

# OBTENÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS PROVENIENTES DO *Koji* (*Aspergillus oryzae*) E SUA RELEVÂNCIA NA CULTURA ORIENTAL

**FERREIRA; João Paulo Morais Hilário; SAVIAN, Mariana Tonelotto**

jpmhf2@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

**Resumo:** O *Koji* é o nome popular do *Aspergillus oryzae*, um micro-organismo ascomiceto filamentosos, assexuado, bastante conhecido e utilizado por diversas culturas asiáticas. Usado tradicionalmente na indústria de alimentos, seu destaque ocorre na produção de: *shōyu* (produto obtido pela fermentação da soja e de cereais); *sake* (produto obtido pela fermentação alcoólica do arroz); *miso* (produto obtido da fermentação da pasta de soja); e na produção de vinagres. O *Aspergillus oryzae* por muito tempo foi cultivado sem o conhecimento de sua existência, utilizando-se de um tipo de fermentação desenvolvida na China há aproximadamente 3000 anos, por um cultivo em estado semi-sólido. Na indústria cosmética e farmacêutica o *Aspergillus oryzae* aparece como referência para o tratamento de doenças de pele a partir de seu metabólito, o ácido *kójico*. A segunda-guerra mundial impôs necessidades em diversas áreas industriais na obtenção de diversos produtos, com destaque para os ácidos orgânicos, sendo o *Aspergillus oryzae* capaz de ser utilizado para este propósito. Na produção de biocombustíveis, o *Koji* pode utilizar tanto uma fonte lignocelulósica ou de açúcares livres como fonte de carbono, aumentando o rendimento de etanol por área plantada de matéria-prima. Podemos ainda citar a utilização do *Aspergillus oryzae*, em diferentes bioprocessos como: Produção de xaropes; estudos de endonucleases; produções de ribonucleases; na expressão de peroxidases a partir de transgenia; lipases estáveis sobre aquecimento e produção de enzimas em fase semi-sólidas, entre outros. Neste trabalho vamos apresentar o emprego do *Koji* em diversos setores biotecnológicos e sua importância para o homem há mais de 2000 anos.

**Palavras Chave:** *Aspergillus oryzae*. *Koji*. Biotecnologia. Alimentos Fermentados, Bebidas Fermentadas, Ácido *Kójico*, Ácidos Orgânicos, Biocombustíveis, Processos Fermentativos.

**Abstract:** *Koji* is the popular name for *Aspergillus oryzae*, an asexual filamentous ascomycete microorganism, a fungi used by several Asian cultures. Traditionally used in the food industry, the *Koji* is responsible for production of: *shōyu* (product obtained by fermentation of soy and cereals); *sake* (product obtained by the alcoholic fermentation of rice); *miso* (product obtained by fermentation of soybean paste); and in the production of vinegars. *Aspergillus oryzae* has long been cultivated without knowledge of its existence, using a type of fermentation developed in China approximately 3000 years ago by a semi-solid state cultivation. In the cosmetic and pharmaceutical industry, *Aspergillus oryzae* appears as reference for treatment of skin diseases through the production of its metabolic: *Kojic acid*. World War II imposed needs to obtain a various products, especially organic acids, in various several industrial areas, where *Aspergillus oryzae* is able to be used for this purpose.. In the production of biofuels, *Koji* can use either a lignocellulosic or free sugar source as a carbon source, increasing the ethanol yield per planted area of raw material. We can

also mention the use of *Aspergillus oryzae*, in different bioprocesses such as Syrup production; endonuclease studies; ribonuclease productions; in the expression of peroxidase from transgenic; stable lipases on heating and production of enzymes in semi-solid phase, etc. In this paper, we will present Koji's employment in diverse biotechnological sectors and its importance to man for over 2000 years.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*. Koji. Biotechnology. Kojic acid. Fermented Foods. Fermented Beverages. Organic Acids. Biofuels. Fermentation Processes.

## INTRODUÇÃO

Em 1906, o autor realista *Natsume Soseki*, publica um dos seus mais famosos romances, a obra realista “Eu sou um gato”. Este romance apresenta o funcionamento e costumes da sociedade japonesa do final do século XIX e início do século XX, com forte influência ocidental em diversas esferas, tais como: a política, ciência, artes, entre outros. Nesse livro encontramos uma referência sobre a indigestão causada pela ingestão de alimentos amiláceos e um medicamento recomendado para auxiliar na digestão, a *Taka-diastase* (EU SOU UM GATO, 2002). Desenvolvida em 1894 pelo Dr. Jōkichi Takamine, a *Taka-diastase* tem como precursor um micro-organismo muito utilizado em algumas culturas asiáticas, o *Aspergillus oryzae* (JPO, 2002).

Esse fungo ascomiceto filamentosos, assexuado possui oito cromossomos e uma sequência genômica de 37,0196 Mb (ZHAO *et al*, 2014), apresenta uma extrema importância no desenvolvimento de processos fermentativos de diferentes nações, como Japão, Coreia e China. O *A. oryzae* tem uma longa história, atrelada com os costumes tradicionais da cultura nipônica. Utilizado por séculos na produção de *seishu*: bebida alcoólica fermentada de arroz ou popularmente conhecido no resto do mundo apenas por *sake*; *miso*: pasta de soja fermentada; *shōyu*: fermentado de salsa de soja e cereais; *mirin*: fermentado alcoólico de arroz destinado a culinária; na produção de vinagres (HINOUE, 2012), além de muitos outros alimentos fermentados.

O processo de fermentação utilizando o *A. oryzae* foi importado para o Japão durante o período *Yayoi* (1000 a.C – 300 d.C). Trata-se de um cultivo em estado semi-sólido, originado na China há aproximadamente 3000 anos. Esse tipo de cultura mantinha vivos os conídiosporos do *A. oryzae*, além de evitar contaminações microbiológicas externas. Esses conídiosporos eram preservados em sacos de papel, que eram empilhados e armazenados com cinzas brancas obtidas da queima com pouca aeração de folhas de madeira. Esse material biológico preparado era destinado ao preparo de bebidas alcoólicas (conhecido pelo termo *moyashi*), como o *sake*. As cinzas forneciam um pH alcalino que evitava a contaminação externa, além de fornecer minerais importantes para a manutenção celular do *Koji* (MACHIDA, *et al.*, 2008).

A segunda-guerra mundial impôs necessidades em diversas áreas industriais, como a alta demanda para antibióticos e outros insumos para a indústria química. Até então a obtenção de insumos se davam por rotas de síntese química ou por extração de compostos presentes nos tecidos vegetais ou animais. Com o aprimoramento das técnicas de fermentação, a indústria inicialmente desenvolveu a produção da penicilina e posteriormente houve outras possibilidades de obtenção de diversos produtos biotecnológicos (CARVALHO *et al*, 2005) através do uso de diferentes micro-organismos. O *Koji* pode ser inserido neste contexto, pois é extremamente utilizado na indústria contemporânea.

Os fungos secretam, no meio, enzimas que convertem moléculas orgânicas complexas em moléculas mais simples, mas alguns gêneros de *Aspergillus* podem produzir substâncias tóxicas aos seres humanos. Como o *A. falvus* que produz uma aflatoxina tóxica, mas uma grande vantagem do *A. oryzae* é ausência de patogenicidade ao homem (ELBASHITI *et al.*, 2010). Essa condição é primordial para um micro-organismo ser selecionado para uso humano. Além disso, por ter um metabolismo tão complexo e uma grande adaptabilidade, seu uso continua presente em diversas áreas industriais.

Neste artigo, citaremos o emprego do *A. oryzae* na obtenção de produtos biotecnológicos em diferentes setores como: produção de insumos para indústria cosmética e farmacêutica; a produção de alimentos e bebidas; o desenvolvimento tecnológico de biocombustíveis e outras pesquisas com o uso do *A. oryzae*.

## **O ASPERGILLUS ORYZAE**

Existem atualmente 185 espécies do gênero *Aspergillus* (GOFFEAU, 2005), dentre elas o *A. oryzae*. O *A. oryzae* é um fungo nativo de regiões húmidas do leste asiático. Em 2005, pesquisadores do Japão, EUA e da Europa sequenciaram o genoma desse fungo que apresenta de 7 até 9 Mb de DNA a mais que o *A. fumigatus* e *A. nidulans* (MACHIDA, *et al.*, 2005). Algumas hipóteses evolutivas corroboram que ocorreu várias transferências verticais de alguns genes de *Aspergillus* para o *A. oryzae*. Esse ganho genético é responsável pela síntese e transporte de metabólitos secundários não relacionados a atividades de crescimento celular. Apesar do parentesco do *A. oryzae* com outros tipos de *Aspergillus*, e de apresentar genes para aflatoxina, estes genes não são expressos, como em comparação com *A. flavus*.

A sequência genômica do *A. oryzae* foi concluída utilizando-se a técnica de *shotgun* (WGS), revelando um genoma nuclear de 37,6 Mb, contendo 12,074 genes distribuídos em 8 cromossomos. Seu DNA mitocondrial revelou 29,202 pb de informação.

A domesticação do *A. oryzae* pelo homem durante séculos, gerou uma adaptação no acesso por fontes de nitrogênio externas a partir da degradação de proteínas, além da obtenção de energia atrelada a alta taxa no metabolismo de amilases. Os genes presentes no DNA relacionados a síntese álcool-desidrogenase, piruvato-carboxilase e para formação transportadora de açúcares, mostram a alta atividade de adaptação evolutiva. A presença de genes específicos para secreção de enzimas hidrolíticas no *A. oryzae*, indicam um vantajoso uso deste micro-organismo em processos de fermentação em estado sólido.

Morfologicamente, o *A. oryzae*, cresce como hifas hialinas e septadas (MICROBEWIKI, 2020) com formação de conidiósporos. Sua via metabólica de ácidos carboxílicos, que serão convertidos em ácidos graxos por ação enzimática de um conjunto de ácido-graxo sintase. Essas cadeias compõem a formação da membrana celular e de vesículas para armazenamento de enzimas. Em contato com uma fonte de energia, o *A. oryzae* inicia seu metabolismo primário, com secreção de enzimas proteolíticas, além da secreção de amilases, a fim de obter açúcares e aminoácidos livres. Seu metabolismo secundário utiliza metabólitos para supressão de rotas bioquímicas. Esses metabólitos chamados de policetídeos, são utilizados em processos adaptativos ambientais, garantindo uma melhor eficiência metabólica dependendo do meio de crescimento, obtendo uma maior faixa de condições ambientais adaptivas (BROWN, *et al.*, 1996).

A seguir vamos destacar algumas de suas utilizações em processos fermentativos.

## UTILIZAÇÃO DO KOJI NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E BEBIDAS FERMENTADAS.

A produção dos alimentos fermentados a partir do *Koji* (FUKUSHIMA, STEINKRAUS, 2004) (SHURTLEFF, AOYAGI, 2014), são citados desde 1100 a.C na China. Para iniciar a fermentação, o *Koji* obtido inicialmente de cereais era misturado a alguma proteína animal com adição de sal e licor, e mantido em recipiente fechado por 100 dias. Com a substituição da proteína animal por grãos de soja, era possível produzir o *Chiang* de soja, que ao ser incorporado à cultura japonesa, passou a se chamar *miso*.

A técnica de produção do *miso* foi o ponto de partida para o desenvolvimento de outros produtos fermentados com base no *Koji*, como o *shōyu*, *sake*, *yonezu* (vinagre de arroz), entre outros. Os processos de fermentação citados e os sabores e aromas característicos de cada produto fermentado são possíveis graças aos processos enzimáticos realizados pelo *Koji*, onde convertem carboidratos e proteínas de origem vegetal ou animal em açúcares, peptídeos e aminoácidos. Muitas vezes, essas substâncias formadas servem de nutrientes para bactérias lácticas (p.ex. *T. halophilus*) e leveduras (p.ex. *Z. rouxii*), capazes de realizar uma segunda fermentação, fornecendo as características organolépticas de cada fermentado.

O processo manufaturado do *shōyu* (LUH, 1995), consiste no cozimento sob pressão dos grãos de soja hidratados. O trigo ou outros cereais são torrados e adicionados aos grãos soja cozidos e inoculados com uma cepa de *A. oryzae*.

Após uma primeira fermentação pelo *Koji*, seguimos para uma segunda fermentação, utilizando bactérias lácticas halofílicas e leveduras tolerantes a altas concentrações de sal (aproximadamente 19g/100ml). O mosto de fermentação é transferido para recipientes contendo soluções salinas de até 25% (m/v) que é mantido por até 8 meses sob condições de temperatura controlada e aeração ocasional. Durante o processo são formados açúcares simples, ácido láctico, álcoois e dióxido de carbono.

Alterações no processo, como: alteração do tempo de fermentação; concentração salina; cepas de micro-organismos; clarificação; filtração; aquecimento; proporção de soja e outros cereais, fornecem diferentes tipos de *shōyu* como: *saishikomi-shōyu* (menor concentração de sal), *usukuchi-shōyu* (menor tempo de fermentação), *koikuchi-shōyu* (diferença nas cepas), e cada tipo de *shōyu* vendido por mais dos 900 produtores no Japão ou no resto do mundo (FUKUSHIMA, STEINKRAUS, 2004) (SOYINFOCENTER, 2004).

O *A. oryzae* também produz o *nihon-shu* ou *sei-shu* (*sake*), bebidas com teor alcoólico entre 13%-17% obtidas a partir da fermentação do arroz. O *sake* é composto por 4 ingredientes principais, sendo eles: o arroz, o *kome-Koji* (*Koji* do arroz, *A. oryzae*), água e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Para a produção do *sake*, o arroz cozido no vapor entra em contato com esporos de *A. oryzae*, que formará filamentos sobre a superfície dos grãos de arroz, obtendo assim o desenvolvimento do *Koji* (JAPAN SAKE AND SHOCHU MAKERS ASSOCIATION, 2011).

Cada fábrica de *sake* desenvolve seu próprio *Koji*, processo chave no desenvolvimento da receita pelo *toji* (mestre de produção). De modo geral, os estilos de *Koji* desenvolvidos, podem ser divididos como *sohaze* e *tsukihaze*.

No *sohaze*, os fungos *Koji* cobrem todo o grão de arroz, com hifas desenvolvidas até o núcleo do grão de arroz, dissolvendo o arroz e resultando em uma intensa fermentação a partir de alta atividade enzimática. No estilo *tsukihaze*, o *Koji* cresce desenvolvendo manchas sobre a superfície do grão de arroz, com locais com ou sem hifas internas ao grão, gerando uma menor atividade enzimática e consequentemente uma menor concentração de vitaminas e ácidos graxos em relação a fermentação no

processo *sohaze*. Esse estilo de *sake* exige um controle maior na quantidade de esporos de *Koji* utilizados por parte do *toji*.

A fermentação a partir da levedura irá realizar a fermentação alcoólica, através dos açúcares obtidos do processo de sacarificação pelo *A. oryzae*, a partir da  $\alpha$ -amilase. Além disso, a atividade proteolítica ácida principal pela ação da carboxilpeptidase hidrolisa proteínas, formando peptídeos e aminoácidos, bem como na catabolização de vitaminas e outros nutrientes que conferem substratos para a segunda fermentação pelas leveduras e/ou bactérias lácticas. O conjunto de fermentações produzem compostos orgânicos, como por exemplo: ésteres, lipídeos, amino-ácidos, entre outros, que irão conferir as características organolépticas do *sake*.

Melhoramento genético de *A. oryzae* resultaram na obtenção mais rápida do produto final. Essas linhagens possuem como vantagens biotecnológicas: a produção de altas concentrações de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase, que diminuem o tempo de fermentação; produção de baixas concentrações de tirosinase, que previnem o escurecimento enzimático; formação de *deferriferrichrysin*, um sideróforo com ação antioxidante; entre outros.

Após o devido tempo de fermentação inicial pelo *Koji*, em aproximadamente 40 h, temos a adição do *shubo* (junção do arroz previamente fermentado e amassado com adição de levedura). A fermentação permanecerá sob ação de aproximadamente 50 tipos de enzimas ativas por aproximadamente 5 semanas dependendo do tipo de receita de *sake*.

Ao final do processo, o mosto de fermentação passa por uma filtração sobre pressão em filtros de pano, que separaram o *sake* do *sakekasu* (massa de arroz). Por ser nutritivo, o *sakekasu* pode servir de como meio nutriente para produção *shochu* (liquor japonês destilado) ou na produção de *pickles*. Filtrações subsequentes e outros processos, podem ser necessários para clarificação do *sake*. A pasteurização é a etapa final utilizada para aumentar a vida útil da bebida. Cada variedade de *sake*, com seus aromas e sabor característicos se devem ao fato das alterações no processo citado acima, como tipo de filtração, polimento do arroz, tempo de fermentação, desenvolvimento do *Koji*, entre outros. A ação concomitante dos substratos do arroz e das reações enzimáticas concomitantes do *Koji* com leveduras ou até bactérias, fornecem aproximadamente 300 componentes diferentes como: isoamilacetato (aroma frutado), acetato de etila (aroma floral), tirosol (adstringência e amargor), sotolon (aroma de mel), etilsuccinato (aroma de baunilha), entre outros. Dentre os tipos de *sake* podemos citar o *Junmai*, que apresenta sabor característico derivado do arroz e o aroma *fungi* característico derivado do *Koji*. (YOSHIZAWA, 1999)

## UTILIZAÇÃO DO KOJI NA MEDICINA E NA OBTENÇÃO FÁRMACOS.

Um dos medicamentos mais populares e históricos obtido diretamente do *A. oryzae* é a *Taka-diaestase*. As Diatases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise do amido (p.ex  $\alpha$ -amilase), melhorando a digestão de alimentos amiláceos. A *Taka-diaestase* também apresenta ação ribonucleolítica, incluindo a ação de pelo menos três ribonucleases, como por exemplo a ação da RNase 1 pancreática. Foi demonstrado que estas RNases podem participar da síntese 2',3' de nucleosídeos cíclicos, clivagem seletiva de ligações 2',3' fosfato cíclicas, síntese de oligonucleotídeos, análise da distribuição de nucleotídeos no RNA, determinação de sequências terminais de RNA e diversos estudos citológicos possíveis (EGAMI, *et al.*, 1964).

Os ácidos orgânicos são uma classe de moléculas que estão presentes em diversos setores industriais. Podem atuar diretamente como medicamentos ou mesmo como precursores para desenvolvimentos de novas drogas. Podemos obtê-los por extração de plantas ou animais ou por síntese química, que muitas vezes não fornecem bons rendimentos, uma vez que apresenta apelo mercadológico.

Uma alternativa para obtenção de ácidos orgânicos é por biossíntese a partir de uma fonte de carbono e um micro-organismo específico. Podemos citar o ácido málico, esse ácido é empregado na indústria alimentícia como acidulante, aromatizante e estabilizante. O *A. oryzae*, pode ser empregado na produção do ácido málico, por diferentes fontes de carbono, sendo a glicose a fonte com maior rendimento, além da possibilidade de sua obtenção utilizando lignoceluloses como fonte de carbono, que não competem diretamente com matérias primas como fonte de alimento humano (DÖRSAM, 2017) e são subprodutos industriais descartáveis.

Uma série de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pode ser produzido utilizando o *A. oryzae*, porém o *A. niger*, ainda fornece melhores rendimentos. Isso não impede o uso do *A. oryzae* na produção de ácido cítrico, uma vez que estudos de otimização e de imobilização celular estão sendo efetuados e apresentam bons resultados (HIREMATH, DEEPIKA, 2015), sendo uma proposta para suprir um mercado com consumo mundial de 1,4 milhões de toneladas por ano e crescimento anual de 4% (SOCCOL *et al.*, 2008).

Como um expoente dos ácidos orgânicos utilizados na preparação de cosméticos está o ácido kójico (AK; 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona), podendo ser obtido a partir de diferentes tipos de *Aspergillus*, como por exemplo o *A. oryzae*. Comercializado inicialmente em 1955, pela Pfizer, Inc. nos EUA, este ácido ganhou notoriedade nos últimos anos pelo uso em cosméticos para clareamento de pele, iluminador de pele, agente despigmentante e proteção solar. No tratamento de pele, o AK suprime a hiperpigmentação da pele humana, diminuindo a produção de melanina pela inibição enzimática na formação da tirosinase (SAGHAIE, *et al.*, 2013). O AK, também atua como aditivo na prevenção do escurecimento de alimentos, pela inibição da polifenol oxidase (BURDOCK, *et al.*, 2000). A aplicação do AK e seus derivados se estendem para campos da agricultura (pesticidas), indústria de alimentos (preservante) e indústria química (síntese de complexos). Na medicina, pode ser utilizado, por exemplo, no uso: para tratamento câncer de pele; como antifúngico, antibiótico e anti-inflamatório; ativador de macrófagos; agente antidiabético; tratamento de esquizofrenia, entre outros (SAEEDI, *et al.*, 2019).

Vários tipos de fontes de carbono podem ser utilizadas ou reaproveitadas para esse propósito, como glicose, xilose, maltose, alcoóis, resíduos indústrias (açúcar e álcool p. ex), entre outros (SAUER, *et al.*, 2013) (DÖRSAM, *et al.*, 2017). Processos de seleção de cepas de *A. oryzae* e emprego de técnica de mutação do DNA são capazes de gerar cepas de *A. oryzae* com maiores rendimentos na produção de AK. O uso de radiação gama (AMMAR, *et al.*, 2017) ou mesmo por uso do agente mutagênico N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina (NTG) por exemplo (FUTAMURA, *et al.*, 2000) foi capaz de desenvolver gerações de *A. oryzae* (tipo HAK2 p.ex) melhoradas para produção de ácido kójico. Para testes pilotos em repetidas bateladas com cepas melhoradas, foi possível obter até 5,3 g/l ao dia de AK frente aos 5 g/l ao dia pelo uso de fermentação convencional (COELHO, 2011).

## **UTILIZAÇÃO DO KOJI NA OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.**

Atualmente a necessidade de energias limpas e renováveis são de extrema importância. Em 2010, foram consumidos 12,7 bilhões de toneladas de óleo de petróleo

no mundo, frente aos 10% no uso de biocombustíveis e resíduos para geração de energia renovável. O etanol se enquadra como um biocombustível, uma opção renovável frente aos combustíveis fósseis (LENNARTSSON, *et al.*, 2014).

Apesar do processo biotecnológico de obtenção do etanol ser bem consolidado a partir de milho ou mesmo da cana-de-açúcar, alternativas podem ser propostas, visando melhores rendimentos ou fontes alternativas de carbono como substrato.

Uma dessas propostas está baseada no conceito do etanol de segunda geração, que visa obter o etanol a partir de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos. O ponto chave para o sucesso desta técnica está na etapa de hidrólise, podendo ocorrer de forma enzimática. Neste processo temos a conversão de carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica em açúcares simples que serão utilizados posteriormente para fermentação alcoólica pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Nessa conversão são utilizadas um conjunto de enzimas, dentre elas: celulases, hemicelulases e enzimas acessórias (PIROTA, 2016).

As espécies de fungos mais estudadas para a produção das enzimas que degradam a lignocelulose são do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (DRABER, 2013).

As carboidrases do *A. oryzae* podem ser uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração. Além disso, cepas P6B2 de *A. oryzae* nativas da região amazônica se destacam no *screening* de degradação de biomassa vegetal (TONELOTTO, 2012). O *A. oryzae* é capaz de utilizar tanto uma fonte lignocelulósica ou de açúcares livres como fonte de carbono, aumentando o rendimento de etanol por área plantada de matéria-prima (DÖRSAM, 2017).

A biomassa utilizada na obtenção de etanol, em alguns casos, é rica em hemiceluloses, que por sua vez possuem altas concentrações de pentoses, como por exemplo: xiloses, arabinanos e polímeros de glicose. Esses substratos podem ser utilizados na geração de etanol, fornecendo um aumento de 22% por área plantada na obtenção de etanol. Palha de milho ou trigo, ou mesmo gramíneas podem apresentar até 20% de massa seca de xilanos, mais do que a metade em relação a quantidade de glicose livre para fermentação por leveduras (PEREIRA, 2013). Essas pentoses são liberadas em grandes quantidades durante a hidrólise de lignoceluloses. A fermentação de hexoses ocorre de forma natural para etanol de primeira geração, enquanto o uso de pentoses para esse propósito é um desafio, o que não ocorre para hexoses. O *A. oryzae*, assim como outros fungos filamentosos podem ser utilizados para este propósito, com o auxílio de pré-tratamento de cana-de-açúcar, como o pré-tratamento por explosão a vapor (BEX), por exemplo.

Pode-se estimar a obtenção do etanol de segunda geração a partir de açúcares hidrolisados, como hexoses, de 1.460 L/ha. Já para pentoses, 1.372 L/ha, somando juntos 2.832 L/ha. (PEREIRA, 2013)

O uso concomitante de *N. intermedia* e *A. oryzae*, podem ser utilizados na produção de etanol em duas etapas, onde o *A. oryzae* poderá utilizar os resíduos da primeira etapa de fermentação alcoólica para fornecer maior aproveitamento da matéria orgânica, dando continuidade a fermentação alcoólica, aumentando a produção de etanol em 0,7 g/L. Além disso, pela capacidade proteolítica do *A. oryzae*, a biomassa gerada como resíduo nos processos de obtenção de etanol de segunda geração será rica em proteínas, que podem ser utilizadas como fonte alimento animal (BÁTORI, *et al.*, 2015). Essa degradação proteolítica pode facilitar o acesso ao etanol nos processos de destilação e fornecer melhorias no custo do processo de evaporação, bem como facilitação de secagem dos resíduos (biomassa) industriais e conseqüentemente uma redução de resíduos do processo.

Como outra proposta, podemos utilizar o *A. oryzae* juntamente com a *S. cerevisiae* na obtenção de etanol a partir de quaisquer resíduos orgânicos, como os de comida (lixo orgânico), indústria de alimentos ou mesmo de indústria de açúcar e álcool. O *A. oryzae* pode realizar tanto a digestão de substratos solúveis, quanto sólidos, revelando respectivamente concentrações de até 2% (7 dias) e 14% (14 dias) de etanol por substratos. Essa proposta pode se estender para o uso de obtenção de etanol a partir do lixo orgânico ou esterco auxiliando nos problemas relacionados a produção de resíduos residenciais e industriais. (JAHNKE, 2016)

Adicionalmente, a biomassa fúngica também pode gerar importantes lipídios, podendo ser extraídos da biomassa e vendidos como aditivos para diversos setores industriais, como por exemplo, como aditivos em suplementos e dietas.

Na produção de biodiesel, cepas de *A. oryzae* recombinates podem ser capazes de expressar a enzima CALB (lipase de *Candida antarctica* do tipo B), uma lipase presente em micro-organismos do tipo *Candida*, fornecendo biodiesel a partir esterificação de óleos vegetais.(ADACHI, *et al.*, 2012).

## **OUTRAS PROPOSTAS NA UTILIZAÇÃO DO KOJI**

O *A. oryzae* pode ser empregado: na produção de xaropes de milho com maior concentração de maltose (mais doces), pela ação da  $\alpha$ -amilases (HELSTAD, 2019); na produção de  $\alpha$ -galactosidase a partir de cultivo em estado semi-sólido (KAPNOOR, MULIMANI, 2010); na produção de  $\beta$ -galactosidase, enzima responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose (SANTOS, 2006). na bioremediação de arsênio em solos (SINGH, *et al.*, 2015); na produção de invertase por cepas de *A. oryzae* mutantes com alta atividade enzimática. (MARESMAS, *et al.*, 2010); em estudos envolvendo endonucleases (WALDSTEIN, 1978); na produção de ribonucleases, como a RNase T2 (RUSSO, *et al.*, 2001); na expressão de peroxidase a partir de transgenia (YAVER, 2003); na geração de lipases estáveis sob aquecimento e produção de enzimas em fase semi-sólidas (MACHIDA, 2002); entre outras propostas.

## **CONCLUSÕES**

A necessidade por insumos biotecnológicos aumenta constantemente na medida que há um crescimento populacional mundial. A partir da variabilidade genética do *A. oryzae* podemos obter maior quantidade de produção de produtos fermentados a partir de diferentes alimentos que fornecerão produtos finais com os mais diversos aromas e sabores. Na conservação de alimentos, como proposta, podemos pensar no uso enzimas isoladas a partir do *A. oryzae* que podem aumentar o tempo de validade de produtos. Na medicina, o uso de enzimas ou substâncias isoladas do *A. oryzae*, podem fornecer tratamentos para diferentes doenças, como por exemplo distúrbios dermatológicos. O *A. oryzae* produz toxinas que afetam outros micro-organismos patogênicos, com isso diferentes tratamentos com anti-fúngicos ou antibióticos utilizando o *A. oryzae* podem ser pensados, atuando em conjunto em tratamentos estéticos com os benefícios do Ácido Kójico em produtos dermatológicos. Propostas no uso do *A. oryzae* para tratamento de resíduos orgânicos domésticos e restaurantes, de indústrias de alimentos ou de açúcar e álcool podem ser empregadas. Esses resíduos orgânicos podem ser utilizados para geração de etanol, diminuindo a geração de lixo e de espaço destinado para o descarte de resíduos.



O *A. oryzae* pode ser utilizado na geração de ácidos orgânicos. Desenvolvimentos de técnicas com este micro-organismo pode auxiliar no emprego de novas técnicas de obtenção a partir de diferentes fontes de carbono, como fontes sólidas. Bioremediação de solos pode ser pensada utilizando o *A. oryzae*, uma vez que este não é um patógeno ao homem, sem risco biológico no seu emprego. Diferentes estudos citológicos e genéticos podem ser pensados a partir de enzimas isoladas do *A. oryzae*, principalmente a partir de suas ribonucleases. Na síntese de novos compostos, enzimas isoladas, como lípases, podem ser utilizadas em diferentes propostas de rotas sintéticas em química orgânica, facilitando reações complexas.

Diversos outros produtos podem ser desenvolvidos com o *A. oryzae* com o avanço de técnicas na biotecnologia. Este fungo apresenta um extenso uso em diferentes áreas, algumas apresentadas nesse artigo. Isso não impede que novas propostas possam ser empregadas para o *A. oryzae*, revelando sua importância não só tecnológica, como também da história da humanidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, Daisuke. *et al.* Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**. p. 1-12, 2012.

AMMAR, Hala A. M. *et al.* Improved production of kojic acid by mutagenesis of *Aspergillus flavus* HAK1 and *Aspergillus oryzae* HAK2 and their potential antioxidant activity. **3 Biotech**. v.276, 2017.

BAJPAI, Pratima. *et al.* Enzymes Relevant to Kojic Acid Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of General Microbiology**. v. 127, p. 131-136, 1981.

BÁTORI, Veronika. *et al.* Ethanol and Protein from Ethanol Plant By-Products Using Edible Fungi *Neurospora intermedia* and *Aspergillus oryzae*. **Biomed Research International**. v. 2015, p. 1-10. 2015.

BROWN, D., *et al.* *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, n. 25. p. 14873-14877. 1996.

BURDOCK, George A. *et al.*, Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 33, p. 80-101, 2001

CARVALHO, Walter *et al.* Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, v. 18, p. 70-76, 2005.

COELHO, Renato Sano. Produção de ácido kójico: estudo e otimização de processo e utilização de matérias-primas de baixo custo. **Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos**. 2011.

DINO. Mercado de saquê cresce 35%. Em 2014 estima-se que o Brasil importará mais de 350 mil litros de saquê. [S.l.], 03/11/2014. Disponível em: <http://www.dino.com.br/releases/mercado-de-saque-cresce-35-em-2014-estima-se-que-o-brasil-importara-mais-de-350-mil-litros-de-saque-dino89046072131>. Acesso em 20/01/2019.

DÖRSAM, Stefan *et al.* Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 242, 2017.

DRABER, Katia Maria Mandu. Etanol de segunda geração já é realidade. **Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena**. 2013.

EGAMI, Fujio. Ribonucleases in Taka-Diastase: Properties, Chemical Nature, and Applications. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. v. 3, p. 59-101. 1964.

ELBASHITI, Tarek *et al.* Isolation and identification of *Aspergillus oryzae* and the production of soy sauce with new aroma. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 12, p. 1171-1175, 2010.

FUKUSHIMA, D. STEINKRAUS, Keith. In: **Industrialization of Indigenous Fermented Foods, Revised and Expanded: 136**. Edição 2. CRC Press. 2004.

FUTAMURA, Takafumi. *et al.* Improvement of production of Kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 91, p. 272-276, 2001.

G1. Consumo de saquê no país deve crescer 50%. [S.l.], 20/02/2007. Disponível em: [http://g1.globo.com/Noticias/Economia\\_Negocios/0,,AA1463163-9356,00-CONSUMO+DE+SAQUE+NO+PAIS+DEVE+CRESCER.html](http://g1.globo.com/Noticias/Economia_Negocios/0,,AA1463163-9356,00-CONSUMO+DE+SAQUE+NO+PAIS+DEVE+CRESCER.html). Acesso em 11/11/2019.

GOFFEAU, André. Multiple moulds. **Nature**, v.438, p. 1092-1093, 2005.

HELSTAD, Scott. Corn Sweeteners. **Corn: Chemistry and Technology**. p. 551-591, 2019.

HIDEO IN JAPAN BLOG. Koji - ingrediente vital do Japão. [S.l.], 26/02/2012. Disponível em: <https://hinouye.wordpress.com/2012/02/26/koji-ingrediente-vital-do-japao/>. Acesso em 11/11/2019.

HIREMATH, Deepika. Citric Acid production by *Aspergillus oryzae*. St. John's Research Institute Bangalore. 2016

JAHNKE, Justin P. *et al.* *Aspergillus oryzae*–*Saccharomyces cerevisiae* Consortium Allows Bio-Hybrid Fuel Cell to Run on Complex Carbohydrates. **Microorganisms**. v. 4, n. 10, p. 1-12, 2016.

JAPAN SAKE AND SHOCHU MAKERS ASSOCIATION. **A comprehensive guide to japanese sake**. Edição 1. Japan Sake and Sochu Makers Association. 2011.

JAPAN PATENT OFFICE. Jokichi Takamine Taka-Diastase, Adrenaline. [S.l.], 07/10/2002. Disponível em: [https://www.jpo.go.jp/e/introduction/rekishu/10hatsumeika/jokichi\\_takmine.html](https://www.jpo.go.jp/e/introduction/rekishu/10hatsumeika/jokichi_takmine.html). Acesso em 11/11/2019.

KAPNOOR, Shankar. MULIMANI, Veerappa Hanumanth. Production of  $\alpha$ -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk Galactooligosaccharide hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, n. 1, p. 211-218, 2010.

LUH, B. S. Industrial production of soy sauce. **Journal of industrial microbiology**, v.14, p. 467-471, 1995.

LENNARTSSON, Patrik R. *et al.* Integration of the first and second generation bioethanol processes and the important of by-products. **Bioresource Technology**. v. 165, p. 3-8, 2014.

MACHIDA, Masayuki *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157, 2005.

MACHIDA, Masayuki *et al.* Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. **Advances in applied microbiology**, v. 51, p. 81-106, 2002.

MACHIDA, Masayuki; YAMADA, Osamu; GOMI, Katsuya. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA research**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MARESMA, Beatriz Guilarte. *et al.* Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of  $\beta$ -fructofuranosidase. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n.1, p. 186-195. 2010.

MICROBEWIKI, *Aspergillus oryzae*. 2015. Disponível em: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus\\_oryzae](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_oryzae). Acesso em 20/01/2020.

NADA-KEN. Koji-kin. Disponível em: [http://www.nada-ken.com/main/en/index\\_k/104.html](http://www.nada-ken.com/main/en/index_k/104.html). Acesso em 11/11/2019.

PUBMED. Keywords: “*Aspergillus oryzae*” or “*A. oryzae*”. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%22Aspergillus+oryzae%22+or+%22A.+oryzae%22#>. Acesso em 22/01/2020.

PIROTA, Rosângela Donizete Perpetua Buzon. Simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol usando enzimas de meio fermentado integral de fungos filamentosos cultivados por fermentação em estado sólido. **Universidade Federal de São Carlos**. 2014.

PEREIRA, Douglas Gualberto Sales. Rendimentos da Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. **Universidade Federal de Viçosa**. 2013.

RESEARCHGATE. Citric Acid production by *Aspergillus oryzae*. St. John's Research Institute Bangalore, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/331166719\\_Citric\\_Acid\\_production\\_by\\_Aspergillus\\_oryzae](https://www.researchgate.net/publication/331166719_Citric_Acid_production_by_Aspergillus_oryzae). Acesso em 11/11/2019.

RUSSO, Aniello; ACHARYA, K. Ravi; SHAPIRO, Robert. Small molecule inhibitors of RNase A and related enzymes. **Methods in enzymology**, v. 341, p. 629-648, 2001.

SANTOS, Rosângela dos. Produção de galctooligossacarídeo por lactase fúngica. **Universidade Estadual de Campinas**. 2006.

SAGHAIE, L. *et al.* Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid, **Res. Pharm. Sci.** v.8. p. 233-242, 2013.

SAEEDI, Majid; ESLAMIFAR, Masoumeh; KHEZRI, Khadijeh. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 582-593, 2019.

SAHU, Yashwant. Organic Acids Market by Type (Acetic Acid, Citric Acid, Formic Acid, Lactic Acid, Itaconic Acid, Succinic Acid, Gluconic Acid, Ascorbic Acid, Fumaric Acid, and Propionic Acid), Source (Biomass, Molasses, Starch,

Chemical Synthesis, Agro-Industrial Residue), End-User (Food & Beverage, Animal Feed, Chemicals & Industrial, Pharmaceuticals, Personal Care, Agriculture) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2017-2023. **Allied Market Research**. 04/2017. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/organic-acids-market>. Acesso em 20/01/2020.

SAUER, D. *et al.* Microbial production of organic acids for use in food. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. p. 288-320, 2013.

SCOTT, Helstad. Chapter 20 - Corn Sweeteners. In: **Corn (Third Edition)**. United States: AACC International Press, 2019. p. 551-591.

SHURTLESS, William. AOYAGI, Akiko. In: **History of soybeans and soyfoods in Japan, and in japanese cookbooks and restaurants outside japan (701 CE to 2014)**. Edição 1. Soyinfo Center, 2014.

SINGH, M. *et al.* Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 119, p. 1278-1290, 2015.

SOCOL, Carlos R. *et al.* Production of organic acids by solid-state fermentation. In: **Current Developments in Solid-State Fermentation**. Springer, New York, NY, 2008. p. 205-229.

SOSEKI, N. Eu sou um gato. Edição 1. **Estação Liberdade**, 2008.

SOYINFO CENTER. History of Soy Sauce, Shoyu, and Tamari. California, 2004. Disponível em: <http://www.soyinfocenter.com>. Acesso em 11/11/2019.

TONELOTTO, Mariana. Produção de celulases, purificação e caracterização bioquímica-cinética da  $\beta$ -galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica. **Universidade Federal de São Carlos**, 2012.

WALDSTEIN, Evelyn. Enzymology of Nucleotide Excision Repair. In: **DNA Repair Mechanisms**. United States: Academic Press, 1978. p. 219-224.

YAVER, Debbie Sue; WEBER, Barbara; MURRELL, Jeff. Global expression profiling of the lignin degrading fungus *ceriporiopsis subvermispora* for the discovery of novel enzymes. Arora DK, Khachatourians G. **Applied Mycology and Biotechnology**, v. 3, p. 261-269, 2003.

YOSHIZAWA, Kiyoshi. Sake: production and flavor. **Food Reviews International**, v. 15, p. 83-107, 1999.

ZHAO, Guozhong *et al.* Draft genome sequence of *Aspergillus oryzae* 100-8, an increased acid protease production strain. **Genome Announc.**, v. 2, n. 3, p. e00548-14, 2014.