

PRODUÇÃO DE SAQUÊ ARTESANAL EM ESCALA DE LABORATÓRIO

Alessandro Carvalho Correa*

Eliane Melo Brolazo**

Resumo: Arroz polido, água, *koji* (grão de arroz colonizado pelo fungo filamentosos) e a levedura são as matérias primas para o saquê, a bebida tradicional do Japão. O arroz polido é submetido à sacarificação do amido por enzimas liberadas pelo fungo filamentosos *Aspergillus oryzae* e posterior fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. É um processo fermentativo realizado em duas diferentes etapas, uma delas utilizando a técnica de fermentação em Estado Sólido, englobando conhecimentos científicos de bioquímica das fermentações e que têm grande importância e aplicação na educação tecnológica. Este trabalho teve como objetivo produzir saquê de forma artesanal, em escala de laboratório e realizar análises químicas e sensoriais da bebida. As dosagens de etanol, sacarose e glicose foram realizadas em equipamento YSI modelo 2700 da marca Tecnal, que utiliza membrana seletiva. A análise sensorial realizada foi um teste afetivo de preferência, que utilizou como uma escala hedônica e um saquê comercial como amostra de referência. O teor de etanol do saquê produzido foi de 8,06%, com teores de açúcares (sacarose e glicose), inferiores a 30%, sendo classificado pela legislação brasileira como tipo Seco. A média das notas da análise sensorial do saquê produzido artesanalmente foi 6,25 em comparação a bebida de referência Thikará que foi 6,96. Apesar da variação de teor alcoólico do saquê produzido artesanalmente (8,06%) e o de referência (14%), ambos tiveram notas de aceitação similares.

Palavras-chave: saquê; fermentação alcoólica; fermentação em estado sólido; koji.

SAKE ALCOHOLIC BEVERAGE IN LABORATORIAL SCALE

Abstract: Polished rice, water, koji and yeast are the raw materials for sake, the traditional beverage of Japan. Rice is subjected to starch saccharification by enzymes released by *Aspergillus oryzae* and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. It is a fermentative process carried out in two different stages, one of them using the solid-state process, encompassing scientific knowledge of fermentation biochemistry and which are of great importance and application in technological education. This work aimed to produce sake by hand, on a laboratory scale and to carry out chemical and sensory analyzes of the drink. Ethanol, sucrose, and glucose dosages were performed in a YSI model 2700, which use a selective membrane. The sensory analysis performed was an ordination test, by the affective method, and a commercial sake as reference sample. The ethanol content of the sake produced was 8.06%, with sugar levels (sucrose and glucose), below 30%, being classified by Brazilian legislation as Dry. The average score of the sensory analysis of hand-made sake was 6.25 compared to the Thikará reference drink, which was 6.96. Despite the variation in the alcohol content of sake produced by hand (8.06%) and the reference (14%), the acceptance scores were similar.

Keywords: sake; alcoholic fermentation; solid state process; koji.

* Faculdade de Tecnologia de Campinas, alecarcorrea@yahoo.com.br

** Faculdade de Tecnologia de Campinas, eliane.brolazo@fatec.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

O saquê, a bebida obtida a partir da fermentação do arroz, tem papel importante na indústria japonesa e forte relação com a cultura local. A bebida tradicional do Japão é produzida a partir do arroz polido, submetido à sacarificação do amido pelo fungo filamentosos *Aspergillus flavus* var. *oryzae* e subsequente fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* (BOKULICH, 2014). O teor alcoólico varia de 13% a 17% de etanol e a bebida apresenta uma cor clara, sabor agradável e elegante (ZHANG, 2020).

A história do saquê remonta a 1000 anos na antiguidade, e as técnicas desenvolvidas pelos antigos produtores são anteriores ao conhecimento químico/científico ocidental (KANAUCHI, 2013). A qualidade do saquê é determinada por fatores como aroma, sabor e cor e assim como em outras bebidas fermentadas, o processo para obtenção das melhores bebidas é atribuído ao Toji, o profissional responsável por todas as etapas de fabricação, atuação equivalente ao mestre cervejeiro na produção da cerveja (LEE, 2012).

Entre as técnicas desenvolvidas e aprimoradas pelos antigos produtores orientais estão o tratamento térmico para estabilização da bebida, que já era realizado no século 16, antes de Louis Pasteur inventar pasteurização. O método é cuidadosamente descrito na antiga literatura japonesa. Além disso, a técnica de fermentação sob baixa temperatura em sistema aberto capaz de alcançar concentrações de mais de 18% de etanol sem destilação e com aromas frutados merece destaque (KANAUCHI, 2013).

Atualmente, mais de 1500 fabricas produzem saquê apenas no Japão, sendo algumas muito famosas. Os métodos de preparação do saquê mudaram drasticamente a partir do contato com a ciência europeia de fabricação de cerveja. O processo atual incorporou a tecnologia desenvolvida para produção de cerveja, como monitoramento e controle de temperatura, equipamentos automatizados para cozimento a vapor do arroz, filtragem do ar para evitar contaminação cruzada, equipamentos para sedimentação e filtragem do fermentado, mas manteve as práticas antigas e especiais que envolvem o uso do *koji*, os grãos de arroz colonizados pelo fungo *Aspergillus flavus* var. *oryzae* (KANAUCHI, 2013 e ZHANG, 2020).

Os estudos sobre bebidas fermentadas, em especial o saquê, produzido em duas diferentes etapas de fermentação, uma delas realizada com a técnica de

Fermentação em Estado Sólido, têm grande importância e aplicação na educação tecnológica. O processo de produção de saquê engloba conhecimentos científicos sobre a bioquímica das fermentações, além de fornecer subsídios para possível implantação como aula prática na disciplina de Bioquímica e Tecnologia das Fermentações do curso de Tecnologia em Processos Químicos oferecido pela FATEC.

REVISÃO DA LITERATURA

Arroz polido, água, *koji* (grão de arroz colonizado pelo fungo filamentosos) e a levedura são as matérias primas para o saquê do tipo *Junmai*, o mais puro, produzido sem aditivos. Após pré-tratamentos para hidratar e cozinhar o arroz polido, estes materiais são misturados em proporções adequadas em meio aquoso e mantidos a temperatura de 15°C e condições atmosféricas adequadas por duas semanas a um mês, para que a fermentação ocorra (ZHANG, 2020).

Água

O saquê é constituído por 80% de água, sendo sua qualidade imprescindível para a qualidade do produto. Além de ingrediente, a água é utilizada nos procedimentos de lavagem, hidratação e maceração do arroz, na lavagem de tanques e garrafas e vaporização/cozimento. Para um saquê de qualidade, a água utilizada deve ter pH neutro ou fracamente alcalino, conter apenas traços de amônia, nitrato, substâncias orgânicas e microrganismos e principalmente não conter íons de ferro, que são prejudiciais por provocar alteração de cor e deteriorar o produto. Geralmente a água a ser utilizada é submetida a tratamentos como aeração, filtração, adsorção com carvão ativo e floculação (KANAUCHI, 2013).

Arroz

Variedades de arroz japonesas, com grãos grandes, baixo teor de proteínas, alta taxa de absorção de água, alta digestibilidade enzimática e baixa taxa de fissuração durante o polimento são mais adequados para saquê, e sua qualidade é crucial para a qualidade da bebida (ZHANG, 2020).

Quanto aos Constituintes químicos, o arroz deve conter entre 70–75% de carboidratos, 7–9% de proteína bruta, 1,3–2,0% de gordura bruta e 1,0% cinza, com 12–15% de água. Outros componentes, como proteínas ou lipídios no arroz, são indesejados. Saquês produzidos com arroz que contenham excesso proteínas ou lipídios não têm bom sabor. Estes compostos indesejáveis encontram-se na superfície do esperma, principalmente em torno da camada de aleurona (casca do arroz), sendo, portanto, removidos no polimento do grão (KANAUCHI, 2013).

Microrganismos utilizados na produção do saquê

Fungo filamentosos *Aspergillus flavus* var. *oryzae*

O *A. oryzae*, fungo filamentosos que sacarifica o arroz para a produção do saquê, produz enzimas proteases, amilases e glucosidases, é considerado seguro para aplicação em alimentos (PEREIRA, 2014).

É muito utilizado culinária asiática, na elaboração de outros produtos além do saquê, como molho shoyo e missô, porque possui uma alta secreção enzimática. No Japão utiliza-se esse fungo há bastante tempo, tanto na produção enzimática, como na indústria em geral (MONCLARO, 2014).

O *Aspergillus oryzae* se desenvolve principalmente sobre um substrato sólido como o arroz, processo conhecido como Fermentação em Estado Sólido (FES), descrita como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em substratos sólidos umedecidos ocorre na ausência (ou quase) de água na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; RAHARDJO *et al.*, 2006). O material sólido, utilizado na fermentação no estado sólido, é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade.

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são organismos unicelulares eucariotos, fermentadores de carboidratos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada em processos fermentativos alcoólicos. Destaca-se que, no Brasil, toda produção de álcool carburante baseia-se na atividade fermentativa de leveduras alcólicas. (AQUARONE, E. *et al.*, 2001).

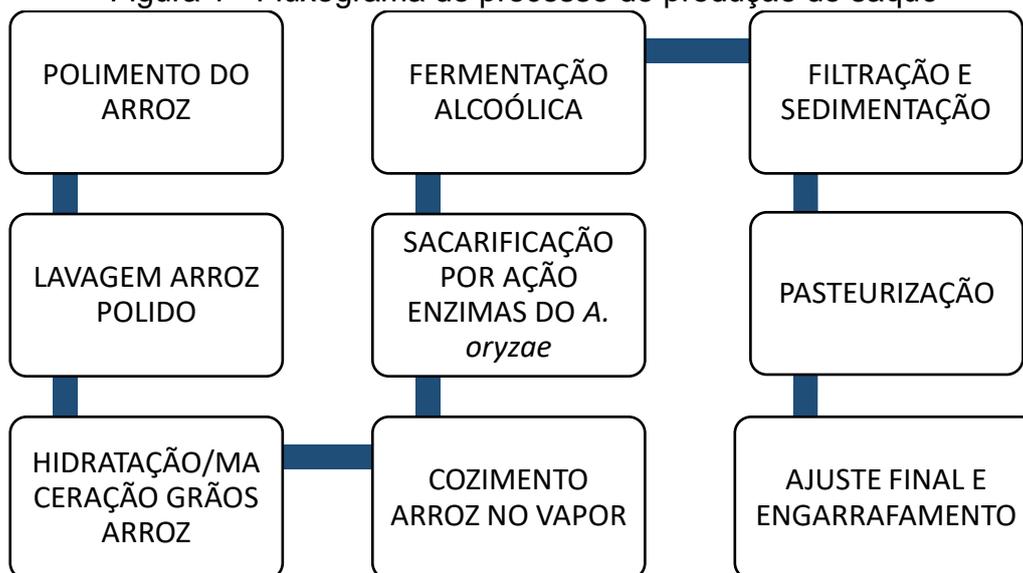
A *S. cerevisiae*, é um microrganismo facultativo, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente em atmosfera anaeróbia realizando fermentação. Os produtos da metabolização do açúcar dependem das condições fornecidas às leveduras. Em condições aeróbias, as leveduras realizam respiração celular, processo no qual todo o açúcar é transformado em biomassa, dióxido de carbono e água. Na ausência de oxigênio, a maior parte dos carboidratos é convertida em etanol e dióxido de carbono (AQUARONE et al., 2001).

Processo de produção do saquê

A produção é iniciada a partir da sacarificação do amido presente no arroz, realizada pelo fungo filamentosos, seguida de sua fermentação por leveduras. O arroz deve ser polido até que as cinzas, lipídeos e proteínas sejam removidos do grão de maneira que restem apenas 60% do material inicial; esse percentual interfere no teor alcoólico do produto. O *Koji*, utilizado tradicionalmente na produção do saquê é composto de arroz que após ser cozido e vaporizado é colonizado pelo fungo *A. oryzae*. É através da ação das enzimas secretadas pelo *Aspergillus oryzae* que o amido é convertido em açúcares fermentáveis, para que ocorra a fermentação alcoólica, por leveduras *S. cerevisiae*, formando então o etanol (TSUTIDA, 2017).

A fermentação alcoólica leva em torno de três semanas, entre temperaturas que variam de 7°C no início a um máximo de 18°C. Ao final deste período, filtra-se a bebida por pressão, mantendo-a um período de maturação de 5-10 dias. A sequência de operações para produção do saquê é apresentada de forma resumida no fluxograma a seguir:

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção do saquê



Fonte: Tsutida, 2017

MATERIAIS E MÉTODOS

Para produção de saquê artesanal em pequena escala, selecionou-se o denominado *Junmai-shu*, considerado o tipo de saquê mais puro, produzido apenas com arroz, água e *koji*, sem acréscimo de etanol (ASSOCIAÇÃO CULTURAL E ASSISTENCIAL DA LIBERDADE, 2019; TSUTIDA, 2017).

Preparação do arroz para a fermentação

Utilizou-se 1000g de arroz polido, marca MOMIJI, grão longo tipo 1, beneficiado – subgrupo polido. O arroz foi lavado em água corrente, após essa etapa, foi imerso em água mineral morna a 25° C até que absorvesse 30% de seu peso, em seguida foi colocado em uma peneira, para ser cozido a vapor (TSUTIDA et al., 2017).

Preparação do *koji* e da cultura mãe de leveduras (*shubo*)

Aproximadamente 200 gramas de arroz cozido no vapor foi espalhado em uma bandeja sobre o qual foram adicionados 10g do fungo *Aspergillus oryzae* (cultura comercial adquirida via Mercado Livre) e incubado em uma estufa de laboratório com controle de temperatura a 35° C por 3 dias, para obtenção do *koji*.

Em paralelo, preparou-se a cultura mãe de leveduras, o *shubo*. O caldo foi preparado a partir da mistura de 50 gramas de fermento biológico fresco (levedura

prensada) da marca Bruggeman e 1300 mL de água mineral com 400 gramas de açúcar cristal comum, mais 30 mL de suco de limão para acidificar a solução, que permaneceu em um fermentador de vidro, sem oxigenação, sob refrigeração entre 8° C a 12° C por 3 dias (TSUTIDA et al., 2017).

Processo fermentativo do saquê artesanal

Inicialmente, adicionou-se o *koji* ao *shubo* (cultura mãe leveduras ativas) em um fermentador (Figura 2) mantido sob refrigeração. Após 3 dias, o restante do arroz previamente cozido foi adicionado a este recipiente, mantido sob refrigeração de 8° C a 12° C por 32 dias (AQUARONE et al., 2001).

Figura 2 - Fermentador contendo substrato, durante processo de fermentação



Fonte: autores

Ao fim do período de fermentação, o material fermentado foi submetido a uma sequência de filtrações. A 1ª filtração foi realizada com tecido de algodão com trama fina, conforme Figura 3a. Nessa fase, a parte líquida ainda estava turva, como pode ser visualizado na Figura 3b, e foi deixada em repouso por mais 3 dias para a sua sedimentação e nova filtragem, com filtro de papel para café (Melitta®). O filtrado permaneceu em repouso por mais 2 dias, após os quais foi filtrado novamente com filtro de papel, obtendo-se um líquido de aparência cristalina. Notou-se forte produção de gás, o que indica a produção de etanol. Após as filtrações, o saquê foi engarrafado, seguindo, para dosagem de etanol e avaliação sensorial (TSUTIDA et al., 2017).

Figura 3a - Primeira filtração do material fermentado, realizada com tecido de algodão



Figura 3b - Filtrado ainda turvo, em repouso para decantação



Fonte: autores.

Dosagem etanol e teor de açúcares

Foram realizadas em equipamento YSI modelo 2700 da marca Tecnal, que utiliza membrana seletiva, que ao contato com a amostra, emite um sinal elétrico em nA, devido a reação dos elétrons livres da amostra com a membrana, transforma o sinal elétrico em g/L de concentração de etanol ou açúcares. O uso do equipamento foi gentilmente cedido pela empresa Amyris do Brasil.

Avaliação sensorial

A avaliação sensorial foi realizada em uma sala reservada da Fatec, com 4 mesas redondas grandes, nas quais apenas uma pessoa por vez, realizava a avaliação, utilizando como amostra de referência o saquê GOLD SECO, de teor alcoólico 14%, da marca THIKARÁ.

As amostras foram servidas em copos plásticos de coloração branca de 80 ml, com quantidades padronizadas (10 mL), refrigeradas, codificadas com números aleatórios de três dígitos.

Participaram da avaliação sensorial provadores não treinados, de ambos os sexos, sendo estes alunos e professores da Fatec. As bebidas foram apresentadas de forma casualizada aos provadores, que foram instruídos a beber água mineral entre as amostras para limpar o palato e neutralizar o sabor. Foram 28 provadores com idade entre 18 e 50 anos que receberam uma ficha de avaliação (Figura 4) para realizar o teste afetivo de preferência (ordenação), utilizando-se concomitantemente

escala hedônica estruturada de 9 pontos, com os extremos se ancorando nos termos “9 - gostei muitíssimo” e “1 - desgostei muitíssimo” (Figura 5) (JAEKEL, 2010; CHAVES; SPROESSER, 1993; MORAES, 1993).

Figura 4 - Ficha de avaliação sensorial utilizada.

Nome:	Idade:	data:
Instruções: você está recebendo amostras de bebida fermentada de arroz (saquê). Avalie suas amostras e indique sua preferência		
Código da amostra	Valor atribuído (escala hedônica)	
Mais preferida:	_____	_____
Menos preferida:	_____	_____
Explique porque: _____		

Fonte: autores

Figura 5 - Escala Hedônica utilizada no teste de preferência.

<p>1= Desgostei muitíssimo 2= Desgostei muito 3= Desgostei regularmente 4= Desgostei ligeiramente 5= Indiferente 6= Gostei ligeiramente 7= Gostei regularmente 8= Gostei muito 9= Gostei muitíssimo</p>

Fonte: autores

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem alcoólica

A concentração de etanol obtida foi de 80,90 g/L, o que equivale 8,06% de etanol por volume segundo cálculos abaixo, utilizando o valor encontrado de densidade da amostra igual a 1003,371 g, em análise de massa por volume conforme Equação 1:

$$x = \frac{80,9}{1003,371} \times 100 = 8,06\% \text{ de etanol} \quad (1)$$

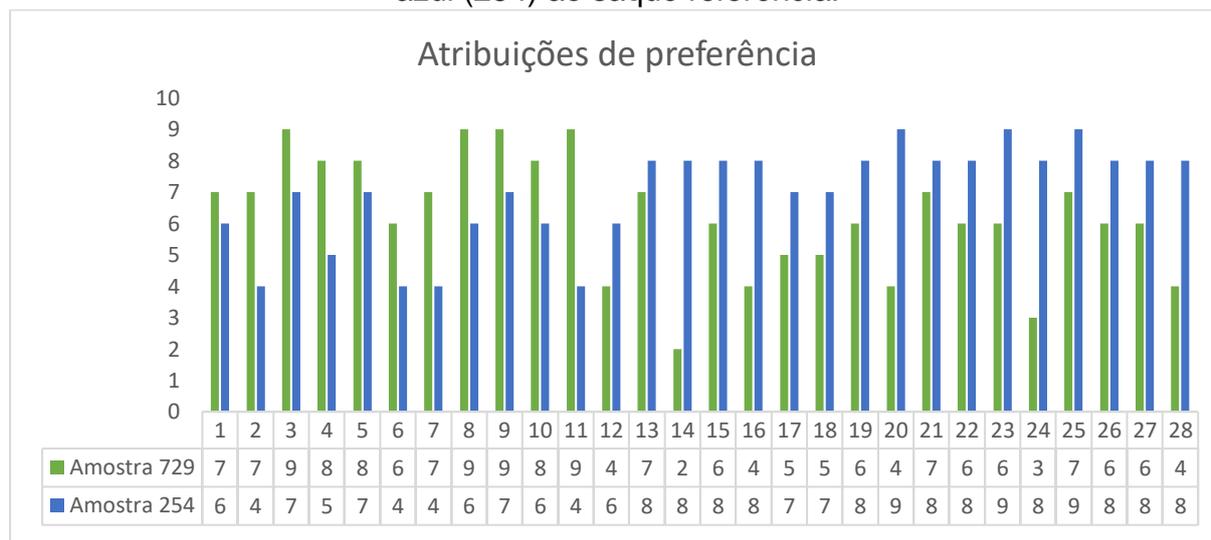
Os valores de Sacarose e Glicose foram 5,54 g/L (0,55%) e 16,70 g/L (1,66%), respectivamente.

A partir destes resultados, foi possível classificar o saquê produzido artesanalmente na categoria de saquê seco devido a concentração de açúcar estar abaixo dos 30% segundo legislação nacional (BRASIL, 2009). A partir da confirmação desta classificação, foi selecionado a bebida comercial saquê GOLD SECO, para ser usado como referência na análise sensorial.

Análise sensorial

Através da escala hedônica, ficou definido gosto de preferência entre os provadores. A média das notas do saquê produzido artesanalmente foi 6,25 e a bebida de referência Thikará foi 6,96. O Gráfico 1 é a representação gráfica das notas obtidas na análise sensorial.

Gráfico1 - Frequência de notas da avaliação sensorial dos saquês. Em verde (codificada como 729) estão representadas as notas dadas ao saquê artesanal e em azul (254) ao saquê referência.



Fonte: autores

Segundo a descrição na escala hedônica utilizada, essas médias representam que os provadores gostaram ligeiramente e ou gostaram regularmente. Deve-se ressaltar que em testes estatísticos, a maior e a menor nota única, isto é, quando não há repetibilidade dessa nota, devem ser excluídas da média, sendo assim o valor da média do saquê artesanal sobe para 6,41, pois exclui-se uma nota 2 que não se repete nas avaliações desse experimento (MORAES, 1993).

CONCLUSÕES

Apesar da variação de teor alcoólico do saquê produzido artesanalmente (8,06%) e o de referência (14%), as notas atribuídas a eles pelos avaliadores não foram tão distintas, indicando que a aceitação do produto artesanal foi similar à da bebida comercial.

Atribuiu-se o baixo teor alcoólico obtido na fermentação ao formato do fermentador (frasco onde ocorre o processo fermentativo) utilizado, que era largo e baixo, facilitando o contato das leveduras com o oxigênio atmosférico, que nesta condição realizam preferencialmente o metabolismo respiratório, consumindo toda a energia presente nos carboidratos disponíveis, gerando como produtos dióxido de carbono e água.

O fermentador ideal seria alto e estreito, reduzido a superfície de contato do substrato com o oxigênio, induzindo as leveduras ao metabolismo fermentativo, possibilitando então produção de maiores concentrações de etanol.

É importante ressaltar a ausência de experiência prévia dos autores em processos fermentativos pela técnica de Fermentação em Estado Sólido e que foi realizado um único experimento, que possibilitou a produção do saquê em volume e qualidade suficientes para serem avaliados. A realização deste projeto trouxe subsídios para possível implantação de experimento prático de Fermentação em Estado Sólido na disciplina de Bioquímica e Tecnologia das Fermentações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Faculdade de Tecnologia de Campinas por disponibilizar os materiais e o espaço para a execução do artigo. Agradecem a empresa Amyris do Brasil por disponibilizar o equipamento YSI para dosagem de etanol e açúcares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. Biotecnologia na Produção de Alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, v. 4. p. 1-19, 2001.
- ASSOCIAÇÃO CULTURAL E ASSISTENCIAL DA LIBERDADE. **Gastronomia: saquê**. Disponível em: <<http://www.culturajaponesa.com.br/index.php/gastronomia-eculinaria/saque>>. Acesso em: 18 abr. 2019
- BOKULICH, N. A.; OHTA, M.; LEE, M.; MILLS, D. A. Indigenous Bacteria and Fungi Drive Traditional Kimoto Sake Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 17. p. 5522-5529, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilanciaagropecuaria/ivegetal/bebidas>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, L. R. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. Engenharia bioquímica, São Paulo: Edgard Blucher. v. 2, p. 247-270, 2001.
- JAEKEL, L. Z.; RODRIGUES, R. S.; SILVA, A. P. Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 342-348, abr./jun. 2010.
- KANAUCHI, M. SAKE Alcoholic Beverage Production in Japanese Food Industry. In **Food Industry**. IntechOpen. p.39-63, 2013.
- LEE, Y.; SHIN, W. Marketing tradition-bound products through storytelling: a case study of a Japanese sake brewery. **Service Business**. v. 9, p. 281-295, 2014.
- MONCLARO, A. V. Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis. 110 p. Mestrado em Biologia Molecular, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2014.
- MORAES, M. A. C. **Métodos para a avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: UNICAMP, 1993.

- PEREIRA, J. L. Produção de Enzimas Amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de Fermentação em Estado Sólido. Monografia de Conclusão de Curso de Farmácias – Universidade de Brasília. Brasília – 2014.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24. n. 2, p. 161-179, 2006
- TSUTIDA, A.; VAN DE RIET, I.; FURLAN, T.; ABUNO, V. S. **Sakê**. 2017. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3506663/mod_resource/content/1/Sak%C3%AA.pdf>. Acesso em: 10 maio 2020.
- ZHANG, K.; WU, W.; YAN, Q. Research advances on sake rice, koji, and sake yeast: A review. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p. 2995-3003, 2020.