

# APLICAÇÃO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* PARA OBTENÇÃO DE MALTES ESPECIAIS: UMA REVISÃO

Palavras-Chave: Cerveja, fermentação em estado sólido, koji

Autores/as:

BRUNO PIATO OLIVA (UNICAMP)

ALINE DUARTE CORREA DE BRITO (UNICAMP)

Prof. Dr. FLÁVIO LUÍS SCHMIDT (UNICAMP)

## Koji: Histórico e aplicações

Recentemente, um fungo tradicional do Japão, conhecido como koji, tem chamado atenção na gastronomia e no meio acadêmico, devido a sua diversidade de aplicações, atividade enzimática, perfil aromático, gosto umami e associações com benefícios à saúde (YANG *et al.*, 2021; PUNIA *et al.*, 2021; YOSHIZAKI *et al.*, 2014). Originário da China, o koji é considerado o Fungo Nacional do Japão pela *The Scientific Conference of Brewing Society Japan* desde 2006 (YAMASHITA, 2021; BREWING SOCIETY OF JAPAN, 2013).

O koji pode ser descrito como uma cultura de fungos específicos produzida a partir de cereais cozidos no vapor, tal como observado na Figura 1. Os fungos utilizados na produção de koji podem variar conforme o produto final e a região, sendo os mais comuns: *Aspergillus oryzae* e suas diversas cepas, *A. sojae*, *A. kawachii*, *A. shirousamii*, e *A. awamori*, cada um apresentando perfil aromático e enzimático particular. O *A. oryzae*, porém, destaca-se como o fungo mais utilizado no Japão (TAMANG & KAILASAPATHY, 2010).



Figura 1 – koji de cevada: cevada descascada fermentada com *Aspergillus oryzae* (foto de autoria própria)

A aplicação de koji em alimentos é conhecida e praticada há milênios nos países orientais, fazendo parte do processo produtivo do saquê e outros vinhos de arroz, shochu e outros destilados, vinagres de cereais, pastas proteicas (missô), molho de soja (shoyu), entre outros (YOSHIZAWA, 1999; KITAMOTO, 2015). Sua aplicação dá-se principalmente por sua produção enzimática (NAKAJI, 2020). O fungo atua convertendo amido em açúcares, a partir de enzimas como  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, e proteínas em peptídeos e aminoácidos, fornecendo nutrientes para leveduras e outros microrganismos envolvidos em processos fermentativos concomitantes ou posteriores (PARK *et al.*, 2017; ZHU & TRAMPER, 2013).

Além de enzimas amilolíticas e proteolíticas, o koji produz mais de 50 enzimas, incluindo hemiceluloses e fitases, envolvidas na quebra da parede celular dos cereais e na decomposição de compostos anti-nutricionais (ZHANG; WU; YA, 2020). Através da atividade enzimática também serão produzidos os precursores de aromas e liberados os aminoácidos com gosto umami (NINKAJI, 2020)

Atualmente, encontra-se grande número de estudos e desenvolvimento de técnicas de produção do koji, relacionados principalmente à aplicação em saques, no entanto ainda há pouco material na língua inglesa. Ainda assim, se comparado ao que se sabe sobre a levedura

*Saccharomyces cerevisiae*, utilizada no processo de fermentação alcoólica e na panificação, o conhecimento sobre o koji é limitado, principalmente quanto a seu perfil metabólico (KITAMOTO, 2015).

## Produção de Koji

O processo de produção do koji, em geral, inicia-se com o polimento do grão em até 50% do seu tamanho, dependendo do processo no qual o koji será empregado ou do produto final desejado, retirando-se parte das camadas de pericarpo e aleurona. As camadas externas dos grãos contêm minerais, proteínas e lipídios que conferem aromas e sabor, alguns dos quais são indesejáveis a bebidas como o saquê. Além disso, a casca dos cereais impede que o fungo acesse seu interior amiláceo (JAPANSAKE, 2011). Segue-se com a lavagem dos grãos polidos para retirada do amido e resíduos do polimento (SHIH; UMANSKI, 2020).

Em seguida, a matéria prima é submetida à maceração em água para hidratação do amido, que deve estar totalmente hidratado para um cozimento uniforme. A água é então drenada para retirar o excesso de umidade, enquanto os grãos são mantidos em ambiente úmido, permitindo a homogeneização da umidade no interior dos grãos. Essa etapa assegura que os grãos fiquem soltos durante o cozimento e posterior fermentação (NAKAJI, 2020; KURAND, 2019).

A etapa de cozimento dos grãos é realizada utilizando-se vapor sob pressão. Seu objetivo, além de diminuir a carga microbiana nativa, é gelatinizar totalmente o amido, porém, sem resultar em grãos super cozidos. Os grãos devem ficar firmes por fora e úmidos por dentro, atraindo o fungo para seu interior. Ressalta-se a importância de que os grãos fiquem soltos, provendo uma grande área superficial para desenvolvimento do koji e garantindo a passagem de ar e troca térmica. Grãos grudados impedem a passagem de oxigênio, vital para o desenvolvimento do fungo, formam bolsas de calor e são atrativos para o crescimento de bactérias indesejadas como *Bacillus cereus* ou *B. subtilis*. Essa etapa é crucial, pois o fungo não consegue utilizar amido não-gelatinizado (NAKAJI, 2020; KURAND, 2018; SHIH, UMANSKY, 2020; REDZEPI; ZILBER, 2019).

Os grãos cozidos no vapor são resfriados e adicionados dos esporos do koji. A fermentação é realizada em um ambiente com alta umidade relativa (70-90%) e temperaturas de 30-40°C, a depender do produto final a ser obtido e das enzimas de interesse (YAMASHITA, 2021). Normalmente, o fungo produz uma quantidade maior de enzimas amilolíticas em temperaturas de 35-40°C, enquanto as proteolíticas têm sua produção potencializada em temperaturas mais próximas dos 30°C. Além disso, sua resposta metabólica varia com o substrato (REDZEPI; ZILBER, 2019; SHIH; UMANSKI, 2020)

## Malte e a malteação

No ocidente, a etapa de malteação de grãos para produção de bebidas alcoólicas como cerveja e whisky pode ser considerada equivalente à de produção do koji, uma vez que nessa etapa são sintetizadas ou ativadas as enzimas que estarão envolvidas no processo de quebra de amido e proteínas e consequente disponibilização de açúcares fermentescíveis e nutrientes para as leveduras, responsáveis pela fermentação alcoólica. O malte, assim como o koji, influencia diretamente o aroma e sabor da bebida final (ROSENTRATER & EVERS, 2018).

A malteação pode ser descrita como o processo no qual é feita a germinação dos grãos de cevada de forma controlada, a fim de obter-se um produto friável, com o amido disponível para a ação das enzimas e sabor e aroma característicos. Ela pode ser dividida em três etapas: maceração, germinação e secagem. Na maceração ocorre a hidratação do embrião e endosperma; enquanto na germinação são sintetizadas e ativadas enzimas para o desenvolvimento do embrião; por fim, na secagem, ocorre a interrupção da germinação por desidratação (MACLEOD & EVANS, 2016). Diversos perfis de secagem podem ser aplicados, além de processos de torra e de caramelização, visando a obtenção de sabor e aroma específicos.

Os maltes de cevada podem ser divididos entre *pale* (lager) e especiais. Os maltes *pale*, ou base, são secos a baixas temperaturas e mantêm um potencial enzimático suficiente para converter todo seu amido em açúcares fermentescíveis. Já os maltes especiais podem ser divididos em cinco subclasses (MALLETT, 2014): maltes coloridos, maltes caramelo, maltes torrados, cereais alternativos ou provenientes de processos alternativos. De acordo com Bamforth e Barclay (1993 apud KAUR *et al.*, 2015), maltes especiais são utilizados com o objetivo fornecer sabores e aromas adicionais à cerveja, ou características específicas, como corpo (*mouthfeel*), opacidade, ou maior retenção de espuma. São aplicados em muito menor quantidade que os maltes do tipo *pale* pois apresentam um potencial diastásico menor, ou mesmo nulo, dependendo do processo empregado, produzindo mostos com baixa quantidade de açúcares fermentescíveis e aminoácidos, essenciais para a futura fermentação (BRIGGS *et al.*, 1982; BRIGGS *et al.*, 2004).

A diversidade de maltes existente, e consequente diversidade de aromas e sabores, são resultantes de fatores como o cereal empregado, se o grão é maltado ou não (ex. cevada torrada), os parâmetros de malteação, a variedade do grão, a torra, entre outros. O grande destaque entre todos os fatores e etapas de produção pode ser atribuído ao processo térmico utilizado, uma vez que é o parâmetro que possui maior influência no sabor final de cervejas provenientes de maltes especiais (PARR, BOLAT & COOK, 2021).

Como alternativa à malteação convencional da cevada, em que é estimulada a produção de enzimas pelos grãos, é possível a utilização de enzimas exógenas ou a aplicação de microrganismos capazes de produzir tais enzimas, como ocorre na produção do saquê, na qual as enzimas são provenientes do koji. Zhuang *et al.* (2017) ressaltam que a utilização de cereais não maltados e aplicação de enzimas exógenas pode economizar de 0,5-1,0 euros por hectolitro de cerveja, dependendo das condições utilizadas, refletindo uma considerável economia de água e energia.

Okutso (2012), ao submeter uma solução concentrada de koji de arroz ao aquecimento, encontrou aumento no efeito antioxidante e alterações positivas no aroma e sabor, relacionados à Reação de Maillard, o que indica o potencial da aplicação de koji de cereais na produção maltes especiais com características únicas ao submetê-lo a diferentes perfis de secagem, torra ou caramelização.

## **Aplicação de koji na indústria cervejeira**

Nota-se um interesse cada vez maior do setor de cervejarias artesanais e de produtores caseiros pela introdução do koji no processo cervejeiro, principalmente no cenário norte-americano. Katayama (2018), em uma matéria para a revista Forbes, descreve uma crescente diversificação de cervejas no mercado americano e cita que uma das formas encontrada por algumas cervejarias artesanais para se destacar perante a acirrada concorrência está sendo inspirada no saquê.

Um exemplo é a colaboração entre a Brooklin Kura, a primeira produtora artesanal de saquê de Nova Iorque, e Five Boroughs Brewing Co., uma microcervejaria local, que resultou na produção de uma cerveja lager com 50% malte pilsen extra pale e 50% de koji de arroz, nomeada Sunset Kura (BREWBOUND, 2018), levando notas cítricas do koji e o frescor do arroz à cerveja.

Outro exemplo é a “Banryu Ichi”: junção de saquê tradicional com mosto de cerveja concentrado, adicionados de koji e leveduras de saquê para uma fermentação conjunta. Além da quebra do amido em açúcares, a quebra de proteínas em aminoácidos pelo fungo produz percursos do gosto umami. Essa união criou um produto com aromas complexos de arroz, maçã, cogumelo e erva-doce (KATAYAMA, 2018).

Este estilo de cerveja vem se tornando cada vez mais popular e consta guia de estilos da Brewer’s Association como Ginjo beer ou Sake-yeast beer. Ele é aplicado a cervejas produzidas com leveduras de saquê ou enzimas do saquê (koji), apresentando notas distintas dos subprodutos

da levedura ou do koji, os quais podem ser descritos por suaves notas frutadas e terrosas, com um caráter umami ou que remeta a cogumelos (B.A., 2020).

De acordo com Benchek (2021), o desafio das cervejarias americanas é conseguir expressar na cerveja os ésteres frutados do koji, uma vez que a maioria se perde durante a fervura, quando este é adicionado na mosturação. Por outro lado, esse processo resulta em um mosto com mais açúcares fermentescíveis, e em uma cerveja com corpo leve e final seco.

Já no meio acadêmico, a aplicação experimental de culturas de koji para produção de cerveja pode ser conferida no trabalho de Taubman e Willians (2019), no qual foram testados diversos tipos de koji como alternativa à malteação. De acordo com os autores, o fungo *Aspergillus oryzae* possui potencial para aplicação em cervejas uma vez que há poder enzimático suficiente para converter a cevada em um substrato fermentescível, porém a eficiência depende da cepa utilizada. A aplicação de esporos de “red rice koji”, em específico, acarretou em um mosto fermentado de gosto ácido e sabor acre, remetendo a ácido láctico, toranja, maçã verde e frutas tropicais, o que os autores associaram a um potencial para a produção de cervejas ácidas, como Gose e sours (TAUBMAN & WILLIAMS, 2019).

## Perspectivas futuras

Segundo Rahayu *et al.* (2017), o aroma de um produto, definido pelos seus compostos voláteis, é um dos fatores mais importantes na decisão do consumidor ao adquirir um produto, motivo pelo qual este é um tópico de pesquisa tão explorado e uma grande preocupação para os produtores de alimentos. A busca do consumidor por perfis de aroma e sabor diferenciados, aliados a produtos que remetem a saudabilidade e sustentabilidade, levou ao início de um intercâmbio entre diversos segmentos de bebidas alcoólicas visando a introdução de aromas e sabores exóticos em bebidas tradicionais, como é o caso das bebidas híbridas de cerveja e saquê.

A aplicação comercial de koji em cervejas tem um grande potencial, principalmente se diversas matérias-primas e tipos de koji forem explorados, além dos diversos perfis de secagem, torra e caramelização, criando aromas e sabores complexos e únicos. Além disso, a possibilidade de produzir koji em maltarias tradicionais com apenas pequenas mudanças têm potencial para atrair esse segmento da indústria cervejeira. Atualmente, já é possível encontrar cervejas produzidas com substituição parcial do malte por koji, ou cervejarias que utilizam o mosto do saque em suas formulações.

O crescente interesse pelo “Fungo Nacional do Japão” tem atraído também a academia e já é possível encontrar pesquisas envolvendo a aplicação de koji em diversas matérias primas e com objetivos diversos. Sua aplicação na produção de cervejas começa a ser estudada, com pesquisas como a de Taubman e Willians (2019) que apresentaram ao mundo ocidental a diversidade de tipos de koji e de aromas e sabores a serem explorados, além da potencial diminuição do uso de recursos hídricos em comparação com a produção de malte tradicional.

Assim, acreditamos que a exploração do koji pela indústria cervejeira e pela academia está apenas começando, as perspectivas para futuras aplicações destes fungos são amplas e trarão grandes benefícios ao consumidor.

## BIBLIOGRAFIA

BENCHEK, Brian. Koji Beer Brewing Injenuity. In: SHIH, Rich; UMANSKY, Jeremy. **Koji Alchemy**: rediscovering the magic of mold-based fermentation. White River Junction, Vermont: Chelsea Green Publishing, 2020

B.A. BREWERS ASSOCIATION. 2021 Brewers Association Beer Style Guidelines. Disponível em <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/>. Acesso em ago. 2021

BREWING SOCIETY OF JAPAN. We, the Scientific Conference of Brewing Society Japan Authorize “Koji Fungi (Koji-kin)” as the National Fungi. 2013. Disponível em: <<https://www.jozo.or.jp/gakkai/wp-content/uploads/sites/4/2020/02/koujikinnituite2.pdf>>. Acessado em ago. 2021

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing Science and Practice**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004.

- BRIGGS, D. E. et al. **Malting and brewing science**: hopped wort and beer. Springer Science & Business Media, 1982.
- BREWBOUND. Five Boroughs Brewing Collaborates with Brooklyn Kura on Koji Rice Lager. 2018. Disponível em: <<https://www.brewbound.com/news/five-boroughs-brewing-collaborates-brooklyn-kura-koji-rice-lager/>>. Acesso em: 21 jul. 2021.
- JAPAN SAKE and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing. A Comprehensive Guide to Japanese Sake. Tokyo: Japan Sake and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing; 2011.
- KATAYAMA, Akiko. American craft beer is being inspired by Japanese sake. Forbes. 30 out. 2018. Disponível em: <<https://www.forbes.com/sites/akikokatayama/2018/10/30/american-craft-beer-is-being-inspired-by-japanese-sake/?sh=128954ba54b6>>. Acesso em: 25 jul. 2021.
- KAUR, Mandeep et al. The fungal community structure of barley malts from diverse geographical regions correlates with malt quality parameters. *International journal of food microbiology*, v. 215, p. 71-78, 2015.
- KURAND, sake market. Close-Up of Sake Production: Rice Soaking. 27-11-2018. Disponível em: <<https://sakemarket.kurand.jp/en/19532/>>. Acesso em: ago. 2021
- KITAMOTO, Katsuhiko. Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 6, p. 863-869, 2015.
- MACLEOD, L., EVANS, E. Barley: Malting. **Encyclopedia of Food Grains**, 2ª ed. 3, p. 423-433, 2016.
- MALLETT, John. **Malt: a practical guide from field to brewhouse**. Brewers Publications, 2014.
- NAKAJI. **Koji for Life**. Japão: Nohbunkyo Publishing, 2020. 63 p.
- OKUTSU, Kayu et al. Development of a heat-processing method for koji to enhance its antioxidant activity. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 349-354, 2012.
- PARK, Hee-Soo et al. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. In: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, p. 161-202, 2017.
- PARR, Hebe; BOLAT, Irina; COOK, David. Modelling flavour formation in roasted malt substrates under controlled conditions of time and temperature. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127641, 2021.
- PUNIA, Sneha et al. *Aspergillus oryzae* fermented rice bran: A byproduct with enhanced bioactive compounds and antioxidant potential. *Foods*, v. 10, n. 1, p. 70, 2021.
- RAHAYU, Y. Y. S. et al. Key volatile compounds in red koji-shochu, a *Monascus*-fermented product, and their formation steps during fermentation. **Food chemistry**, v. 224, p. 398-406, 2017.
- REDZEPI, René; ZILBER, David. **The Noma Guide to Fermentation: Foundations of Flavor**. New York: Artisan, 2019
- ROSENTRATER, K. A.; EVERS, A. D. Malting, brewing, fermentation, and distilling. **Kent's technology of cereals**, p. 729-784, 2018
- SHIH, Rich; UMANSKY, Jeremy. **Koji Alchemy: rediscovering the magic of mold-based fermentation**. White River Junction, Vermont: Chelsea Green Publishing, 2020
- SHIMODA, M. et al. Characteristics of water uptake of Australian polished barley in shochu-making. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, n. 1, p. 33-35, 1998.
- TAMANG, J. P.; KAILASAPATHY, K. (Ed.). **Fermented foods and beverages of the world**. CRC press, 2010.
- TAUBMAN, Brett; WILLIAMS, Tom. Bypassing the malting process with koji. In: 2019 Master Brewers Conference. Calgary, Canada. MBAA, 2019.
- YANG, Mei et al. Effects of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus oryzae* on prebiotic potentials of rice bran pretreated with superheated steam in an in vitro fermentation system. *LWT*, v. 139, p. 110482, 2021.
- YAMASHITA, Hideyuki. Koji Starter and Koji World in Japan. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 569, 2021.
- YOSHIZAWA, K. Sake: production and flavor. **Food reviews international**, v. 15, n. 1, p. 83-107, 1999.
- YOSHIZAKI, Yumiko et al. Rice koji reduced body weight gain, fat accumulation, and blood glucose level in high-fat diet-induced obese mice. *PeerJ*, v. 2, p. e540, 2014.
- ZHANG, Kaizheng; WU, Wenchi; YAN, Qin. Research advances on sake rice, koji, and sake yeast: A review. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n. 7, p. 2995-3003, 2020.
- ZHUANG, Shiwen et al. Brewing with 100% unmalted grains: barley, wheat, oat and rye. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 3, p. 447-454, 2017.
- ZHU, Y.; TRAMPER, J. Koji—where East meets West in fermentation. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1448-1457, 2013.