proporção de 8% da massa combinada de koji e substrato.

Nas produções com koji comercial (KC) utilizaram-se 250 g de koji de cevada e

250 g de substrato (500 g no total), com adição de 40 g de sal. Nas produções com koji laboratorial (KL) utilizaram-se 400 g de koji e 400 g de substrato (800 g no total), com adição de 64 g de sal. No miso de mistura com KL, o substrato foi constituído por partes iguais de castanha e de feijão preto. As misturas foram preparadas em recipientes de aço inoxidável e, posteriormente, transferidas para frascos de vidro previamente desinfetados com etanol a 70%. A massa acondicionada em cada frasco foi de aproximadamente 240 g (KC) e 430 g (KL). O acondicionamento foi feito por prensagem manual, de modo a eliminar bolsas de ar; a superfície foi coberta com película aderente e um peso de vidro, e a abertura do frasco foi vedada com papel. A fermentação decorreu em estufa a 30 °C.

Os grupos KC foram amostrados aos 0, 30 e 60 dias, e os grupos KL aos 0 e 30 dias. Em cada ponto temporal, recolheram-se amostras em duplicata, sendo cada réplica correspondente a um frasco de vidro distinto.

5. Desenho experimental

Na Tabela I estão descritas as produções de koji e de miso efetuadas, bem como os tempos de recolha das amostras para análise.

Tabela I. Desenho experimental: códigos, grupos de amostras, substratos e tempos de amostragem. *KC: koji comercial; KL: koji laboratorial. n = número de réplicas por ponto de amostragem.*

Código	Amostra	Substrato	Tempo	n
Koji inoculado em laboratório				
A	Koji laboratorial	Cevada	0 h	1
B	Koji laboratorial	Cevada	24 h	1
C	Koji laboratorial	Cevada	48 h	1
D	Koji laboratorial	Cevada	72 h	1
Miso — Koji comercial (KC)				
E0	Miso KC	Castanha	0 dias	2
E30	Miso KC	Castanha	30 dias	2
E60	Miso KC	Castanha	60 dias	2
F0	Miso KC	Feijão preto	0 dias	2
F30	Miso KC	Feijão preto	30 dias	2
F60	Miso KC	Feijão preto	60 dias	2
Miso — Koji laboratorial (KL)				
G0	Miso KL	Castanha	0 dias	2
G30	Miso KL	Castanha	30 dias	2

Código	Amostra	Substrato	Tempo	n
H0	Miso KL	Feijão preto	0 dias	2
H30	Miso KL	Feijão preto	30 dias	2
I0	Miso KL	Mistura (castanha + feijão preto)	0 dias	2
I30	Miso KL	Mistura (castanha + feijão preto)	30 dias	2

6. Atividade da alfa-amílase e açúcares redutores totais

a) Extração enzimática

Para a determinação da atividade enzimática e dos açúcares redutores, preparou-se um tampão de fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). A extração foi realizada nas 32 amostras, numa proporção de 1:10 (p/v), pesando-se 4 g de amostra para 40 mL de solução tampão. A homogeneização decorreu sob agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente, seguindo-se filtração com papel de filtro. O extrato enzimático obtido foi utilizado de imediato nos ensaios de quantificação dos açúcares redutores totais e da atividade da alfa-amílase.

b) Preparação do reagente de DNS

O reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi preparado dissolvendo 10 g de DNS numa solução 2 M de hidróxido de sódio, à qual se adicionou uma solução de 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio em água destilada, sob aquecimento e agitação constantes. O volume final foi ajustado para 1 L com água destilada. O reagente foi conservado ao abrigo da luz até à utilização.

c) Açúcares redutores totais

Os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método colorimétrico do DNS. A 0,5 mL de extrato adequadamente diluído adicionaram-se 1000 µL de reagente de DNS; a mistura foi mantida em banho de água em ebulição durante 10 minutos, arrefecida em banho de gelo durante 5 minutos e a absorvância lida a 540 nm. Nesta determinação, não se incluiu qualquer etapa de incubação enzimática, uma vez que se pretende quantificar os açúcares redutores presentes

na amostra, e não a atividade hidrolítica. A quantificação foi feita por interpolação numa curva-padrão de D-glicose. O ensaio foi realizado em duplicado. Os açúcares redutores totais foram expressos em mg por grama de matéria seca total da amostra.

d) Atividade da alfa-amílase

A atividade da alfa-amílase foi determinada pelo mesmo método colorimétrico do DNS, com base na quantificação dos açúcares redutores libertados pela hidrólise do amido. Para tal, incubaram-se 0,5 mL de extrato (fonte enzimática) com 0,5 mL de amido solúvel a 2% (p/v) em tampão citrato 0,1 M (pH 4,8), a 50 °C durante 20 minutos. Após a incubação, adicionaram-se 1000 µL de reagente de DNS, e a revelação de cor prosseguiu conforme descrito em 6.3. A quantidade de açúcares redutores libertados foi calculada a partir da curva-padrão de D-glicose. O ensaio foi realizado em duplicado.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a libertação de 1 µmol de açúcares redutores (expressos como equivalentes de glicose) por minuto, nas condições do ensaio.

Para comparar os misos entre si, como os misos tinham teores de koji semelhantes, mas os kojis usados diferiam muito na humidade, massas iguais de koji correspondiam a quantidades diferentes de koji seco, e a cargas enzimáticas diferentes. Para eliminar o efeito da humidade na comparação dos misos, a atividade da alfa-amílase foi expressa em U por grama de koji seco adicionado à formulação, e não por grama de miso.

7. Teor de fenólicos totais

A extração foi realizada em amostras frescas, sem secagem prévia, e os resultados foram posteriormente expressos em base seca, com base no teor de humidade de

cada amostra. Após homogeneização em almofariz, pesaram-se cerca de 5 g de amostra para um matraz e adicionaram-se 50 mL de etanol a 70% (v/v). A mistura foi macerada sob agitação (ao abrigo da luz, à temperatura ambiente) durante 1 h 30 min, submetida a banho ultrassónico durante 5 minutos e novamente macerada até perfazer 3 horas, seguindo-se repouso overnight sem agitação, um procedimento de extração prolongada com eficácia documentada na recuperação de fenólicos (9). O extrato foi filtrado com papel de filtro e utilizado de imediato, sem congelação.

O teor em fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Em cada tubo de ensaio foram pipetados 200 µL de amostra ou padrão, aos quais se adicionaram 1000 µL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10, v/v) e 750 µL de solução de carbonato de sódio (100 g/L). A mistura foi incubada durante 2 horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A leitura da absorvância foi realizada em microplaca a 750 nm. A quantificação foi feita por interpolação numa curva-padrão de ácido gálico (5–100 mg/L), sendo os resultados expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EGA/g em peso seco). O ensaio foi realizado em duplicado (réplica analítica).

8. Análises físico-químicas

pH: determinado com um medidor de pH com elétrodo, calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Pesou-se cerca de 1 g de amostra, à qual se adicionaram 20 mL de água destilada, sem homogeneização adicional; o elétrodo foi mergulhado na suspensão e o valor registado após estabilização. *Atividade da água (aw)*: determinada no equipamento LabSwift-aw, com a amostra colocada diretamente na cápsula de medição, em base húmida, sem homogeneização prévia. Humidade: determinada por termogravimetria numa balança de humidade

por infravermelhos (VWR), pesando-se cerca de 3,5 g de amostra; o resultado, em percentagem, foi lido diretamente e arredondado às décimas.

9. Análise estatística

O efeito do tempo foi avaliado por ANOVA de medidas repetidas (≥3 tempos) ou teste t emparelhado (2 tempos), com post-hoc de Holm, dado que cada frasco foi reamostrado ao longo da fermentação. As comparações entre koji comercial (KC) e laboratorial (KL), e entre substratos, foram realizadas em frascos independentes, para cada tempo comum, por teste t (dois grupos) ou ANOVA de uma via com post-hoc de Holm (três grupos); o nível de significância foi fixado em $\alpha=0,05$. Para os fenólicos totais, por não existir réplica biológica em nenhuma amostra, todas as comparações, tanto do efeito do tempo como entre produtos, têm caráter mais exploratório.

Optou-se por testes paramétricos por as variáveis serem contínuas, de medição espetrofotométrica, com erro analítico tendencialmente normal; por as unidades analisadas corresponderem a médias de réplicas técnicas, mais próximas da normalidade do que leituras individuais; e pela ausência de alternativa não paramétrica viável, uma vez que, com n=2, testes de ordens não têm potência suficiente para atingir significância. Dado o n reduzido (n=2 nos misos; n=1 no koji), a normalidade foi assumida teoricamente, não verificada, pelo que os p-valores são indicativos, apoiados na dimensão do efeito e na concordância entre frascos; no koji, a ausência de réplica biológica impede também inferência válida sobre o efeito do tempo nas restantes variáveis, sendo os p apresentados apenas exploratórios.

Resultados e discussão

1. A incubação do koji

Uma vez que o koji correspondeu a um único lote acompanhado ao longo do tempo (n=1), não foi possível realizar inferência estatística válida sobre o efeito do tempo, pelo que os resultados são interpretados de forma meramente descritiva. Ainda assim, observaram-se aumentos consistentes e marcados da atividade da alfa-amílase, dos açúcares redutores e dos compostos fenólicos totais ao longo das 72 horas de incubação (Figuras 1A, 2A e 3A). Estes aumentos traduzem a intensa atividade hidrolítica do *A. oryzae* durante a fermentação em estado sólido, designadamente a hidrólise do amido, com libertação de açúcares redutores, e a libertação de compostos fenólicos ligados à matriz, promovida pelas enzimas que degradam a parede celular do substrato (1,4).

Em paralelo, o pH diminuiu a partir das 24 horas (após um ligeiro aumento inicial) e a atividade da água (aw) decresceu gradualmente, enquanto o teor de humidade aumentou ao longo da incubação (Figura 4). O aumento da humidade é compatível com a produção de água metabólica resultante da respiração do fungo e também pode refletir as condições de incubação, principalmente a humidade relativa na câmara de incubação. Importa notar que a humidade e a aw traduzem propriedades distintas: a primeira corresponde à água total, e a segunda à fração de água livre e disponível, pelo que podem variar em sentidos opostos, como aqui se verificou. A diminuição da aw explica-se, muito provavelmente, pela acumulação de solutos de baixo peso molecular gerados pela hidrólise (açúcares redutores, aminoácidos, péptidos e ácidos orgânicos): ao despolimerizar as macromoléculas, a atividade enzimática multiplica o número de partículas osmoticamente ativas em solução, que retêm a água e reduzem a sua disponibilidade. Esta redução da aw é, assim, coerente com o aumento simultâneo dos açúcares redutores, constituindo duas manifestações do mesmo processo

hidrolítico. No conjunto, estas alterações são coerentes com o metabolismo ativo do *A. oryzae* característico deste tipo de fermentação.

2. Produção dos misos

Nos misos, a atividade da alfa-amílase variou significativamente ao longo do tempo nos misos KC castanha, KC feijão e KL castanha ($p<0,05$), mas não nos *misos* KL feijão e mistura. Os sentidos, porém, não foram uniformes: no KL castanha a atividade aumentou de forma marcada (≈492 → 1046 U/g, de 0 para 30 dias), no KC castanha atingiu um máximo aos 30 dias com posterior descida, e no KC feijão diminuiu progressivamente ao longo da fermentação. Entre os produtos, o miso KL castanha superou o comercial aos 30 dias ($p=0,011$; Figura 1D), enquanto, no feijão, foi o comercial a apresentar valores mais altos no início, equilibrando-se posteriormente (sem diferença significativa aos 30 dias; Figura 1C). O substrato teve efeito significativo no koji laboratorial apenas aos 30 dias, com o post-hoc de Holm a identificar diferença apenas entre castanha e mistura ($p=0,041$; Figura 1B). Este padrão irregular sugere que a atividade amilolítica depende mais do lote/processo do koji e do substrato do que apenas do tempo de fermentação.

Os açúcares redutores seguiram uma tendência semelhante, mas mais ténue: a diferença entre koji laboratorial e comercial foi significativa apenas na castanha e só aos 0 dias, com o KL a superar o comercial ($p=0,041$; Figura 2D), não se observando diferenças no feijão. Quanto ao substrato, no koji laboratorial registou-se um efeito global significativo aos 0 dias (ANOVA $p=0,011$), embora nenhuma comparação par-a-par tenha sobrevivido à correção de Holm (Figura 2B); aos 30 dias não houve efeito de substrato.

O achado mais consistente foi o teor de fenólicos totais (TPC), sistematicamente superior nos misos de koji laboratorial (KL) relativamente aos de koji comercial (KC), em ambos os substratos e em ambos os tempos ($p<0,01$; Figuras 3C e 3D). O

post-hoc de Holm revelou ainda um efeito do substrato: o miso de castanha apresentou os valores mais baixos, diferindo significativamente da mistura aos 0 dias e do feijão aos 30 dias (Figura 3B). Esta superioridade dos misos KL poderá estar associada à maior atividade da água (aw) do koji laboratorial, que favorece os processos enzimáticos de libertação dos compostos fenólicos ligados à matriz vegetal. Trata-se, contudo, do resultado com a base estatística mais frágil, uma vez que os fenólicos não dispõem de réplica biológica (n=1 por amostra): as diferenças, embora muito consistentes na direção, são de natureza exploratória e devem ser interpretadas como tendência a confirmar.

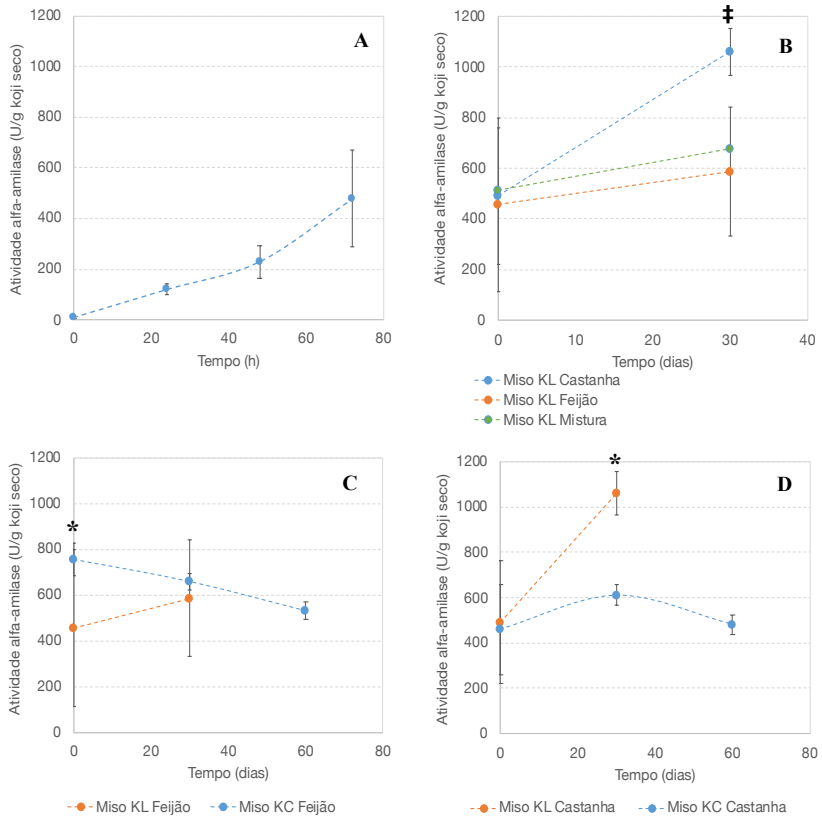


Figura 1. Evolução da atividade da alfa-amílase ao longo do tempo. Incubação fúngica do koji (A); fermentações dos misos de castanha, feijão e mistura (feijão + castanha) produzidos com koji laboratorial (B); fermentações dos misos de feijão produzidos com koji laboratorial ou comercial (C); fermentações dos misos de castanha produzidos com koji laboratorial ou comercial (D). * diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os misos obtidos com koji laboratorial e comercial, no mesmo tempo de fermentação. ‡ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os *misos* KL castanha vs mistura, no mesmo tempo de fermentação, com correção de Holm.

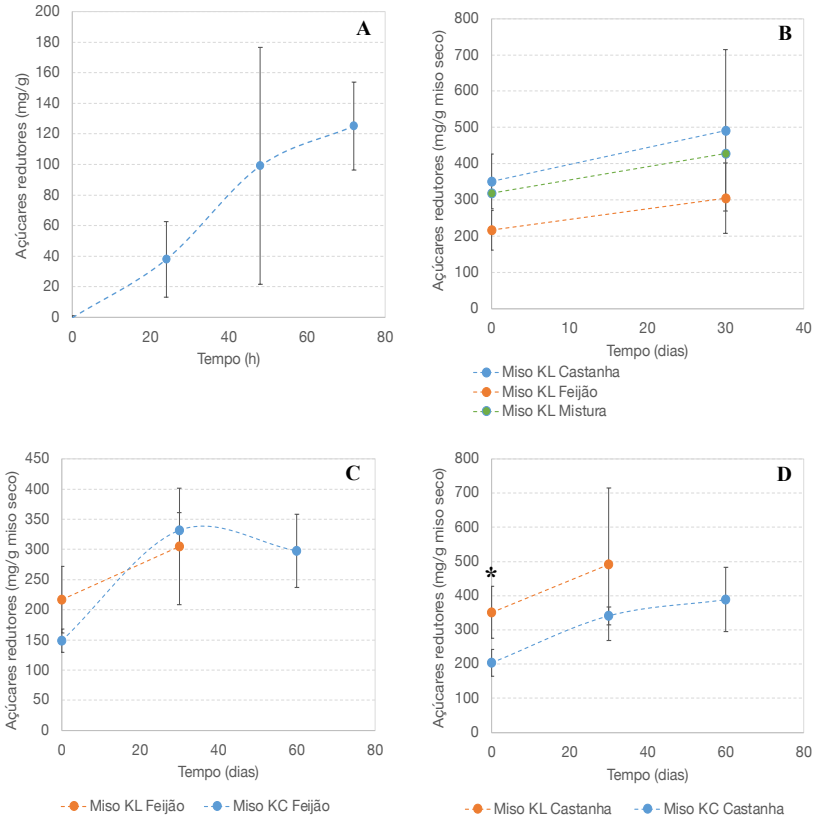


Figura 2. Evolução do teor de açúcares redutores ao longo do tempo. Incubação fúngica do koji (A); fermentações dos misos de castanha, feijão e mistura (feijão + castanha) produzidos com koji laboratorial (B); fermentações dos misos de feijão produzidos com koji laboratorial ou comercial (C); fermentações dos misos de castanha produzidos com koji laboratorial ou comercial (D). * diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os misos obtidos com koji laboratorial e comercial, no mesmo tempo de fermentação.

O pH desceu significativamente ao longo da fermentação nos misos KC, em ambos os substratos, e no KL feijão, refletindo a acidificação esperada. Entre produtos, o miso comercial acidificou de forma mais acentuada, apresentando-se significativamente mais ácido do que o laboratorial aos 30 dias em ambos os substratos, embora no início da fermentação do feijão exibisse um pH mais elevado (Figura 5).

A diferença mais marcada de todo o estudo verificou-se na aw e na humidade: os misos KL apresentaram valores muito superiores aos KC em todos os tempos e substratos ($p<0,001$ na maioria dos casos), sem variação relevante entre substratos. Uma vez que esta diferença já estava presente ao dia 0 e se manteve estável ao longo do tempo, é mais provável que reflita diferenças composicionais

entre os dois tipos de koji utilizados como inóculo do que um efeito da fermentação em si (Figura 5).

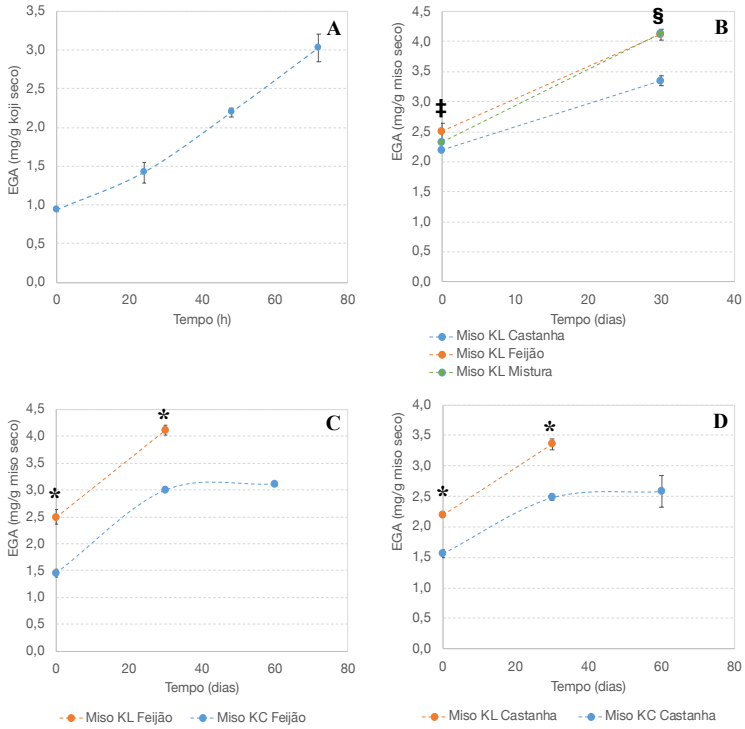


Figura 3. Evolução do teor em compostos fenólicos totais ao longo do tempo. Incubação fúngica do koji (A); fermentações dos misos de castanha, feijão e mistura (feijão + castanha) produzidos com koji laboratorial (B); fermentações dos misos de feijão produzidos com koji laboratorial ou comercial (C); fermentações dos misos de castanha produzidos com koji laboratorial ou comercial (D). * diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os misos obtidos com koji laboratorial e comercial, no mesmo tempo de fermentação. ‡ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os misos KL castanha vs mistura, no mesmo tempo de fermentação, com correção de Holm. § diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os misos KL castanha vs feijão, no mesmo tempo de fermentação, com correção de Holm.

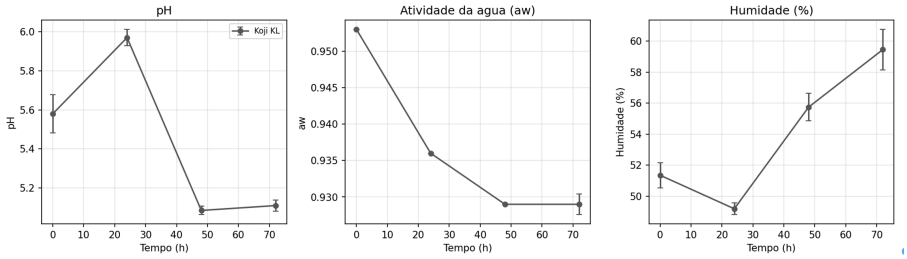


Figura 4. Evolução do pH, aw e humidade ao longo do tempo durante a incubação fúngica do koji laboratorial.

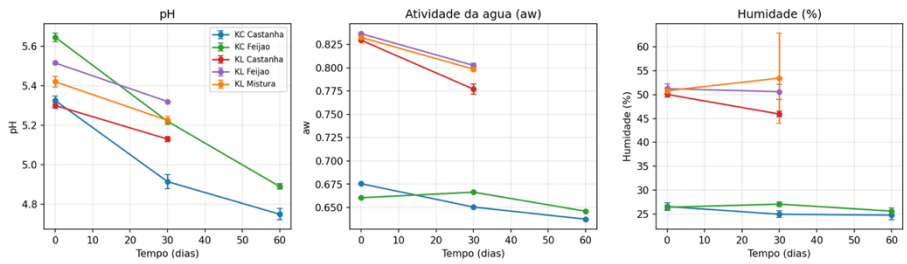


Figura 5. Evolução do pH, aw e humidade ao longo do tempo durante a fermentação dos misos.

Conclusões

Este trabalho traçou um perfil funcional preliminar de misos de castanha, feijão preto e da sua mistura, elaborados com koji comercial e laboratorial. A atividade da alfa-amílase variou significativamente ao longo da fermentação em vários misos, mas sem sentido único (aumentou no miso de castanha com koji laboratorial e diminuiu no feijão com koji comercial), dependendo sobretudo da interação koji×substrato; os açúcares redutores seguiram tendência semelhante, mas mais ténue. O teor de fenólicos totais foi o resultado mais consistente, embora com a base estatística mais frágil. O teor de fenólicos totais foi sistematicamente superior nos misos de koji laboratorial e crescente ao longo da fermentação, com o feijão a acumular mais fenólicos do que a castanha. Nas propriedades físico-químicas, o pH desceu (acidificação mais acentuada no koji comercial), enquanto a atividade da água e a humidade foram muito superiores nos misos de koji laboratorial, diferença já presente ao dia 0 e atribuível à composição do koji utilizado.

Em síntese, o tipo de koji determinou as propriedades físico-químicas e os fenólicos, ao passo que a atividade enzimática foi governada pela interação koji×substrato, sem generalizações simples; os substratos revelaram vocações distintas (feijão→fenólicos, castanha→amilólise) e a mistura um perfil intermédio. Embora preliminares, devido ao reduzido número de réplicas biológicas (n=2 nos misos; n=1 no koji e nos fenólicos), estes resultados indicam que a seleção conjunta de koji e substrato pode ser usada para otimizar o perfil funcional do miso, carecendo de confirmação com réplicas biológicas adicionais.

Referências

1. Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation. 2017 Jan;1(1):52–71. doi:10.1016/j.biori.2017.01.002
2. Straka D, Hleba L, Ailer Š. Koji – the only one domesticated fungi: characterization, enzymology, and use. Scifood. 2025 Jan 1;19:426–36. doi:10.5219/scifood.63
3. Kusumoto KI, Yamagata Y, Tazawa R, Kitagawa M, Kato T, Isobe K, et al. Japanese traditional miso and Koji making. Journal of Fungi. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2021. doi:10.3390/jof7070579
4. Daba GM, Mostafa FA, Elkhateeb WA. The ancient koji mold (Aspergillus oryzae) as a modern biotechnological tool. Bioresources and Bioprocessing. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. doi:10.1186/s40643-021-00408-z
5. Santos R, Parente B, Mota M, Raymundo A, Prista C. Fermentation Process Evaluation of a Sustainable and Innovative Miso Made from Alternative Legumes. Foods. 2025 Dec 1;14(23). doi:10.3390/foods14234131
6. Santos R, Mansidão A, Mota M, Raymundo A, Prista C. Development and physicochemical characterization of a new grass pea (Lathyrus sativus L.) miso. J Sci Food Agric. 2021 Apr 1;101(6):2227–34. doi:10.1002/jsfa.10842 PubMed PMID: 33006382.
7. Santos M V., Banfi S, Santos R, Mota M, Raymundo A, Prista C. Improving chestnut physicochemical properties through fermentation – Development of chestnut Amazake. Food Chem X. 2023 Mar 30;17. doi:10.1016/j.fochx.2023.100597
8. Lee IH, Hung YH, Chou CC. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. Int J Food Microbiol. 2008 Jan 31;121(2):150–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.008 PubMed PMID: 18031859.
9. Lazaridis DG, Karabagias VK, Andritsos ND, Giannakas AE, Karabagias IK. A Grape-Derived Solvent for the Recovery of Phenolic Compounds from Food Waste By-Products Using Ultrasonic-Assisted and Overnight Extraction. Molecules. 2025 Oct 1;30(19). doi:10.3390/molecules30193878 PubMed PMID: 41097299.

Parecer do orientador do Trabalho Complementar

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

PARECER

Na qualidade de orientador, tive a oportunidade de acompanhar a estudante Yasmin Jorge Corrêa Felipe ao longo do estágio curricular da Licenciatura em Ciências da Nutrição da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, realizado na FCNAUP. Durante este período, a Yasmin demonstrou elevado sentido de responsabilidade, empenho e competência técnico-científica na execução das diferentes atividades desenvolvidas.

Ao longo do estágio, revelou uma excelente capacidade de aprendizagem, organização e autonomia, conduzindo com rigor as várias etapas do projeto, desde a revisão bibliográfica sobre fermentação alimentar e produtos obtidos com Aspergillus oryzae, até à produção laboratorial de koji e miso, à adaptação e implementação de métodos analíticos, e à interpretação crítica dos resultados obtidos. Demonstrou ainda particular capacidade para ultrapassar desafios experimentais e adaptar procedimentos às condições reais de trabalho laboratorial, evidenciando maturidade científica e espírito de iniciativa.

O trabalho de investigação intitulado “Produção e caracterização físico-química e funcional de miso com substratos alternativos de produção nacional: efeito da origem do koji e do tempo de fermentação” permitiu explorar o potencial da castanha portuguesa e do feijão preto como matérias-primas para o desenvolvimento de produtos fermentados inovadores, contribuindo para a valorização de ingredientes nacionais e para o aprofundamento do conhecimento científico na área da fermentação alimentar. A qualidade do trabalho realizado, bem como o rigor demonstrado na sua execução, refletem as competências adquiridas pela estudante ao longo da sua formação académica.

Considero este estágio excelente nas suas várias dimensões. A dedicação, a capacidade de trabalho, o rigor científico e o profissionalismo demonstrados

pela Yasmin, aliados às suas qualidades humanas e relacionais, permitem-me afirmar que será uma mais-valia em qualquer contexto profissional que venha a integrar. Estou convicto de que possui todas as condições para continuar a desenvolver um percurso de sucesso, particularmente nas áreas da inovação alimentar, da investigação e do desenvolvimento de produtos alimentares. Desejo-lhe os maiores sucessos pessoais e profissionais.

Porto, 3 de julho de 2026

Assinado por: **Duarte Paulo Martins Torres**
Num. de Identificação: 10821943
Data: 2026.07.03 01:32:06 +0100

Duarte Paulo Martins Torres
Professor Associado da FCNAUP

