



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
CAMPUS DE ITAPETINGA – BA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E
AMILOGLUCOSIDASES PARA APLICAÇÃO DO COMPLEXO
MULTIENZIMÁTICO BRUTO NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DO RIZOMA
DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)**

Autor: Nadabe dos Santos Reis
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
Junho de 2019

NADABE DOS SANTOS REIS

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E
AMILOGLUCOSIDASES PARA APLICAÇÃO DO COMPLEXO
MULTIENZIMÁTICO BRUTO NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DO RIZOMA
DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco
Coorientadores: Prof^o Dr. Nívio Batista Santana
Prof^a Dr^a. Norma Eliane Pereira

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
Junho de 2019

660.634 Reis, Nadabe dos Santos.

R311o Otimização e caracterização de celulasas e amiloglucosidasas para aplicação do complexo multienzimático bruto na extração de metabólitos do rizoma de gengibre (*Zingiber officinale roscoe*). / Nadabe dos Santos Reis. – Itapetinga-BA: UESB, 2019.

112f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco e coorientação do Prof. D. Sc. Nívio Batista Santana e Prof^a. D. Sc. Norma Eliane Pereira.

1. Metabólitos do rizoma de gengibre. 2. Óleos essenciais de gengibre. 3. Gengibre – Amido - Enzimas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Franco, Marcelo. III. Santana, Nívio Batista. IV. Pereira, Norma Eliane. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Metabólitos do rizoma de gengibre
2. Óleos essenciais de gengibre
3. Gengibre – Amido - Enzimas



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E AMILOGLUCOSIDASES PARA APLICAÇÃO DO COMPLEXO MULTIENZIMÁTICO BRUTO NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DO RIZOMA DE GENGIBRE (*Zingiber officinale Roscoe*).

Autor (a): NADABE DOS SANTOS REIS

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientador (a): Prof. Dr. Nívio Batista Santana

Prof.ª Dr.ª Norma Eliane Pereira

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Nívio Batista Santana
UESB

Prof.ª Dr.ª Lígia Miranda Menezes
UESB

Prof.ª Dr.ª Leila Oliveira Santos
Membro Externo – UFESB/ITABUNA

Prof. Dr. Marcelo Luis Oliveira Ferreira
Membro Externo - UESC

Prof. Dr. Marcelo Franco
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 14 de junho de 2019.

Para que todos observem, saibam, considerem juntos e compreendam que foi a mão de
YAHWEH que fez isso, e o Santo de Israel o criou!

Isaías 41:20

Aos amores de minha vida.

Principalmente, meu pai **José** (homem de fé),
minha mãe **Noélia** (mulher guerreira) e
meu esposo **Agnobaldo** (companheiro leal).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Posso dizer com tranquilidade, que Deus é amoroso e fiel! Nada, absolutamente nada seria tão maravilhoso se não fosse a presença de Deus em minha vida! A Ele (meu Senhor lindo) toda minha gratidão!

Quero agradecer a quem esta comigo todos os dias, desde quando me levanto bem-humorada ou um tanto estressada. Aqueles que me acolhem bem cedinho com o “bom dia”, “Deus te abençoe”. Quero agradecer a minha família! Principalmente, a Guinó e meus pais (Noélia e José). Vocês são instrumentos de Deus na terra, sou muito feliz por tê-los pertinho de mim, obrigada!

Agradecer a meus irmãos, Tiago, Joabe e Raylane pelo carinho durante a caminhada. Aos meus cunhados e cunhadas pelas oração e carinho! Aos amores do meu coração (Gui, Sophia, Ryan e Isaque) que me alegram com a doçura da infância! A minha sogra Lucinha, por todo carinho e por cada chazinho. A cada um dos meus tios (as) (são muitos), a cada buscapense, meu muito obrigada. A minha vó Hilda, pelo amor e café quentinho!

Quero agradecer a cada um da família LABIOCAT! Com vocês até o pesado fica mais leve! Em especial, ao nosso coordenador, orientador Prof. Dr. Marcelo Franco! Muito obrigada por todo ensinamento compartilhado durante estes 6 anos, o admiro pelo profissional que és e estimo ricas bençãos da parte de Deus sobre sua vida!

Quero agradecer aos docentes e técnicos da UESC pela contribuição nesse trabalho!

Agradeço carinhosamente aos professores do PPGEAL da UESB por compartilhar os saberes e as técnicas, por cada seminário, cada olhar, sugestão e por “cada bronca” que me moldaram para melhor! Serei sempre grata! Obrigada UESB!

Agradeço a Capes pela bolsa concedida durante os primeiros anos do doutorado (como me auxiliou!), possibilitando a participação nos eventos, a aquisição de livros, a presença diária no laboratório (vivências que enriquecem a vida acadêmica) e por isso não poderia deixar de destacar nesse momento a importância das bolsas de estudo na vida de um aluno de pós-graduação.

Aos meus amigos; Poly, Guega, Ane, Fran, Cíntia, Ed, Zana, Gis, Leo, Pri, Aline, Leila, Ben-Hur, Fábio, Bruninha I, Nayara, Bruninha II, Marcelo, Fernando e Rafael (família UFSB- CFTCI), pessoas que me incentivaram muito a concluir esta etapa.

A todos que contribuíram na realização deste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	14
1.1	INTRODUÇÃO	16
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Geral.....	18
1.2.2	Específicos	18
1.3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.3.1	Fermentação em Estado Sólido.....	19
1.3.2	Resíduo – Casca da amêndoa de cacau.....	19
1.3.3	Micro-organismos utilizados na FES.....	22
1.3.4	Aplicações da FES	23
1.3.5	Parede Celular Vegetal.....	25
1.3.6	Enzimas Degradoras da Parede Celular Vegetal.....	26
1.3.6.1	Celulases	26
1.3.6.2	Xilanases	27
1.3.6.3	Amyloglicosidases	28
1.3.7	Metabólitos do rizoma de gengibre.....	29
1.3.7.1	Óleos essenciais de gengibre.....	29
1.3.7.2	Amido de gengibre.....	30
1.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	CAPÍTULO II	41
	COCOA SHELL AS A SUBSTRATE FOR OBTAINING ENDOGLUCANASE, XYLANASE AND AMYLOGLYCOSIDASES BY <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124	
II	1. ABSTRACT.....	42
II	2. INTRODUCTION	43
II	3. MATERIAL AND METHODS.....	45
II	4. RESULTS AND DISCUSSION	49
II	5. CONCLUSIONS	59
	Acknowledgements.....	60

	References	60
	CAPÍTULO III	65
	ENZYME EXTRACTION BY LAB-SCALE HYDRODISTILLATION OF GINGER ESSENTIAL OIL (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe): CHROMATOGRAPHIC AND MICROMORPHOLOGICAL ANALYSES	
III	1. ABSTRACT	66
III	2. INTRODUCTION	66
III	3. MATERIAL AND METHODS	68
III	4. RESULTS AND DISCUSSION	73
III	5. CONCLUSIONS	79
	Acknowledgements	80
	References	80
	CAPÍTULO IV	86
	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO NO RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE RIZOMA DE GENGIBRE (<i>Zingiber officinale</i> R.)	
IV	1. ABSTRACT	87
IV	2. INTRODUÇÃO	88
IV	3. MATERIAL E MÉTODOS	89
IV	4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
IV	5. CONCLUSÃO	107
	Agradecimentos	107
	Referências	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ilustração do beneficiamento do cacau	21
Figura 1.2 – Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	23
Figura 1.3 – Esquema representando a parede celular vegetal	25
Figura 2.1 – Gráfico de Pareto apresentando a significância dos termos das variáveis: tempo de fermentação (t), atividade de água (Aw) e temperatura de incubação (T), no modelo ajustado para produção de endoglucanase, xilanase e amiloglucosidase por <i>A. oryzae</i> ATCC 10124	51
Figura 2.2 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo EG representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, atividade água e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de endoglucanase	54
Figura 2.3 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo XS representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, atividade água e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de xilanase	55
Figura 2.4 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo AG representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, atividade água e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de amiloglucosidase	56
Figura 2.5 -Eletromicrografias do crescimento fúngico sob a casca da amêndoa de cacau	58
Figura 3.1 – Gráfico de Pareto apresentando a significância dos termos das variáveis: temperatura, tempo e EMB/H ₂ O, no modelo ajustado para a extração de óleo essencial de gengibre e Gráficos de superfície de resposta construídos com base no modelo RE representando as interações entre as variáveis temperatura, tempo e volume de EMB/H ₂ O, tendo-se como resposta o rendimento de óleo essencial de gengibre extraído	74
Figura 3.2 – Eletromicrografias da parede celular vegetal dos rizomas de gengibre	79

Figura 4.1 – Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis tempo de decantação (TD) e volume de EMB (VEE) no modelo ajustado para a extração de amido de gengibre utilizando EMB produzido por <i>A. oryzae</i> ATCC 10124.....	94
Figura 4.2 – Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado para explicar a variabilidade dos resultados do rendimento de amido utilizando EMB <i>A. oryzae</i> ATCC 10124.....	96
Figura 4.3 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo <i>Y</i> representando as interações entre as variáveis tempo de decantação e volume de EMB, tendo-se como resposta o rendimento do amido de gengibre.	97
Figura 4.4 – Difrátogramas de raios X de amido isolado do rizoma de gengibre, A) extraído em água; B) extraído após tratamento enzimático.....	99
Figura 4.5 – Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) de amido do rizoma de gengibre extraído em água.....	100
Figura 4.6 – Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) de amido do rizoma de gengibre extraído após o tratamento enzimático.	101
Figura 4.7 – Curvas TGA e DTA do amido de gengibre obtido após tratamento enzimático, A) Amido controle; B) Amido modificado.	102
Figura 4.8– Termogramas DSC Amido controle e amido modificado.....	103
Figura 4.9 – Eletromicrografias da estrutura vegetal- A) grânulos de amido em meio as células parenquimatosas (1000x), B) estrutura celular após o tratamento enzimático (1000x).....	104
Figura 4.10 – Eletromicrografias do amido de gengibre extraído em água, A) leitura em 1000x, B) 2000x, C) 4000x; Amido modificado enzimaticamente, D) leitura 2000x, E) 3000x, F) 4000x.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Aplicações da fermentação em estado sólido na produção enzimática	24
Tabela 2.1 – Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de endoglucanase, xilanase e amiloglucosidase utilizando casca da amêndoa do cacau	50
Tabela 2.2 – ANOVA para o modelo reduzido ajustado – endoglucanase, xilanase e amiloglucosidase.....	52
Tabela 3.1 – Matriz Doehlert utilizada para otimização da extração de óleo essencial de gengibre	71
Tabela 3.2 – ANOVA para modelo ajustado- otimização do pré-tratamento enzimático.....	73
Tabela 3.3 – Estudos sobre a eficiência do pré-tratamento enzimático na degradação da parede celular vegetal, promovendo melhores rendimentos de óleo essencial de diferentes matrizes vegetais.....	75
Tabela 3.4 – Composição dos óleos essenciais- Controle (AC) e com tratamento enzimático (OTE).....	77
Tabela 4.1 – Variáveis e níveis do planejamento Doehlert para a otimização do rendimento do amido de gengibre utilizando EMB produzido por <i>A. oryzae</i> ATCC 10124 em fermentação em estado sólido sob resíduo da casca da amêndoa de cacau	91
Tabela 4.2 – ANOVA para o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos com o planejamento Doehlert	95
Tabela 4.3 – Composição Química do Amido	98

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FES	Fermentação em estado sólido
EMB	Extrato multienzimático bruto
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PDA	Ágar-dextrose-batata
T	Temperatura de incubação
A _w	Atividade de água
t	Tempo de fermentação
TD	Tempo de decantação
VEE	Volume de extrato multienzimático
OC	Óleo controle
OTE	Óleo após o tratamento enzimático
RAC	Rendimento de amido controle
RAE	Rendimento do amido após o tratamento enzimático
BOD	Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio
UI/g	Unidade internacional de atividade enzimática por grama de substrato
ANOVA	Análise de variância
R ²	Coefficiente de determinação
R ² -adj	Coefficiente de determinação ajustado
GL	Grau de liberdade
SQ	Soma dos quadrados
QM	Quadrado médio
F	Teste de Fisher
P	Probabilidade
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
AOAC	Associação Oficial da Química Analítica
IAL	Instituto Adolfo Lutz
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFSB	Universidade Federal do Sul da Bahia
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

REIS, Nadabe dos Santos. **Otimização e caracterização de celulases e amiloglicosidases para aplicação do complexo multienzimático bruto na extração de metabólitos do rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)**. Itapetinga, BA: UESB, 2019. 112 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração em Ciências de Alimentos.

RESUMO

Atualmente, o interesse no desenvolvimento de novas técnicas de extração de metabólitos de várias matrizes vegetais aumentou expressivamente, devido às suas aplicações potenciais, particularmente para fins alimentícios e nutracêuticos. A presença de polissacarídeos, como celuloses, hemiceluloses, amido e pectina no interior da parede celular, reduz a eficiência de técnicas convencionais de extração. Dentre os métodos inovadores, a extração enzimática é reconhecida pela eficiência em reduzir significativamente os tempos de extração e aumentar a produtividade. Desta forma, o uso de extratos multienzimáticos brutos (EMB) obtidos por meio da fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa economicamente viável. Este trabalho tem o objetivo de fornecer dados sobre a produção e aplicação de EMB produzido a partir da FES da casca da amêndoa de cacau por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 em diferentes processos de extração de metabólitos presentes em rizoma de gengibre. O EMB obtido neste trabalho, apresentou diferentes atividades enzimáticas de endoglucanases (0,846 UI/g), xilanases (0,945 UI/g) e amiloglicosidases (0,280 UI/g). O emprego do EMB no processo de extração de óleos essenciais promoveu a elevação no rendimento de 47,95%, e independente do tratamento enzimático a composição química do óleo foi mantida. A extração de amido de gengibre a partir da adição de EMB, possibilitou um aumento na massa de amido obtido (14%), reduzindo o tempo de decantação para 60 minutos o que é bastante favorável do ponto de vista técnico e industrial. O estudo da composição química apontou um elevado grau de pureza (com reduzido teor de proteínas e cinzas). O DRX indicou que os grânulos obtidos apresentaram estrutura cristalina (tipo A) e as análises térmicas apontaram que os amidos obtidos apresentaram estabilidade térmica superior aos amidos convencionais (TG), com dois eventos endotérmicos observados a partir dos termogramas (DSC). As análises de microscopia eletrônica de varredura demonstram que os grânulos de amido de gengibre apresentaram grandes áreas de superfícies, forma oval e íntegra, características de amido tipo A, que podem ser utilizados em diferentes processos industriais.

Palavras-chave: Metabólitos, Extração, Enzimas, Otimização, Óleo essencial, Amido.

REIS, N. S. **Optimization and characterization of cellulases and amyloglycosidases for application of the crude multienzyme complex in the extraction of metabolites from the ginger rhizome (*Zingiber officinale*)**. 2019, 112 f. Thesis (Ph.D. in Engineering and Food Science) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2018.

ABSTRACT

Currently, interest in the development of new techniques for extracting metabolites from various plant matrices has increased significantly, due to its potential applications, particularly for food and nutraceutical purposes. The presence of polysaccharides, such as celluloses, hemicelluloses, starch and pectin within the cell wall, reduces the efficiency of conventional extraction techniques. These ones also suffer from low extraction yields, time inefficiency, and substandard products due to the presence of traces of organic solvents in them. Therefore, there is a need for new, efficient and environment-friendly, "green ones", extraction methods to recover biomolecules present in natural sources. Among these innovative methods, enzymatic extraction is recognized by the efficiency in significantly reducing extraction times and increasing productivity. Although this method is predominantly exploited on a laboratory scale, it also finds industrial applications. However, the cost of commercial enzymes is still a limiting factor for industrial processes. In this way, the use of crude multienzyme extracts (MMB) obtained through solid-state fermentation (SSF) is an economically viable alternative. This work aims to provide data on the production and application of EMB produced from the SSF of the cocoa bean shell by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 in different processes of metabolites extraction present in ginger rhizome. The MMB obtained in this work showed different enzymatic activities of endoglucanases (0.846 IU g^{-1}), xylanases (0.945 IU g^{-1}) and amyloglycosidases (0.280 IU g^{-1}). The use of EMB in the process of extraction of essential oils promoted the increase in yield to 47.95%, without causing changes in the chemical composition of the obtained essential oils. In the process of ginger starch extraction, the addition of MMB allowed an increase in the starch mass obtained (14 %), reducing the decanting time to 60 minutes which is very favorable from a technical and industrial point of view. The study of chemical composition pointed to a high degree of purity (with low protein and ash content). The DRX indicated that the obtained granules presented crystalline structure (type A) and the thermal analysis indicated that the obtained starches presented higher thermal stability than the conventional starches (TG), with two endothermic events observed from the thermograms (DSC). Scanning electron microscopy analyzes show that the ginger starch granules showed large areas of surface, oval and intact, characteristics of type A starch that can be used in different industrial processes.

Keywords: Metabolites, Extraction, Enzymes, Optimization, Essential oil, Starch.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A demanda por enzimas industriais está em ascensão contínua impulsionado por uma necessidade crescente de soluções sustentáveis. Segundo o relatório apresentado pela BCC Research (2017), este setor movimentou em 2016 cerca de US\$ 5 bilhões, sendo esperado um alcance de US\$ 6,3 bilhões em 2021. O mercado de uso final de enzimas industriais é extremamente difundido com inúmeras aplicações industriais (Adrio e Demain, 2014).

As enzimas hidrolíticas são as mais comercializadas no mercado global, podendo-se destacar neste grupo as celulases, pectinases e xilanases (Fernandes e Carvalho, 2017). Estas enzimas apresentam papéis versáteis em diversos setores industriais, sendo capazes de otimizar processos por serem biocatalisadores específicos e biodegradáveis (Castro et al., 2018). Crescente interesse tem surgido no emprego de enzimas em processos de extração de metabólitos primários e secundários de materiais vegetais, tais como; óleos essenciais, oleoresinas, pigmentos, carboidratos, polifenóis e outros (Nadar, Rao e Rathod, 2018).

Nos últimos anos, muitas pesquisas vêm sendo realizadas sobre a produção de enzimas através da fermentação em estado sólido (FES). Na FES os resíduos agro-industriais são usados como matriz sólida para o crescimento de micro-organismos, que excretam enzimas, compostos bioativos e outros metabólitos de interesse (Ferreira et al., 2017).

Na agricultura brasileira, muitos cultivos são considerados geradores de resíduos. Dentre estes, pode-se incluir o cacau, que apesar da queda de produtividade devido a vassoura de bruxa, praga ocasionada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* no final dos anos 1980, tem apresentado atualmente expressivo aumento de sua participação no setor comercial do país (Segundo et al., 2014). A região do Sul da Bahia nestes últimos anos vem reativando a produção de cacau (Quiroz-Reyes e Fogliano, 2018). O cacau é um fruto muito apreciado e valorizado por seu sabor adocicado, levemente ácido. Após a fermentação e secagem, as amêndoas são torradas e as cascas que as envolvem se desprendem facilmente (Ferreira et al., 2017).

As agroindústrias e indústrias de chocolate da região (Cargill, Barry Callebaut, Joanes, Nestlé, Mendoá), produzem elevadas quantidades de casca de amêndoa de cacau. Estima-se que o processamento do chocolate produza em torno de 54 % de seu peso de resíduos, os quais não possuem nenhum fim específico, sendo, na maioria dos casos, incinerados ou descartados na natureza (Mendes e Lima et al., 2007).

Para o reaproveitamento deste resíduo, pesquisas vêm sendo realizadas, e a casca da amêndoa de cacau já foi utilizada para produção de lipases em estado bruto no processo fermentativo utilizando *Penicillium roqueforti* (Silva et al., 2017), endoglucanases em estado bruto a partir da bioconversão por *Penicillium roqueforti* (Oliveira, 2018), na extração de compostos bioativos e ácidos graxos (Lessa et al., 2017). Outros pesquisadores também vêm avaliando o potencial da casca da amêndoa de cacau para diversos fins como; ração animal (Andrade et al., 2010), produção de carvão ativado (Kalaivani et al., 2014), extração de compostos fenólicos com intuito de avaliar a ação inibitória de cáries dentárias (Kim et al., 2000), na produção de biogás (Mancini et al., 2016) e na produção de xilanases para enriquecimento de rações animais (Amorim, 2017). Porém, há um número reduzido de trabalhos publicados que abordem sobre o reaproveitamento da casca da amêndoa de cacau.

Neste sentido, a casca da amêndoa de cacau é empregada neste estudo como matriz sólida, servindo como suporte e fonte de nutrientes para o crescimento do *Aspergillus oryzae*, obtendo através da FES a produção de extratos multienzimáticos brutos (EMB). A proposta deste trabalho está relacionada não só a produção e otimização de EMB como também na aplicação destes na extração de metabólitos do rizoma de gengibre. O gengibre é um material vegetal rico em metabólitos que estão associados à saúde humana. Neste contexto, aplicar os EMB na extração destes metabólitos, pode evidenciar a FES como uma alternativa viável e inovadora. Além disso, propor um estudo voltado a aplicação dos EMB produzidos torna-se uma tarefa importante não só do ponto de vista científico, mas, também, do ponto de vista técnico, devido à possibilidade de revelação de potenciais catalisadores a serem aplicados em processos industriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Obtenção do extrato multienzimático bruto (EMB) em escala laboratorial através da fermentação em estado sólido da casca da amêndoa de cacau por *Aspergillus oryzae* e aplicação dos EMB obtidos na extração de metabólitos dos rizomas de gengibre.

1.2.2 Específicos

- Avaliar o potencial do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 como agente fermentador e o resíduo da casca da amêndoa de cacau como meio de cultura para produção de EMB por FES;
- Verificar os parâmetros de fermentação: temperatura de incubação, atividade água e tempo sobre a produção de EMB e determinar as condições que levam a maximização da produção enzimática;
- Avaliar o potencial de utilização do EMB obtido após o processo fermentativo, visando à extração do óleo essencial de gengibre associado ao processo de hidrodestilação;
- Avaliar a estrutura da parede celular vegetal antes e após o tratamento enzimático através de análise de microscopia de varredura;
- Avaliar o rendimento de amidos de gengibre antes e após o tratamento enzimáticos;
- Comparar os resultados das análises físico-químicas e térmicas dos amidos obtidos sem e com a aplicação dos EMB.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é considerada um bioprocessamento heterogêneo, trifásico, que apresenta potenciais benefícios para o cultivo microbiano, assim como, para produção e desenvolvimento de bioprodutos (Costa et al., 2018).

A FES é um termo geral usado para designar um processo biotecnológico de baixo custo, relativamente simples que consiste no cultivo de micro-organismos sobre matrizes sólidas úmidas, inertes que podem ser usadas como fonte de macro e micronutrientes (Bücka et al., 2015). A FES pode ser conduzida em baixa atividade de água livre, simulando o ambiente natural que muitos fungos, bactérias e leveduras estão adaptados (Rodríguez-León et al., 2018). Para isso, é imprescindível que o suporte apresente atividade de água (A_w) necessária para o crescimento dos micro-organismos.

O baixo teor de A_w significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de micro-organismos, principalmente leveduras e fungos filamentosos. Durante a fermentação em estado sólido, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e excretando metabólitos, dentre os quais, as enzimas (Subramaniyam e Vimala, 2012).

A FES é uma técnica que apresenta vantagens do ponto de vista econômico e ambiental por apresentar tais características; menor necessidade de energia empregada, maior rendimento do produto, menor produção de águas residuais associado a redução dos riscos de contaminação bacteriana, agregação de valor a produtos oriundos da fermentação de resíduos agroindustriais, uso de reatores pequenos (erlemeyer) ou bioreatores de bandejas que ocupam menos espaço e redução nos gastos energéticos (Aljammas e Alkhalaf, 2018).

1.3.2 Resíduo – Casca da amêndoa de cacau

Na FES a seleção do substrato é um aspecto importante e deve ser considerado. O resíduo sólido é um material não solúvel que age tanto como suporte físico como fonte de nutrientes (Wang, Lui e Chen, 2018). Neste trabalho, o substrato empregado foi a casca que reveste a amêndoa do cacau.

O cacauero é uma espécie arbórea tropical, supostamente originária da América Tropical. O cacau é conhecido cientificamente por *Theobroma cacao* L. é bastante apreciado em grande parte do mundo pelo seu aroma e sabor peculiar (Herman et al, 2018). Os frutos do cacau geralmente são alongados e sulcados, podendo ter coloração verde ou roxo, e amarelo ou laranja à medida que amadurecem e a depender da variedade. Dependendo da variedade (Criollo, Forasteiro e Trinitário), medem de 15 a 30 cm de comprimento por 7 a 12 cm de circunferência, e possuem de 30-40 sementes que são a principal matéria-prima para a produção do chocolate e da manteiga de cacau (Ferreira et al, 2017).

O cacau é constituído por uma casca externa e no seu interior encontram-se as sementes envolvidas por uma polpa branca, mucilaginosa e rica em açúcares (Figura 1.1) (Souza et al., 2018).

Alguns pesquisadores afirmam que durante o beneficiamento do cacau, a etapa de fermentação é de extrema importância para a qualidade das amêndoas de cacau. Durante a fermentação a polpa envoltória das sementes é degradada pela ação sucessiva de micro-organismos (leveduras e bactérias ácido-lácticas e ácidoacéticas) naturais do ambiente, com a elevação da temperatura para cerca de 50 °C (Servente et al., 2018). Esses micro-organismos atuam nos açúcares e ácidos orgânicos da polpa, que são transformados em etanol, ácidos lácticos e especialmente, ácido acético (Gomes et al., 2011). Os ácidos-orgânicos gerados penetram nas sementes, e juntamente com a elevação da temperatura causada pela fermentação aeróbica, causam a morte do embrião e acidificação no tecido armazenado (Silveira et al., 2017). Nesta etapa as sementes passam a ser denominadas amêndoas, devido a perda do poder germinativo.

Figura 1.1– Ilustração do beneficiamento do cacau: a) cacau (fruto), b) cacau aberto (amêndoas com polpa na placenta), c) sementes- inteira e cotada ao meio, d) amêndoas secas, e) amêndoas secas descascada e cortada ao meio, f) casca da amêndoa de cacau seca.



Fonte: própria autora

A amêndoa de cacau apresenta uma casca na superfície que é denominada regionalmente como a “testa” do cacau e no interior da amêndoa dois cotilédones (Figura 1.1f) (Okiyama, Navarro e Rodrigues, 2017). Durante a secagem a umidade é reduzida e as cascas das amêndoas se desprendem.

De acordo com dados do IBGE, a produção de cacau em 2017 foi de 274 mil toneladas, 28 % a mais que em 2016. A Bahia é o estado que mais produz o fruto no país, sendo responsável por cerca de 54% da safra, o equivalente a aproximadamente 148 mil toneladas. Considerando-se que o farelo da casca da amêndoa de cacau representa 10% da produção das amêndoas secas de cacau, estima-se que a produção brasileira desse resíduo na Bahia, foi de 14.800 toneladas (International Cocoa Organization, 2016).

1.3.3 Micro-organismos utilizados na FES

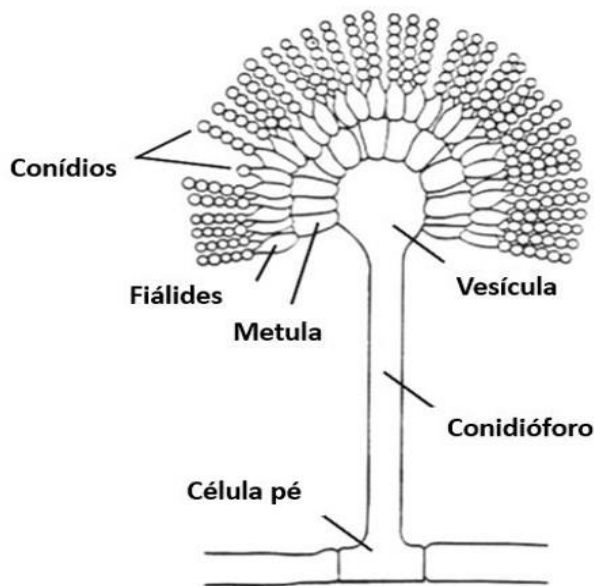
A fermentação em estado (FES) é um bioprocesso caracterizado pela baixa A_w . Esta característica pode afetar alguns aspectos da fisiologia dos micro-organismos, como por exemplo; crescimento vegetativo, esporulação, germinação e produção de metabólitos (Gomes et al., 2018). Entre os micro-organismos mais empregados na FES pode-se citar os fungos filamentosos, porém as leveduras e bactérias podem também ser utilizadas.

Os fungos filamentosos são comumente empregados, pois estes podem crescer dentro ou sobre a superfície do substrato, em baixa A_w de modo semelhante ao seu crescimento em habitat natural (Pirota, 2016). O crescimento destes fungos nos substratos está associado à sua morfologia. Os fungos filamentosos apresentam hifas penetrativas e aéreas que formam o micélio. As hifas penetrativas são essenciais no processo fermentativo, pois estas permitem a colonização entre as partículas sólidas e a obtenção dos nutrientes necessários para as atividades metabólicas (Gomes, 2018).

Entre os gêneros de fungos mais usados na FES para produção de enzimas pode-se citar; *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* (Jiang et al., 2013). Dentre estes, o *Aspergillus* é considerado um gênero capaz de produzir diferentes enzimas e outros compostos de valor agregado pela FES de resíduos agroindustriais (Singhania et al., 2009).

O gênero *Aspergillus* contém mais de 100 espécies reconhecidas (Gomi, 2014). A figura 1.2 ilustra a estrutura morfológica básica do *Aspergillus*. As espécies pertencentes a este grupo produzem tipicamente o “aspegillum” ou “cabeça aspergillar”, que possui uma haste que termina em uma vesícula arredondada, contendo uma ou duas camadas de células especializadas (filíades e metulas) (Gomi, 2014). As filíades são as células que produzem os esporos assexuados, denominados de conídios. As estruturas que suportam a formação de conídios (vesícula, metulas e filíades), a haste e a célula pé, são denominadas de conidióforos (Chang, Horn e Gomi, 2014).

Figura 1.2– Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*



Fonte: Chang, Horn e Gomi, (2014).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosso aeróbio, isolados de plantas (principalmente arroz) e solos. Este fungo tem uma temperatura ótima de crescimento entre 32–36 °C (± 1 °C) sendo incapaz de crescer acima de 44 °C e se desenvolve bem em uma A_w média em torno de 0,8, tendo o pH ótimo de crescimento entre 5-6 (Chang e Bhatnagar, 1999).

O *Aspergillus oryzae* se caracteriza por colônias de 4-5 cm de diâmetro, com coloração inicialmente branca, que durante o rápido desenvolvimento e produção dos conídios se transformam em colônias verde amareladas quando crescidas em meio ágar Czapek a 25 °C por 7 dias (Gomi, 2014).

O fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* vem sendo utilizado em diversas aplicações na indústria de alimentos, pois desempenha um papel de fundamental importância na fabricação de alimentos, tais como; saké, shoyoe, missô (pasta de soja). De modo semelhante, tem sido usado na produção de enzimas industriais, por ser considerado como um micro-organismo não patogênico, pois não produz aflotoxinas, sendo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (Ichishima, 2018).

1.3.4 Aplicações da FES

A técnica de FES é utilizada na produção de diferentes produtos; etanol por sacarificação (Canabarro et al., 2017), ácidos orgânicos (Vandenbergue et al., 2018), enzimas

(Khanahmadi et al., 2018), dentre outros. As enzimas produzidas por FES vêm sendo aplicadas nas indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica, cosméticos e agrícola (Pandey et al., 2003).

A maioria dos trabalhos científicos da FES, publicados nos últimos cinco anos, está relacionada à produção de enzimas de importância industrial, como; celulases, xilanases, proteases, amilases, pectinases, dentre outras. Na tabela 1.1 alguns trabalhos são descritos.

Diversos setores industriais já utilizam a tecnologia enzimática em seus processos. De acordo com Li et al., (2012), a indústria implementou o uso de enzimas e avaliou os benefícios em termos de custos e sustentabilidade. Vandenberghe et al., (2016), analisaram que na última década as indústrias que mais investiram em tecnologias enzimáticas foram as de alimentos, as têxteis, farmacêuticas, produtoras de papel e de gorduras e óleos. Vários estudos já comprovam a aplicabilidade das enzimas em vários processos de extração.

Tabela 1.1 – Aplicações da fermentação em estado sólido na produção enzimática

Produtos	Micro-organismos	Substratos	Referências
Xilanases	<i>Aspergillus awamori</i>	Farelo do cacau	Amorim et al., 2017
	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp</i>	Palma forrageira	Santos et al., 2016
Amilases	<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de soja	Sanhoun et al., 2015
Celulases	<i>Aspergillus oryzae</i>	Casca de arroz Casca de amendoim	Brito et al., 2017
Xilanases Celulases	<i>Penicillium roqueforti</i>	Casca de arroz	Marques et al., 2017
Proteases	<i>Aspergillus oryzae</i>	Casca de tomate Casca de arroz	Belmessikh et al., 2013

Conforme Stambuk et al., (2016), a utilização de pectinases comerciais promoveu um maior rendimento (18-20mg) de compostos fenólicos quando comparados a amostra controle. Corroborando com o uso de enzimas, Latif et al, (2011) comprovaram que o rendimento do óleo de *Moringa oleífera* aumentou cerca de 70% a partir do tratamento enzimático com celulases.

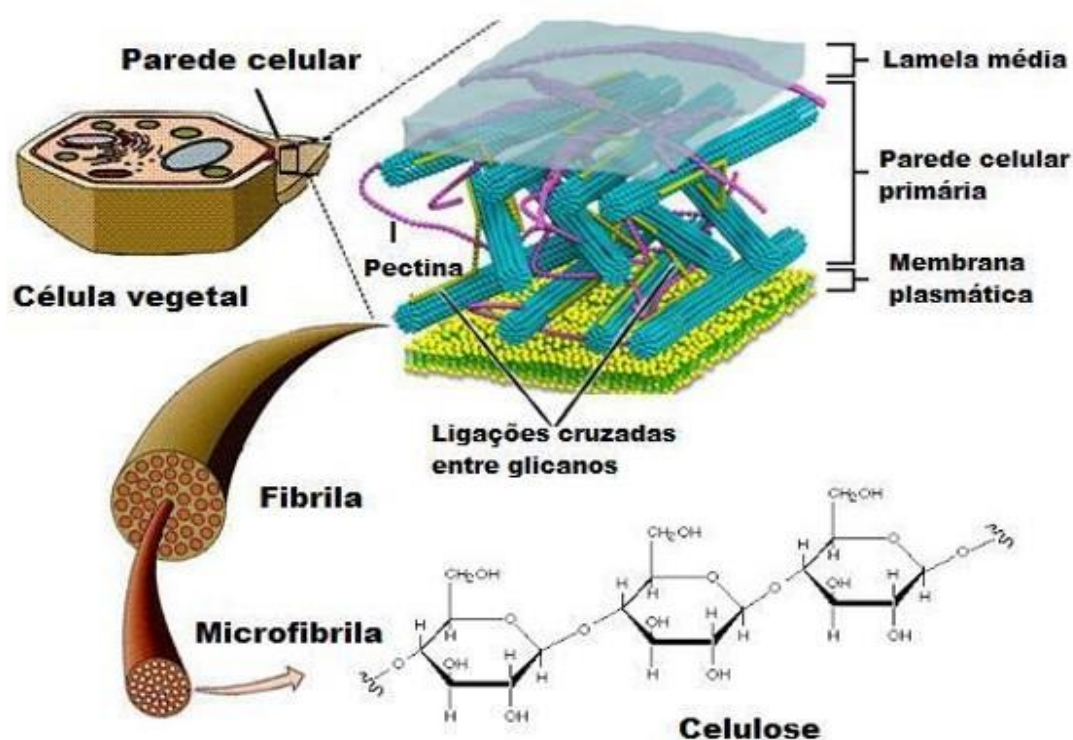
Na extração enzimática de metabólitos, as enzimas atuam na parede celular do material vegetal desempenhando um papel importante como catalisadores biológicos. Nos processos industriais a seleção da enzima hidrolítica apropriada ou mistura ideal de enzimas é

vital para obter o resultado esperado como maiores rendimentos, menor tempo de extração e consequentemente menor gasto energético (Nadar, Rao e Rathod, 2018).

1.3.5 Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal consiste predominantemente de celulose, hemicelulose e lignina em ligações cruzadas, submersas em uma matriz de substâncias pécnicas e reforçadas com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (Gorshkova et al., 2018). A parede celular está dividida em três níveis estruturais; parede primária, parede secundária e lamela média, conforme ilustrado na Figura 1.3.

Figura 1.3 – Esquema representando a parede celular vegetal



Fonte: adaptado de Alexander Silberman Institute of Life Sciences.

A parede primária é composta por aproximadamente 70% de água, os 30% restantes correspondem à matéria seca que está representada em sua maioria por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina). A parede secundária é constituída principalmente por celulose apresentando também lignina, enquanto, a lamela média preenche os espaços entre as

paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose (Prade et al., 1999).

A presença de polissacarídeos, como, celuloses, hemiceluloses, pectinas e outros compostos ligados à parede celular que são difíceis de serem removidos, reduz a eficiência da extração de técnicas convencionais (Tavares e Buckeridge, 2015).

A extração de metabólitos pode ocorrer por processos físicos, químicos e mecânicos, sendo os mais usados; a hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, prensagem a frio, extração por fluido supercrítico dentre outros. Entretanto, algumas desvantagens são observadas nestes processos como; equipamentos de alto custo, elevado volume de solvente orgânicos, baixos rendimentos, ineficiência no tempo de operação, e produtos com baixa qualidade, devido por exemplo, a presença de traços dos solventes orgânicos usados nos produtos extraídos (Sasidharan et al., 2011). Dessa forma, a extração enzimática surgiu como um método de extração de metabólitos mais adequado. A extração enzimática de biomoléculas de matrizes vegetais é uma alternativa aos métodos convencionais, sendo adotada principalmente por ser eficiente e se caracterizar como uma tecnologia verde (Kudam et al., 2015).

O princípio da extração enzimática baseia-se no rompimento da estrutura da parede celular vegetal (Nadar, Rao e Rathod, 2018). As enzimas atuam diretamente na parede celular vegetal como catalisadores, desestruturando o tecido vegetal auxiliando desta maneira na remoção dos metabólitos (Oroian e Escriche, 2015). Uma ampla gama de enzimas é geralmente empregada nos processos de extração de metabólitos, dentre estas pode-se citar as celulases, xilanases e amilases.

1.3.6 Enzimas Degradadoras da Parede Celular Vegetal

1.3.6.1 Celulases

A celulose se caracteriza como uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água. A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de glicose ligadas entre si através de ligações β -1,4, formando microfibras. Estas microfibras se entrelaçam, formando finos filamentos, denominados macrofibrilas (Srivastava et al, 2018). As moléculas de celulose possuem duas regiões, cristalina e amorfa, sendo a região cristalina impermeável à água e resistente à degradação química e biológica, pois apresenta um número elevado de interações moleculares intra e internamente, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals

(George e Sabapathi, 2015). Já a região amorfa é facilmente hidrolisável, pois nesta região há menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (Wang et al., 2012). Por se tratar de uma molécula complexa, rígida e hidrofóbica faz-se necessário a ação de um conjunto de enzimas atuando de forma sinérgica para a degradação da celulose (Paramjeet, Manasa e Korrapati, 2018).

A classe das celulases é formada por endoglucanases (EC 3.2.1.4) que clivam aleatoriamente a cadeia de celulose, exoglucanases (EC 3.2.1.74 e EC 3.2.1.91), que catalisam a hidrólise de extremidades de cadeias, e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) também chamado celobioses, que hidrolisa o produto das exoglucanases liberando monômeros de glicose (Kuhad et al., 2016).

Estas classes de enzimas têm importantes aplicações, incluindo biocombustíveis, alimentos, bebidas, papel, têxteis, farmacêutica, agrícola. Hidrólise mediada por enzimas de celulose biomassa resultam na geração de açúcares que servem como os materiais de partida para a produção de vários produtos adicionados de interesse comercial, como bioetanol, ácidos orgânicos, açúcares e rações para animais (Sreedharan, Prakasan e Sasidharan, 2016)

1.3.6.2 Xilanases

As xilanases são um conjunto de enzimas hidrolíticas de ampla ocorrência em organismos dos domínios Eucariota e Procariota, sendo os principais produtores os fungos, bactérias, leveduras, protozoários, algas marinhas, insetos, crustáceos e sementes. A principal função das xilanases é catalisar a degradação da xilana, reduzindo o grau de polimerização desse substrato (Irfan et al., 2014). A xilana é um dos componentes majoritários da parede celular de plantas, sendo encontrada em grandes quantidades em madeira mole de gimnospermas (7 a 10% do conteúdo da parede celular), madeira dura de angiospermas (15 a 30%) e em plantas anuais (<30%). Dentro da estrutura da parede, é encontrada na fração da hemicelulose, que fica na interface entre a lignina e a celulose mantendo ligações covalentes e não covalentes que mantém a coesão das fibras e a integridade da parede celular (Zhang, Choi e Yoo, 2015).

A complexa estrutura da xilana, exige para sua degradação completa a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As Endo-1,4- β -D-xilanases (1,4- β -D-xilana xilohidrolase) clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando na diminuição do grau de polimerização do substrato e as β -D-xilosidases: (β -D-xilosídeo xilohidrolase) hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora,

liberando xilose. As β -xilosidases purificadas geralmente não hidrolisam xilana, sendo a xilobiose seu melhor substrato (Moreira, 2016).

O interesse na obtenção de xilanases está relacionado às diversas possibilidades de aplicação e ao potencial biotecnológico em diversos processos industriais. Dentre essas aplicações podem-se destacar a, indústria farmacêutica (produção de xilooligossacarídeos com efeitos prebióticos), alimentação animal (melhoramento do valor nutricional de silagem, grama verde), bem como em outros setores biocatalíticos como biorremediação (tratamento de alguns resíduos industriais, agrícolas e residenciais) e a indústria de alimentos e bebidas (clarificação de sucos, panificação, fabricação de vinhos, extração de café, óleos de plantas e amido) (Gooluguri et al., 2012).

A parede celular vegetal apresenta além de celulases e hemicelulases, constituintes como pectinas e amidos, sendo necessário para a hidrólise destes a ação de enzimas específicas, tais como as amilases.

1.3.6.3 Amiloglucosidases

As amilases são constituídas por três grupos de enzimas as α -amilases também denominadas como endoamilases, as β -amilases (exoamilases) e as amiloglucosidases. O primeiro grupo é constituído pelas α amilases (endoamilases) (EC 3.2.1) que clivam preferencialmente as ligações α -1-4 em regiões internas de substratos de cadeia longa, liberando as oligodextrinas. O segundo grupo é formado pelas β -amilases (exoamilases) (EC 3.2.1.20) que hidrolisam as ligações α -1-4 de polissacarídeos da extremidade não redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando as unidades de glicose em forma de β -maltoses. As amiloglucosidases são enzimas extracelulares que rompem as ligações α -1-4 e α -1-6 do amido a partir da extremidade não redutora.

A amiloglucosidase (1,4- α -D-glicano glicohidrolase, EC 3.2.1.3) é uma enzima capaz de produzir glicose a partir do amido removendo sucessivamente unidades de glicose da extremidade não redutora das moléculas de amilose ou amilopectina do amido principalmente por hidrólise da ligação glicosídica α -1 \rightarrow 4 e α -1 \rightarrow 6. A clivagem das ligações glicosídicas dos polímeros do tecido vegetal por meio das enzimas amilolíticas, possibilita rupturas na parede celular e remoção do amido presente (Adeniran et al., 2010).

A principal aplicação da amiloglucosidase é a sacarificação do amido. O amido sacarificado é utilizado diretamente na indústria de alimentos, ou convertido em etanol de alta

qualidade para uso em perfumes ou bebidas alcoólicas e também em aplicações têxteis e farmacêuticas (Kumar e Satyanarayana, 2009).

1.3.7 Metabólitos do rizoma de gengibre

Os metabólitos são biomoléculas específicas de certos tipos de células ou organismos. As plantas vasculares contêm, além do conjunto universal, moléculas pequenas chamadas de metabólitos secundários, que exercem funções específicas para a vida da planta. Esses metabólitos incluem compostos que dão às plantas seus aromas e cores característicos, e compostos bioativos que são apreciados pelos seus efeitos fisiológicos em humanos, mas usados para outros propósitos pelas plantas (Nelson e Cox, 2014). Uma das espécies vegetais, o gengibre é uma matriz que apresenta metabólitos primários e secundários com grande aplicação na indústria de alimentos.

O gengibre é botanicamente conhecido como *Zingiber officinale* Rosc. pertencente à família Zingiberaceae. Entre as plantas medicinais do mundo, o gengibre se destaca, juntamente com cúrcuma, como uma das mais importantes ervas rizomatosas (Mesomo et al., 2013).

O rizoma é largamente utilizado em todo o mundo como especiaria / tempero na culinária, bebidas e medicamentos à base de plantas. O rizoma do gengibre é caracterizado por uma estrutura alongada, um pouco achatada, de coloração que varia do amarelo a marrom, que apresenta entre 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. A parede interna do rizoma, feixes fibrovasculares abundantes em células oleaginosas contendo oleoresina, óleo essencial e grande quantidade de grânulos de amido (Nair, 2013).

O rizoma de gengibre é constituído por óleos essenciais, oleoresinas resinas, proteínas, celuloses, pentoses, amido e elementos minerais. A composição destes compostos varia de acordo o tipo de cultivo, a região do plantio, as condições agroclimáticas, grau de maturação dos rizomas (Nair, 2013). O gengibre apresenta em sua composição cerca de 3–4% de óleo essencial, 6,5 % de oleoresinas, 53% de amido, 7,17% de fibras, 12,4% de proteínas, 6,64% cinzas total e possui alto teor de água (80-90%) (Vasala, 2012).

1.3.7.1 Óleos essenciais de gengibre

Os óleos essenciais são líquidos oleosos, hidrofóbicos, aromáticos e voláteis que podem ser extraídos das plantas. Nas plantas os óleos essenciais podem ser armazenados em glândulas específicas denominadas de tricomas, ou em grupos especializados dentro de regiões específicas da planta, como; caules, folhas, cascas, frutos, sementes, raízes e rizomas (Miguel, 2010).

Os óleos essenciais são geralmente obtidos por destilação a vapor. São misturas complexas de componentes químicos, incluindo derivados terpênicos, com propriedades aromáticas bem conhecidas e que contêm uma gama de hidrocarbonetos de terpenos oxigenados e não oxigenados (Mehdizadeh e Moghaddam, 2018).

Os óleos essenciais são compostos aromáticos de origem natural, com atividades biológicas (Asbahani et al., 2015). Os óleos essenciais têm sido explorados como aditivos aromatizantes, como medicamentos ou cosméticos (Dima e Dima, 2015), como agentes inseticidas, antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos e anticarcinogênicos (Seow et al., 2014).

Muitos óleos essenciais, exercem fortes atividades antimicrobianas e antifúngicas, sendo por essa razão empregados na indústria de alimentos (Donsi e Ferrari, 2016). Entre os mais de 3000 tipos de óleos essenciais conhecidos, pode-se citar o óleo essencial de gengibre.

O óleo essencial de gengibre apresenta como principais compostos, o zingibereno, ar-curcumeno, bisaboleno, sesquifelandreno ou terpenóides, como neral, geranial, geraniol, terpineol, nerolidol (Ali et al., 2014; Semwal et al., 2015). Os óleos essenciais de gengibre são obtidos por meio de hidrodestilação, destilação a vapor, extração por fluidos supercríticos CO₂, extração com uso de solventes orgânicos, sendo a extração enzimática uma alternativa frente aos demais devido as vantagens apontadas anteriormente no texto.

1.3.7.2 Amido de gengibre

O amido é considerado um polissacarídeo formado por centenas ou milhares de unidades de glicose. Muitos estudos abordam que o amido é a principal material de reserva das plantas (sementes, tubérculos, bulbos e rizomas), servindo como fonte de energia para nutrição humana e animal. Nas plantas, o amido encontra-se em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que o constituem: amilose (15-30%) e amilopectina (de 70-80%) (Ascheri et al. 2014).

A amilose apresenta uma estrutura linear, composta de unidades de glicose com ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina é um polímero ramificado, formado por cadeias de

glicose semelhantes à amilose, que são unidas entre si por ligações do tipo α -1,6 (Bertoft, 2018).

Os grânulos de amido de diferentes culturas têm forma e tamanhos definidos e estas características têm consideráveis influências nas propriedades dos amidos e em suas aplicações funcionais (Moorthy; Sajeev; Anish, 2018). Para estudo dos grânulos de amido a técnica de difração em raio-X (DRX) é muito aplicada, pois é uma das principais técnicas de caracterização estrutural e micro-estrutural de materiais cristalinos. A análise de difração em raio-X dispõe sobre a estrutura cristalina, definindo os tipos de amido em duas maneiras básicas tipos A, B. Porém, há um tipo C que é uma mistura dos grânulos tipos de A e B. Outras análises térmicas como espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG), termogravimetria diferencial e calorimetria diferencial de varredura (DSC) apresentam habilidades de acompanhar propriedades físicas específicas dos amidos (Neto et al., 2017).

Os amidos são empregados como matéria-prima em diversas aplicações industriais. São usados como espessantes, emulsificantes, agentes de revestimentos em alimentos e produtos farmacêuticos, e vem sendo utilizado na produção biofilmes para embalagens na indústria de alimentos.

As possibilidades de fomentar a utilização do amido de gengibre para produção de biofilmes dependem principalmente do conhecimento dos seus principais componentes químicos, propriedades térmicas, estruturais e funcionais.

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção enzimática vem sendo estudada devido à possibilidade de aplicação em diversos processos industriais como na extração de metabólitos. O desenvolvimento de bioprocessos que resultem em alta produtividade enzimática associada a baixos custos ainda é um dos principais fatores que impulsionam as pesquisas voltadas para produção destas enzimas. Especial atenção tem sido dada a aplicação de enzimas na extração de óleos essenciais, oleoresinas, pigmentos, dentre outros compostos presentes em matrizes vegetais. O estudo de aplicações de EMB na extração de metabólitos torna-se essencial para direcionar a utilização destes em processos específicos.

O resíduo proveniente do processamento de chocolate apresenta uma natureza fibrosa, o que sugere uma composição rica em compostos lignocelulósicos, é proveniente de um fruto rico em nutrientes, tem sido gerado em uma quantidade relativamente expressiva, além de não

possuir nenhum fim específico. Dessa forma, este resíduo, abundante e de baixo custo, pode-se tornar um substrato alternativo a ser utilizado em FES para produção de endoglucanases, xilanases, amiloglucosidases e outras enzimas.

A seleção de micro-organismos produtores de endoglucanases, xilanase e amiloglucosidases é também uma tarefa importante no desenvolvimento de um bioprocessamento para obtenção desta enzima. Algumas espécies do gênero *Aspergillus* têm sido indicadas como fontes destas enzimas.

Portanto, o estudo da utilização de *A. oryzae* em FES sob resíduo da casca da amêndoa de cacau pode resultar em um bioprocessamento alternativo para produção de endoglucanase, xilanase e amiloglucosidase. Adicionalmente, os estudos de otimização da aplicação dos EMB produzidos na FES para a extração de metabólitos podem revelar novos catalisadores ambientalmente e economicamente favoráveis para a produção de óleos essenciais, oleoresinas e amidos para a indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A.L. Microbial Enzymes: Tools for biotechnological process. **Biomeolecules**, 4, p.114-139, 2012. doi: 10.3390/biom4010117.
- ALEXANDER SILBERMAN, INSTITUTE OF LIFE SCIENCES. Disponível em <http://teachline.ls.huji.ac.il/72346/PlantCell/cellwall.html> Acesso em: 06/06/2018.
- ALI, G.; HOSSEINI, A.; MIRAZI, N. Memory enhancement by administration of ginger (*Zingiber officinale*) extract on morphine-induced memory impairment in male rats. **Journal of Acute Disease**, v.3, p. 212-217. doi: 10.1016/S2221-6189(14)60047-0.
- ALJAMMAS, H. A.; ALKHALAF, H.A.F.W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using soli-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, p. 213-216. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.004.
- AMORIM, G.M.; OLIVEIRA, A. C.; GUTARRA, M. L.E; GODOY, M.G.; FREIRE, D.M.G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017. doi: 10.1016/j.bcab.2017.05.009
- ANDRADE, I.V.O.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P.; DE VELOSO, C.M.; BONOMO, P. Perdas da características fermentativas e valor nutritivo da silagem de capim-elefante contendo subprodutos agrícolas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.2578–2588, 2010.
- ASBAHANI, E. I.; MILADI, K.; BADRIC, W.; SALA, M.; AITADDIBH, E.H.H.; CASABIANCA, E. A.I.M.; MOUSADIKE, E.I.; HARTMANNA, J.F.; RENAUDA, F.N.R.;

ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p.220-243, 2015. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069

ASCHERI, D.P.R.; MORAIS, C.C.; ASQUIERI, E.R.; CARVALHO, C.W.P.; ASCHERI, J.L.R. Characterization of starch extracted from the roots of *Cissus simensiana* Roem. & Schult. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, p. 787-800, 2014.

BCC RESEARCH. 2012. Global markets for enzymes in industrial applications. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/BIO030G.html>>. Acesso em 15/05/2018.

BELMESSIKH, A. et al. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377-385, 2013.

BERTOFT, E. Analyzing Starch Molecular Structure. **Starch in Food**, 2a ed. p. 97-149, 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-100868-3.00002-0

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in Analytical Chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BRITO, A.R.; REIS, N.S.; BONOMO, F.C.R.; UETANABARO, T. P. A.; ASSIS, S.A.; SILVA, P.G.E.; ÁGUIAR-OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, R.J. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-9, 2017. doi: 10.1080/10826068.2017.1365247

BROXTERMAN, S.E; SCHOLS, H.A. Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. **Carbohydrate Polymers**, 192, p. 263-272, 2018. doi: 10.1016/j.carpol.2018.03.037

BÜCKA, A; CASCIATORIB, F.P.; THOMÉOB, J.C.; TSOTSASA, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. **Procedia Engineering** 102, p.362 – 371, 2015. doi: 10.1016/j.proeng.2015.01.163

CANABARRO, N. I.; ALESSIO, C.; FOLETTTO, E. L.; KUHN, R.C.; PRIAMO, W.L.; MAZUTTI, M. A. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, 102, p.9-14, 2017. doi: 10.1016/j.renene.2016.10.026.

CASTRO, A. M.; SANTOS, A.F.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Solid-State Fermentation for the Production of Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 10, p.185-210, 2018. doi: 10.1016/B978-0-444-63990-5.00010-4.

CHANG, P.K.; BHATNAGAR, D. *Aspergillus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p.62-66, 1999. doi: 10.1006/rwfm.1999.0055.

CHANG, P.K.; HORN, B.M.; ABE, K.; GOMI, K. *Aspergillus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v.1, p.77-82, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00010-0

COSTA, J. A.V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 1, 2018, p.1–17. doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v.5, p. 29-35, 2015. doi: 10.1016/j.cofs.2015.07.003

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnonology**, 233, p.106-120, 2016. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005

FERNANDES, P. CARVALHO, F. Microbial Enzymes for the Food Industry. **Biotechnonology of microbial enzymes**, Chapter 19, p. 513-544, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4

FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D.S.; SANTANA, R.A.; FELIX, A.C.S.; ALVAREZ, L.D.G.; LIMA, E.O.; FREITAS, J.S.; VALASQUES, G. L.; FRANCO, M.; JÚNIOR, B.B.N. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, p. 1-8, 2017. doi: 10.1080/00986445.2017.1347567.

FERREIRA, A.C.R. **Indicação de Procedência Sul da Bahia- Manual de controle de qualidade do cacau do sul da Bahia**. Editora: PTCSB, p. 31, 2017.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015. 190p.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S.N. Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science and Applications**, v.8., p.45-54, 2015. doi: 10.2147%2FNSA.S64386

GHAFFARI-MOGHADDAM, M.; YEKKE-GHASEMI, Z.; KHAJEH, M.; RAKHSHANIPOUR, M.; YASIN, Y. Application of response surface methodology in enzymatic synthesis: A Review. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 40, p. 252–262, 2014.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; CHERUPALLY, M.; NIDADAVOLU, N.; MANGAMURI, L. N.; ADDEPALLY, U. Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood Kraft pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p.2369–2380, 2012.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; CHERUPALLY, M.; NIDADAVOLU, N.; MANGAMURI, L. N.; ADDEPALLY, U. Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood Kraft pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p.2369–2380, 2012.

GOMES, E.; SILVA, R.; PEREIRA, J.C.; LADINO-ORJUELA, G. Fungal Growth on Solid Substrates: A Physiological Overview. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 3, p. 31–56, 2018.

GOMI, K. *Aspergillus oryzae*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v.1, p.92-96, 2014 doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00011-2.

GORSHKOVA, T.; CHERNOVA, T.; MOKSHINA, N.; AGEEVA, M.; MIKSHINA, P. Plant 'muscles': fibers with a tertiary cell wall. *New Phytologist*. v.1, p. 66-72, 2018. doi: 10.1111/nph.14997

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, p. 899-906, 2010.

HERMAN, C.; SPREUTELS, L. TUROMZSA, N.; KONAGANO, E.M.; HAU, B. Convective drying of fermented Amazonian cocoa beans (*Theobroma cacao* var. Forasteiro). Experiments and mathematical modeling. **Food and Bioproducts Processing**, v.118, p.1-47, 2018. doi: 10.1016/j.fbp.2018.01.002.

ICHISHIMA, E. Bioscientific topics concerning *Aspergillus oryzae*, the national microorganism of Japan. **Journal Biochemical Biotechnology**. v.1, p. 42-46, 2018.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. (2016). Production of cocoa beans. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics (Vol. XLII).

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IRO5 in solid-state fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 7, p. 317-326, 2014.

JIANG, D.; ZHU, W.; WANG, Y.; SUN, C.; ZHANG, S.; YANG, J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1562-1574, 2013. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.005

JOY, I. J. Starches. **Reference Module in Food Science**, 2018, Chapter 1, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21586-2.

KALAIVANI, S.S.; VIDHYADEVI, T.; MURUGESAN, A.; BASKARALINGAM, P.; ANURADHA, C.D. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of Ni(II) ion from an aqueous solution using activated carbon prepared from *Theobroma cacao* (cocoa) shell. **Journal Desalination and Water Treatment**. v. 54, p.1629-1641, 2014. doi: 10.1080/19443994.2014.888678.

KHANAHMADI, M.; AREZI, I.; AMIRI, M.; MIRANZADEH, M. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.13, pg. 272-282, 2018. doi:10.1016/j.bcab.2018.01.005.

KIM, D. Y.; PARK, H. J.; PARK, H. H.; KIM, H. S.; KWON, I. B. Manufacturing 616 process of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. Patent US006159451A, 617 United States, 2000.

KUDAM, S.U.; ÁLVARES, C.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P. Extraction of biomolecules from seaweeds. **Seaweed Sustainability**, p.243-269, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00009-X

KUHAD, R.C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K.K.; KAUR, A.; PLETSCHKE, B.I.; KARP, M. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249-272. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.132

LATIF, S.; ANWAR, F.; HUSSAIN, A.I.; SHADI, M. Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from *Moringa oleifera* seed. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p.1012–1018, 2011. doi: 10.1002/ejlt.201000525

LESSA, O.A.; REIS, N.S.; LEITE, S.G.F.; GUTARRA, M.L.E.; SOUZA, A.O.; GUALBERTO, S. A.; OLIVEIRA, J.R.; AGUIAR, O.E.; FRANCO, M. Effect of the solid-state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Food science and biotechnology**, 27, p.1-8, 2017. doi: 10.1007/s10068-017-0196-x

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, 2012. doi: 10.5936/csbj.201209017

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, J.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 42, 3-40, 1998.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, J.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42, 3-40, 1998.

MANCINI, G.; PAPIRIO, S.; LENS, P.N.; ESPOSITO, G. Effect of N-methylmorpholine-N-oxide Pretreatment on Biogas Production from Rice Straw, Cocoa Shell, and Hazelnut Skin. **Environmental Engineering Science**, v.33, 2016. doi: 10.1089/ees.2016.0138.

MARQUES, G.L.; REIS, N.S.; SILVS, T. P.; FERREIRA, M.L.O.; AGUIAR, E.O.; OLIVEIRA, J.R.; FRANCO, M. Production and characterisation of xylanase and endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of rice husk residue. **Waste Biomass Valor**, p.1-9, 2017. doi: 10.1007/s12649-017-9994-x

MATASSINI, C.; PARMEGGIANI, C.; CARDONA, F.; GOT, A. Are enzymes sensitive to the multivalent effect? Emerging evidence with glycosidases. *Tetrahedron Letters*, v. 57, p.5407-5415, 2016. doi: 10.1016/j.tetlet.2016.10.080

MENDES, F.A.T.; LIMA, E.L. **Perfil agroindustrial do processamento de amêndoas de cacau em pequena no Estado do Pará**. Série Perfis Empresariais. Belém, PA: SEBRAE/PA, 2007.

MESOMO, M.C.; CORAZZAA, M.L.; NDIAYEA, P.O.; DALLA, S.; CARDOZO, L.; SCHEERA, L. C. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44-49, 2013. doi:10.1016/j.supflu.2013.03.031

MOORTHY, S.N.; SAJEEV, M.S.; ANISH, R. Functionality of Tuber Starches. *Starch Food*, (2° Ed), Chapter 11, p. 421-508. doi: 10.1016/B978-0-08-100868-3.00011-1

MOREIRA, L. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied microbiology and biotechnology**, 100, p.5205-5214, 2016.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound. **Enzyme and Microbial Technology**, 108, 11-20, 2018.

NAIR, K.P.P. The agronomy and economy of ginger. **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger**, Chapter 15, p.225-292, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-394801-4.00015-6.

NELSON, DAVID L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OKIYAMA D.C.G.; NAVARRO S.L.B.; RODRIGUES C.E.C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Food Science and Technology**. v. 63, p. 103-112, 2017. doi: 10.1016/j.tifs.2017.03.007

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, 74, 10–36, 2015.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, p.81–84, 2003.

PARAMJEET, S.; MANASA, P.; KORRAPATI, N. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.14.p.57-71, 2018. doi: 10.1016/j.bcab.2018.02.007

PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química: maximizando a obtenção de resultados**. São Paulo: EdUFSCar, 2015. 88p.

PIROTA, R. D. P. B., TONELOTTO, M., DELABONA, P. S., FONSECA, R. F., PAIXÃO, D. A. A., BALEEIRO, F. C. F., BERTUCCI NETO, V., FARINAS, C. S. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 21-31, 2016.

PRADE, R. A.; ZHANG, D-F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and lantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.361-391, 1999.

QUIROZ-REYES, C. N.; FOGLIANO, V. Design cocoa processing towards healthy cocoa products: The role of phenolics and melanoidins. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p.480-490, 2018. doi: 10.1016/j.jff.2018.04.031.

RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; CARVALHO, J.C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D.E. Kinetics of the Solid-State Fermentation Process. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 57-82 2018. doi: 10.1016/B978-0-444-63990-5.00004-9

SANHOUN, M., KRIAA, M., ELGHARBI, F. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid-state fermentation: optimization of culture conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 75, p.1–8, 2015.

SANTOS, T. C. dos.; FILHO, G. A.; BRITO, A. R.; PIRES, A.J.V.; BONOMO, R.C.F.; FRANO, M. Produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. Durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.29, p.222-233, 2016. doi: 10.1590/1983-21252016v29n126rc.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; MACHADO, F. D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; FRANCO, M. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2013.

SEGUNDO, G. S.; GOULART, L.A.; JÚNIOR, M.F.S.; UETANABARO, A. P.T. O cacau da região sul da Bahia e a perspectiva histórica de uma indicação geográfica. **Caderno de Prospecção**, v. 7, n. 4, p. 632-639, 2014. doi: 10.9771/S.CPROSP.2014.007.064.

SEMWAL, R.B.; SEMWAL, D.K.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A.M. Gingerols and shagaols: Important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, 117, p. 554-568, 2015. doi:10.1016/j.phytochem.2015.07.012.

SEOW, A.; WANG, M.C. International dietary guidelines. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2014. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02961-5

SERVENT, A.; BOULANGER, R.; DAVRIEUX, F.; PINOT, M.; TARDAN, E.; FORESTIER-CHIRON, N.; HUE, C. Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentations. **Food Research International**, v. 107, p. 675-682, 2018. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.070

SERVENT, A.; BOULANGER, R.; DAVRIEUX, F.; PINOT, M.; TARDAN, E.; FORESTIER-CHIRON, N.; HUE, C. Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentations. *Food Research International*, v.107, p. 675-682, 2018.

SILVA, T. P.; SOUZA, L.O.; REIS, N.S.; ASSIS, S. A.; FERREIRA, M.L.O.; OLIVEIRA, J.R.; FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p.745-756, 2017.

SILVEIRA, P.T.S; MELO, L.J.P.; SOUZA, L.S; BISPO, E.S.; SOARES, S.E. Protease prospecion and determination of its isoenzymes activity in cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.). **Food Science Technology**, v.37, n.3, p. 369-377, 2017.

SINGHANIAA, R.R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p.13-18, 2009. doi:10.1016/j.bej.2008.10.019.

SOUZA, P.A.; MOREIRA, L.F.; DIÓGENES, H.A.; SARMENTO, F.M.D. Cacao – *Theobroma cacao*. **Exotic Fruits**, p. 69–76, 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-803138-4.00010-1

SREEDHARAN S, PRAKASAN P, SASIDHARAN S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition Food Science**, v.6, p.441, 2016. doi: 10.4172/2155-9600.1000461

SRIVASTAVA, N, SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P.K. GUPTA, V. K.; MOLINAF, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.: RAMTEKE, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2018. doi: 10.1016/j.rser.2017.08.074

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRAB, P.K.; GUPTAD, V. K.; MOLINAF, G.; RODRIGUES-COUTOG, S.; MANIKANTAB, A. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018. doi: 10.1016/j.rser.2017.08.074

STAMBUK, P.; TOMASKOVIC, D.; TOMAZ, I.; MASLOV, L.; STUPIC, D.; KONTIC, J.K. Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics. **Biotechnonology**, v.6, p. 224, 2016. doi: 10.1007/s13205-016-0537-0

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International journal of Science and Nature**, v.3, p.480-486, 2012. doi: 10.12691/ajmr-2-5-3

TAVARES, E.Q.P; BUCKERIDGE, M.S. Do plant cell walls have a code? **Plant Science**, v. 241, p. 286-294. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.10.016

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.81, p. 146-161, 2013. doi: 10.1016/j.bej.2013.10.013

VANDENBERGHE, L.P.S.; KARP, S.G.; OLIVEIRA, P.Z.; CARVALHO, J.C.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Solid-State Fermentation for the Production of Organic Acids. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 18, p. 415-434, 2018. doi: 10.1016/j.biori.2017.01.002

VANDENBERGUE, J. P. S.; CARVALHO, J.C.; LIBARDI, N.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Microbial Enzyme Factories: Current Trends in Production Processes and Commercial Aspects. **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**, chapter 1, p.1-22, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802392-1.00001-0

VASALA, P.A. Ginger. **Handbook of Herbs and Spices**, v.1, p. 319-335, 2012. doi: 10.1533/9780857095671.319

VRIESMANN, L.C., AMBONI, R.D.M.C., PETKOWICZ, C.L.O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, n. 4, p. 12301236, 2011.

WANG, L.; LIU, Y.; CHEN, Z. Advances in Porous Characteristics of the Solid Matrix in Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 2, p.19-29, 2018. doi:10.1016/B978-0-444-63990-5.00002-5

ZHANG, J.; CHOI, Y.; YOO, C.G. Cellulose–Hemicellulose and Cellulose–Lignin Interactions during. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 3, p. 293–301, 2015. doi: 10.1021/sc500664h

CAPÍTULO II

CASCA DA AMÊNDOA DE CACAU COMO SUPORTE SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASES, XILANASES E AMILOGLUCOSIDASES POR *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Nadabe dos Santos Reis¹, Aila Riany de Brito¹, Polyany Cabral Oliveira¹, Ozana Almeida Lessa², Clissiane Soares Viana Pacheco³, Norma Eliane Pereira⁴, Glêydison Amarante Soares⁵, Erik Galvão Paranhos Silva⁵, Julieta Rangel Oliveira⁵, Marcelo Franco^{5*}

¹ Centro de Formação em Tecnociências e Inovação, Universidade Federal do Sul da Bahia, Itabuna-BA.

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA.

³ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ

⁴ Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA.

Artigo submetido a Brazilian Journal of Chemical Engineering em 08-04-2019.

COCOA SHELL AS A SUBSTRATE FOR OBTAINING ENDOGLUCANASE, XYLANASE AND AMYLOGLYCOSIDASES BY *Aspergillus oryzae* ATCC 10124

Nadabe dos Santos Reis¹, Ozana Almeida Lessa², Clissiane Soares Viana Pacheco³, Norma Eliane Pereira⁴, Glêydison Amarante Soares⁵, Erik Galvão Paranhos Silva⁵, Julieta Rangel Oliveira⁵, Marcelo Franco^{5*}

¹Post-Graduation Program in Food Engineering, Department of Exact and Natural Sciences, State University of Southwest Bahia (UESB), 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil.

²Post-Graduation Program in Chemical and Biochemical Process Technology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil.

³Institute of Chemistry, Federal University of Bahia (UFBA), 40.170-115, Salvador, Bahia, Brazil.

⁴Departamento de Agrarian and Environmental Sciences, State University of Santa Cruz (UESC), 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil.

⁵Department of Exact Sciences and Technological, State University of Santa Cruz (UESC), 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of cocoa shell as an alternative substrate for the production of endoglucanase and xylanase by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 in solid-state fermentation. The fermentation assays were performed using the cocoa shell humidified with distilled water. The parameters incubation temperature, water activity and fermentation time were optimized using the Box-Behnken design. The maximum activities achieved for endoglucanases and xylanases were 0.846 U. g⁻¹ and 0.945 U. g⁻¹ under conditions 35 °C for the temperature, water activity equal to 0.9 and 96 h the incubation time. While the maximal amyloglycosidase activity of 0.280 IU / g was obtained under the temperature conditions of 35 °C, 0.85 and fermentation time of 96 hours.

Keywords: waste, solid-state fermentation, Box-Behnken planning.

* Author for correspondence. E-mail: marcelofranco@globo.com

INTRODUCTION

Enzymes are used in industrial processes due to their efficient catalytic performance, among them, the food industry uses in the clarification of beverages (Sharma, 2017), pharmaceutical industry in the production of chiral therapeutic drugs (Li, Wang & Reetz, 2018), textile industry in the process of bleaching the parts or in the biopreparation which is the phase of removal of non-cellulosic impurities (Easson et al., 2018).

The solid-state fermentation technique (SSF) uses agro industrial residues as a source of nutrients for the growth of filamentous fungi and secretion of enzymes (Soccol et al., 2017). The application of these residues occurs due to its composition of lignin (10% to 30%), hemicellulose (15% to 35%) and cellulose (30% to 50%), being the concentration of each of these elements variable according to the type of residue (Santos et al., 2013).

For the production of enzymes, several substrates were used; cane bagasse (Biz et al., 2017), caja bran (Ferraz et al., 2018), wheat bran (Zhao, Guo & Zhu, 2017), corn cobs (Shi, Zhang, Lu & Wang, 2017), rice husk bran (Marques et al., 2017), beet peel (Joana et al., 2018), banana peel (Krishna et al., 2012), potato peel (Santos et al., 2012), forage palm bran (Ferreira et al., 2017). In Brazilian agriculture, many crops are considered waste generators. Among these, cocoa may be included. Cocoa is a much-appreciated fruit and valued for its sweet, slightly acid taste. After fermentation and drying, the almonds are toasted and the shell that surrounds them are easily peeled (Lessa et al., 2017). The chocolate industries produce high amounts of cocoa shell. It is estimated that chocolate processing produces about 54% of its weight of residues, which have no specific destination and are, in most cases, incinerated or discarded in nature (Okiyama et al., 2017). Our research group used cocoa shell in the production of lipases (Silva et al., 2017) in the extraction of bioactive compounds and fatty acids (Lessa et al., 2017). Other researchers used cocoa shell for the production of activated

carbon (Kalaivani et al., 2014), biogas production (Mancini et al., 2016) and enrichment of animal feed (Amorim et al., 2017).

The cocoa shell contains high levels of lignin (30.7%), cellulose (9.7%) and hemicellulose (15.4%) (Silva et al., 2017; Lessa et al., 2018), which can be used in the SSF for the production of enzymes, among which cellulases can be mentioned.

Cellulases are enzymes that act synergistically in the hydrolysis of cellulose to generate monomeric units. Endoglucanases, or Endo-1,4- β -glucanase (EG) cleave intramolecular β -1,4-glucosidic bonds in the amorphous regions of the cellulose fiber and produce new chain ends and larger oligosaccharides (Santos et al., 2016).

The xylanase enzymes constitute the xylanolytic system and play the main role in the depolymerization of xylan present in the plant cell wall; xylanolytic activity consists of the synergy between the endoxylanases (β -1,4-D-xylanaxylanohydrolase, EC 3.2.1.8) and the β -xylosidases (β -D-xyloside xylohydrolase, EC 3.2.1.37) (Santos et al., 2011). The degradation of hemicellulose occurs through xylanolytic action (Sousa et al., 2018). The amylolytic enzymes are responsible for catalyzing the α -1-4 glycosidic bonds of polysaccharides, among which the amyloglycosidases can be mentioned. Amyloglycosidases are extracellular enzymes that break the α -1-4 and α -1-6 bonds of the starch from the non-reducing end (De Santana et al., 2012).

The cellulases, xylanases and amyloglycosidases can be produced by various types of microorganisms, such as filamentous fungi (Martínez-Ruiz et al., 2018), bacteria (Cerdeira et al., 2018) and actinomycetes (Taniguchi et al., 2014). These microorganisms are used to utilize lignocellulosic residues, feed on the present nutrients and secrete metabolites, among them, the enzymes (Pathak et al., 2014). Thus, the objective of the present work was to evaluate the use of the cocoa shell as substrate and *Aspergillus oryzae* as fermentation agent. The response

surface methodology (MSR) was applied as a statistical tool for it allows predicting the best condition of each variable and the effects of interaction between the independent variables.

MATERIALS AND METHODS

COLLECTION AND PREPARATION OF THE RESIDUE

Samples of the cocoa shell were supplied by a chocolate factory located in the city of Ilhéus (Bahia, Brazil). The residue of the cocoa shell was ground in a Willye type mill to a particle size of 2 mm.

OBTAINING AND CULTIVATING THE MICROORGANISM

The *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 was obtained from the collection of microorganisms of the National Institute of Quality Control in Health (INCQS) of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brazil) under registration number 01771. This fungus was preserved in silica and glycerol medium at 80°C in ultra-freezer. The strains were harvested in agar-dextrose-potato (PDA) culture medium in Petri dishes, previously sterilized in vertical autoclave at 121°C for 15 minutes. The inoculated plates were incubated in a BOD germination chamber at a controlled temperature of 25 ° C for 7 days or until abundant sporulation (observed visibly due to colony green coloration) and then stored at 4 ° C for later use.

PREPARATION OF THE INOCULUM

Preparation of the spore suspension was carried out using the microorganism cultured in PDA medium for 7 days at 25 ° C. After the incubation period, the sporulated culture was scraped with glass beads and suspended in Tween 80 (0.01%, v / v) solution, both sterilized in a vertical autoclave at 121 ° C for 15 minutes. The suspension was collected in an Erlenmeyer

flask and a 0.1 ml aliquot was taken and diluted in a test tube to count the number of spores in a binocular microscope using the Neubauer chamber.

SOLID STATE FERMENTATION

The fermentations were carried out in an incubator environment using 125 mL Erlenmeyer flasks as a bioreactor and the shell of the cocoa as substrate. Each flask containing 10 g of residue was sterilized in a vertical autoclave at 121 °C for 15 minutes. The material was then placed in a biological safety cabinet under ultraviolet light until it cooled. The amount of 10^8 spores per gram of substrate and sterilized distilled water was added to the medium until desired moisture was reached. In order to evaluate the influence of the independent variables of water activity, incubation temperature (°C) and fermentation time (h) on the production of endoglucanase and xylanase, the Box-Behnken design was applied (table 1). For this planning a matrix with the description of 15 experiments was used, three of them being the triplicate of the central point to estimate the experimental error, to analyze the quadratic, linear effects and interactions among the variables to fit a second order model with quadratic terms. The activities of endoglucanases (UI g^{-1}) and xylanases (UI g^{-1}) were applied as response values and the water activity factors (A_w) incubation temperature (°C) and fermentation time (h), were analyzed as independent variables.

ENZYMATIC EXTRACTION

After the fermentation step, 5 mL of distilled water was added to the fermented media for each 1 g of residue. The blends were maintained in an orbital shaker incubator (Shaker) for 20 minutes at 170 rpm and 35°C. The entire contents of each flask were pressed through the gauze to separate the solid from the enzyme extract, and the filtrate was collected

in Falcon tube and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The enzymatic assays were performed using the supernatant, which was called the crude multienzyme extract (CME).

DETERMINATION OF XYLANASE ACTIVITY

Enzyme activity assays were conducted based on standard procedures recommended by IUPAC (Ghose and Bisaria, 1987). The activity of xylanase was determined by the amount of reducing sugars released from the incubation of 1 mL of beechwood xylan (Sigma®) at the concentration of 1% (w / v) in sodium citrate buffer (0.05 M, pH 4.8) with 1 mL of the crude enzyme extract (previously diluted) in a water bath at 50° C for 10 minutes. To control the reaction, 1 mL of sodium citrate buffer was incubated with 1 mL of the crude enzyme extract, while the reaction blank consisted of 1 mL of sodium citrate buffer and 1 mL of the xylan solution. After the incubation period, the reducing sugars were dosed based on the method of Miller (1959), adding 2 mL of 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) to the reaction media followed by incubation in boiling water for 5 minutes and subsequent cooling in running tap water. After dilution with 6 mL of distilled water, the absorbance of the samples was read in a spectrophotometer at 540 nm and the amount of reducing sugar released was quantified using xylose as standard (1 to 10 $\mu\text{mol} / \text{mL}$). An international unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 μmol of reducing sugars per minute at 50 ° C. The results of these analyzes were expressed in international units per gram of substrate (UI g^{-1}).

DETERMINATION OF ENDOGLUCANASE ACTIVITY

Enzyme activity assays were conducted based on standard procedures recommended by IUPAC (Ghose and Bisaria, 1987). The endoglucanase activity was determined by the amount of reducing sugars released from the incubation of 0.1 mL of carboxymethylcellulose

(CMC) at the concentration of 1% (w / v), with 0.5 mL of the crude enzyme extract in a water bath at 50 ° C for 15 minutes. To control the reaction, 0.1 mL and sodium acetate buffer were incubated with 0.5 mL crude (previously diluted) enzyme extract. After the incubation period, the reducing sugars were dosed based on the method of Miller (1959), adding 0.2 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) to the reaction media, followed by incubation in boiling water for 5 minutes and subsequent cooling. After dilution with 6 mL of distilled water, the absorbance of the samples was read in a spectrophotometer at wavelength at 540 nm and the amount of reducing sugar released was quantified using standard glucose curve. An international unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 μmol of reducing sugars per minute at 50 ° C. The results of these analyzes were expressed in international units per gram of substrate (UI g^{-1}).

DETERMINATION OF AMYLOGLYCOSIDASE ACTIVITY

The amyloglycosidase was quantified by the addition of 1 ml of solution containing 1% soluble starch (Sigma-Aldrich) in 0.5M phosphate buffer and pH 7.0 (Vetec) and 1.0 ml BEM in test tubes and these were incubated for 30 minutes at 37 ° C in orbital shaker incubator (Quimis). The reducing sugars produced in that incubation were quantified by the Miller (1959) technique. The enzymatic unit corresponding to the quantification of enzyme capable of releasing 0.1mg / mL of reducing sugars under the conditions of the proposed method.

MICROMORPHOLOGICAL ANALYSIS

Scanning electron microscopy analysis was performed at the Electronic Microscopy Center (CME) of the State University of Santa Cruz (UESC-Bahia) using a scanning electron microscope QUANTA 250, FEI COMPANYYE. Cocoa shell, fermented cocoa shell and *Aspergillus oryzae* colonies were fixed on "STUB" stands. The readings were performed in an ambient mode that is used to investigate samples incompatible with high vacuum and therefore impossible to be analyzed by other traditional methods of scanning electron microscopy. Electromicrographs were performed using magnification of 1000 x and 3000 x.

STATISTICAL ANALYZES

The statistical significance level of the generated model was evaluated by analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$), the regression coefficients were evaluated from the standardized effects (based on Student's t-test, $p < 0.05$) and the quality of the model evaluated by the coefficient of determination (R^2), adjusted coefficient of determination (R^2 -adj) and lack of fit test. Statistica version 10 software (STATSOFT) was used for data analysis and graphing.

RESULTS AND DISCUSSION

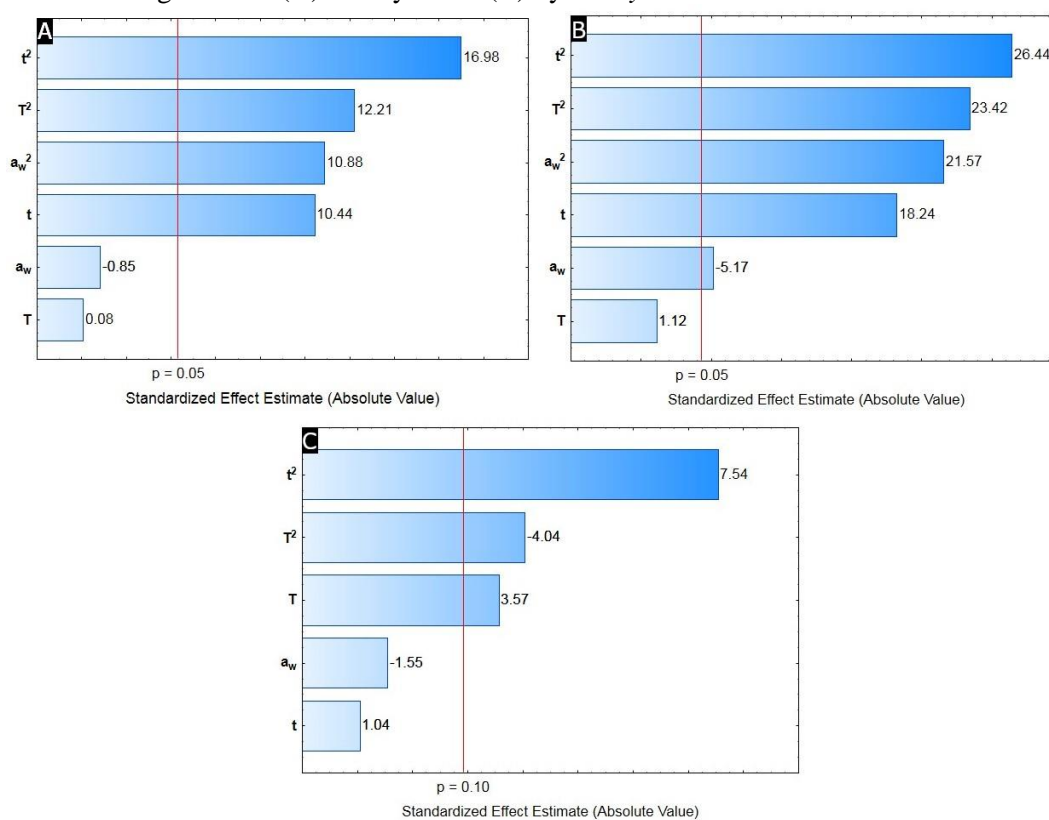
The matrix of the experimental design and the corresponding results of the enzymatic activities ($U \cdot g^{-1}$) were shown in Table 1. The solid state fermentation performed by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 using residue of cocoa shell and water as the culture medium resulted in the production of a crude enzymatic extract with significant activities of endoglucanases, xylanases and amyloglycosidases. According to Gomi (2014), *Aspergillus oryzae* develops in a solid matrix with A_w greater than 0.8 under different temperature conditions (between 32 and 36°C).

Table 1: Box-Behnken type matrix for the description of the time factors (T_1 , h), temperature (T_2 , °C) and water activity (T_3) and on the activity of endoglucanase, xylanase and amyloglycosidase produced by *A. oryzae* ATCC 10124 cultivated in the shell of the almond of cocoa.

Assay	Variables			Enzymatic activity ($U\ g^{-1}$)		
	T_1 (h)	T_2 (°C)	T_3	Endoglucanase	Xylanase	Amyloglycosidase
1	-1(48)	-1(25)	0(0.90)	0.175	0.289	0.065
2	1(144)	-1(25)	0(0.90)	0.420	0.505	0.076
3	-1(48)	1(45)	0(0.90)	0.134	0.198	0.059
4	1(144)	1(45)	0(0.90)	0.390	0.460	0.082
5	-1(48)	0(35)	-1(0.85)	0.126	0.231	0.061
6	1(144)	0(35)	-1(0.85)	0.467	0.571	0.072
7	-1(48)	0(35)	1(0.95)	0.198	0.213	0.049
8	1(144)	0(35)	1(0.95)	0.429	0.521	0.081
9	0(96)	-1(25)	-1(0.85)	0.453	0.561	0.210
10	0(96)	1(45)	-1(0.85)	0.398	0.401	0.291
11	0(96)	-1(35)	1(0.95)	0.298	0.173	0.104
12	0(96)	1(45)	1(0.95)	0.432	0.538	0.286
13	0(96)	0(35)	0(0.90)	0.823	0.910	0.143
14	0(96)	0(35)	0(0.90)	0.801	0.953	0.120
15	0(96)	0(35)	0(0.90)	0.872	0.925	0.091

The data available in Table 1 were submitted to regression analysis for the construction of a mathematical prediction model. The statistical significance of the quadratic, linear and interaction terms (linear x linear) was plotted as a Pareto plot. From the Pareto graphs (Figure 1) it is possible to note that when admitted to a 95% confidence level the relations between the variables are represented and demonstrated through the vertical line drawn.

Figure 1 - Pareto chart showing the significance of the terms of the variables: time of fermentation (t), water activity (A_w) and incubation temperature (T), in the model adjusted for production of endoglucanase (A) and xylanase (B) by *A. oryzae* ATCC 10124.



The results demonstrated that the quadratic terms had a significant effect, indicating the influence of the variables investigated in the production of each enzyme, being the time the independent variable of greater influence in the enzymatic production.

Using the Pareto graphs, it was possible to observe that the models presented non-significant terms, and the regression coefficients were removed for each non-significant term observed, and new reduced models were constructed by regression analysis and submitted to ANOVA ($p < 0.05$) for endoglucanase and xylanase (Table 2).

According to Ferraz et al., (2018) from the analysis of the ANOVA one can affirm the significance of the parameters through the evaluation of the p-value, or descriptive level of test. At the 95% confidence level, a p-value for the regression less than 0.05 suggests that the model is statistically significant. The quality of the models can be verified through the coefficient of determination (R^2) and the significance of the lack of fit. The value of R^2 is

interpreted as the ratio of total variation of the dependent variable (enzymatic activities) that is explained by the variation of the independent variables (temperature, Aw and time) (Santos et al., 2017).

For the models described in Table 2, R² values for endoglucanase (0.9739), xylanase (0.9045) and amyloglycosidase (0.8408), indicated that the models fitted well to the experimental results. In mathematical models adjusted for the endoglucanase and xylanase enzymes, with R² 0.9739 and 0.9045 respectively, it means that 97.39% and 90.45% of the activity responses of these enzymes were explained by the adopted model. As far as amyloglycosidase is concerned, it can be stated that 84.08% of the variability responses of this enzyme was justified by the mathematical model.

Table 2 – ANOVA for the adjusted reduced model

Source	SS	DF	MS	F	p-value
Endoglucanase					
Regression	0.78724	6	0.13121	49,81	<0.0001
Residue	0.02107	8	0.00263		
Lack of fit	0.01843	6	0.00307	2.33	0.3309
Pure error	0.00264	2	0.00132		
Total	0.80831	14			
R ²	0.9739				
Xylanase					
Regressão	0.88024	6	0.14671	12.62	0.011
Resíduo	0.09298	8	0.01162		
Lack of fit	0.09203	6	0.01534	32.20	0.0304
Pure error	0.00095	2	0.00048		
Total	0.97322	14			
R ²	0.9045				
Amyloglycosidase					
Regression	0.07482	6	0.01247	7.04	0.0073
Residue	0.01417	8	0.00177		
Lack of fit	0.01281	6	0.00214	3.14	0.2609
Pue error	0.00136	2	0.00068		
Total	0.08899	14			
R ²	0.8408				

DF, degree of freedom; SQ, sum of squares; MS, mean square; F, Fisher's test; P, probability.

According to Ferraz et al., (2018) from the analysis of the ANOVA one can affirm the significance of the parameters through the evaluation of the p-value, or descriptive level of test. At the 95% confidence level, a p-value for the regression less than 0.05 suggests that the

model is statistically significant. The quality of the models can be verified through the coefficient of determination (R^2) and the significance of the lack of fit. The value of R^2 is interpreted as the ratio of total variation of the dependent variable (enzymatic activities) that is explained by the variation of the independent variables (temperature, Awe time) (Santos et al., 2017).

For the models described in Table 2, R^2 values for endoglucanase (0.9739), xylanase (0.9045) and amyloglycosidase (0.8408), indicated that the models fitted well to the experimental results. In mathematical models adjusted for the endoglucanase and xylanase enzymes, with R^2 0.9739 and 0.9045 respectively, it means that 97.39% and 90.45% of the activity responses of these enzymes were explained by the adopted model. As far as amyloglycosidase is concerned, it can be stated that 84.08% of the variability responses of this enzyme was justified by the mathematical model.

The values of lack of fit were insignificant for the endoglucanase and amyloglycosidase models ($p = 0.3309$ and $p = 0.2609$, respectively), but in the mathematical model adjusted for xylanase production it can be observed that the lack of fit was significant ($p = 0.0304$). The lack of adjustment observed at first would render mathematical models invalid for prediction. However, Coutinho et al. (2015) stated that these values can be treated as "false positives", when very low variations are observed in the central point of the study variables, resulting in a small "pure error" value.

The model adopted for xylanase was considered valid, since similar conditions have already been described in the literature, where mathematical models for optimization were used even with a lack of significant adjustment (Ballus et al., 2011).

Equations 1-3 express the second-order quadratic reduced models constructed for endoglucanase, xylanase and amyloglycosidase.

$$EG = 0,832 + 0,134X - 0,321 X^2 - 0,231Y^2 - 0,205 Z^2 \quad \text{Eq. 1}$$

$$XS = 0,929 + 0,140X - 0,300X^2 - 0,266Y^2 - 0,039Z - 0,245Z^2 \quad \text{Eq. 2}$$

$$AG = 0,118 - 0,102X^2 + 0,033Y + 0,055Y^2 + 0,050 Z^2 \quad \text{Eq. 3}$$

Where (EG) represents the endoglucanase activity and (XS) xylanase activity . The independent variables temperatura, T (Z), water activity, Aw (Y) and time, t (X) are in coded values, respectively.

The graphics of response surfaces and contour arranged in Figures 2, 3 e 4 of each model adopted enable illustration of the effects of the variables and their interactions.

Figure 2 - Response and contour surface graphs constructed based on the model representing the interactions between the variables: water activity and fermentation time, with endoglucanase activity as a response.

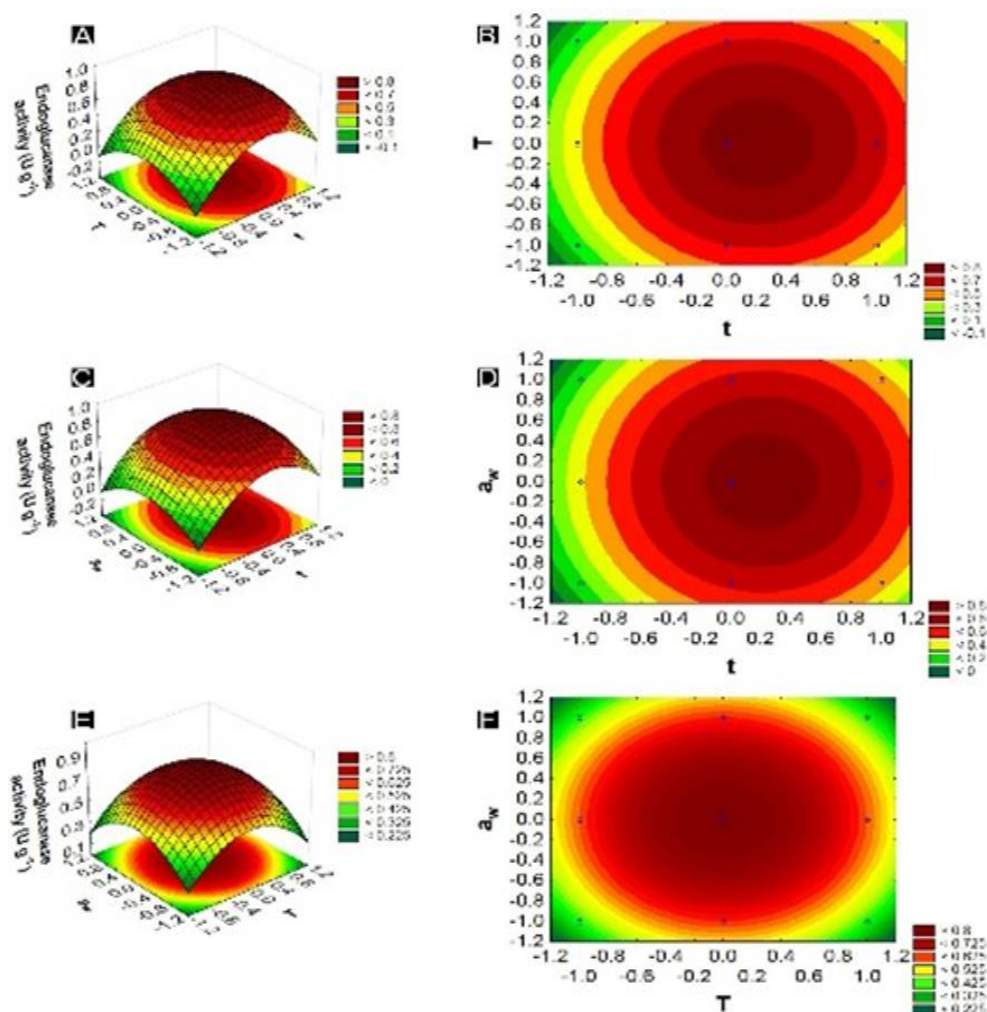


Figure 3 - Response and contour surface graphs constructed based on the EG model representing the interactions between the variables: incubation temperature, water activity and fermentation time, with xylanase activity as a response

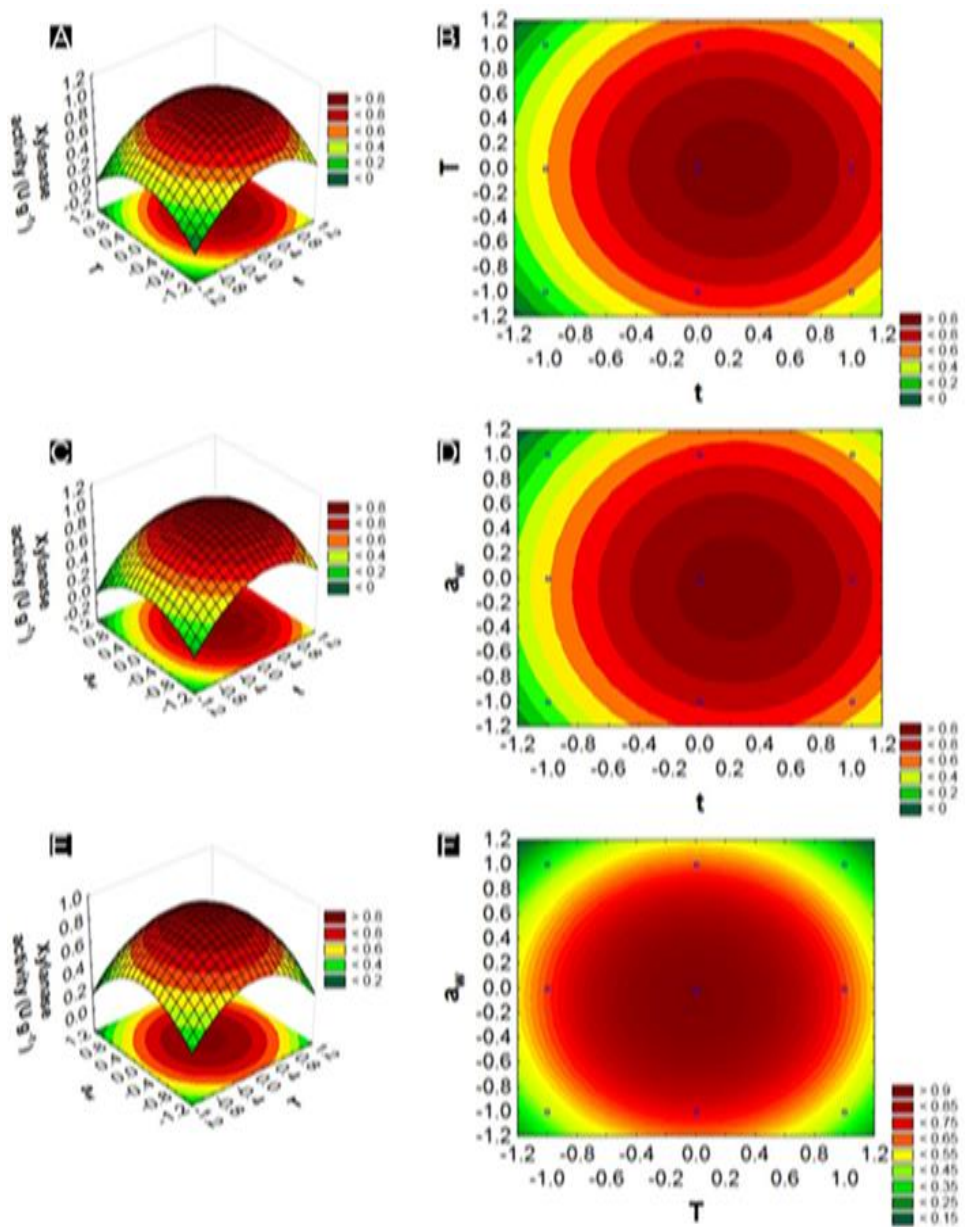
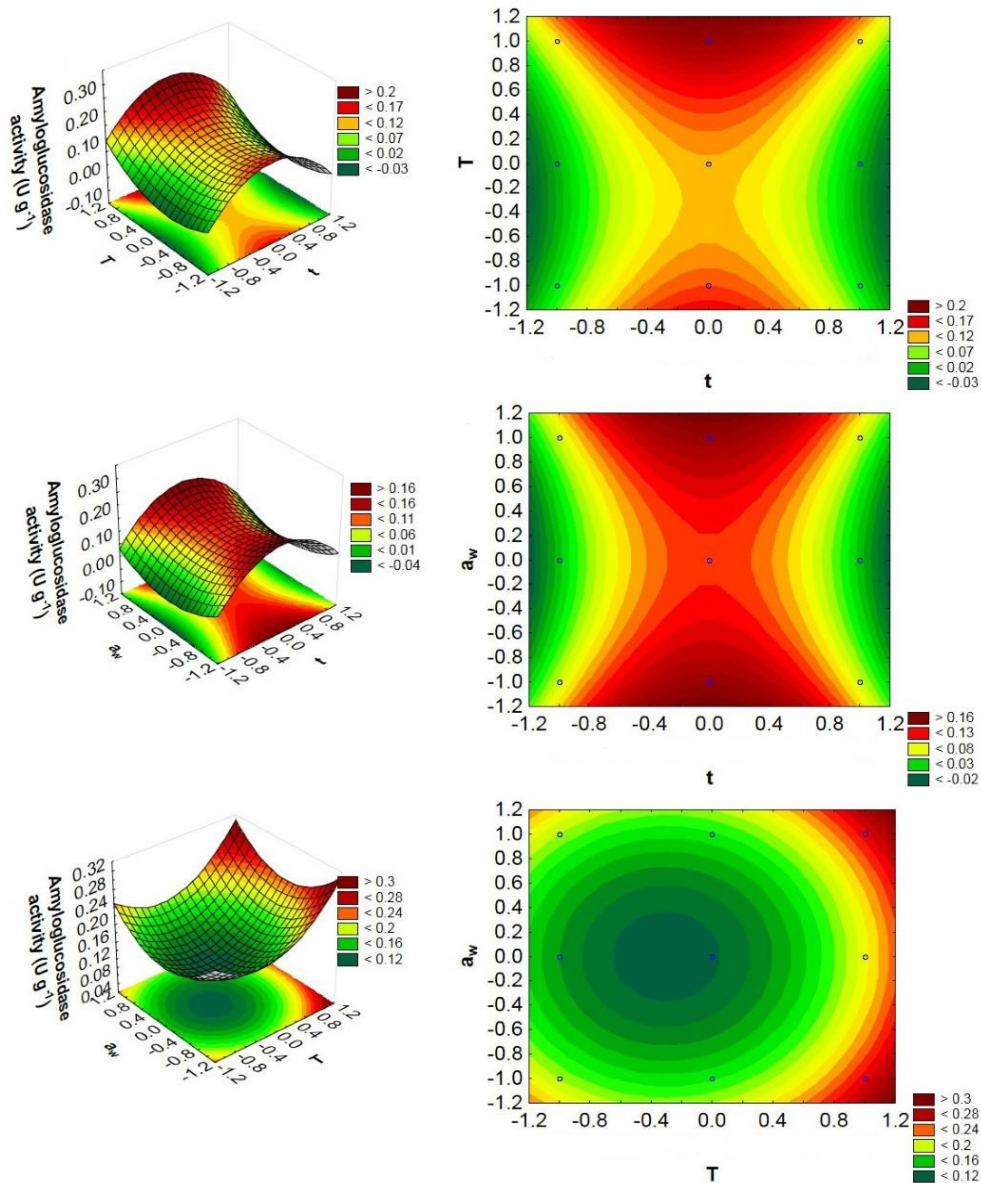


Figure 4 - Response and contour surface graphs constructed based on the AG model representing the interactions between the variables: incubation temperature, water activity and fermentation time, with amyloglycosidase activity as a response



The graphics of response surfaces and contour arranged in Figures 3, 4 and 5 of each model adopted enable illustration of the effects of the variables and their interactions. The response surface graphs of endoglucanase, xylanase and amyloglycosidase indicated that the variable time of fermentation was the independent variable with the greatest influence. In the study of optimization of the fermentation time for enzymatic production, it can be observed that for the endoglucanases, xylanases and amyloglycosidases a period of 96 hours in the

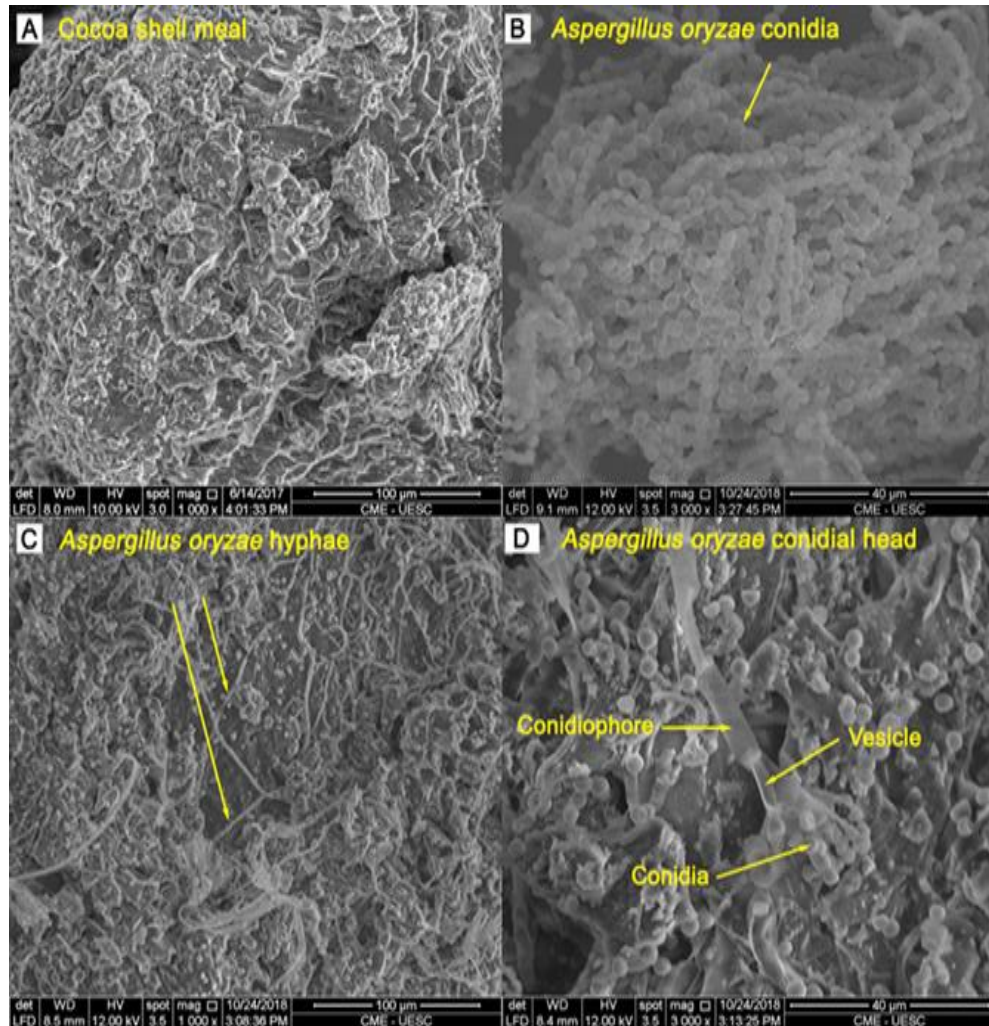
fermentative process made possible a better enzymatic synthesis (greater production), being identified after this time a decrease in the activities of these enzymes.

Reis et al., (2018) using *Aspergillus niger* fungus ATCC 1004 under SSF in forage palm bran found a maximum xylanase production at the 96 hour ($35.23 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) fermentation time and endoglucanase time of 72 hours ($3.35 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Silva et al. (2018) using *Botrytis ricini* sob SSF in sugarcane bagasse observed the highest enzymatic production ($1289.83 \text{ U} / \text{mL}$) in 144 hours of fermentation. Ferraz et al., (2018) employing *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in the SSF process in caja peels recorded a xylanolytic activity value equal to 14 IU g^{-1} in 120 hours. Brito et al., (2017) using *Aspergillus oryzae* as a fermentation agent in rice peels and peanut peels obtained 141.5 hours the highest production of endoglucanase in rice peels (17.7 U/g) peanut peels in 196 hours the activity value equal to 41.8 U/g .

Santos et al. (2016) affirm that the fermentation time is a significant variable, for the beginning of the fermentative process the solid matrix presents a great amount of nutrients that is being reduced as the fungus develops, promoting nutrient depletion, and consequently the decrease in the production of enzymes.

By means of the micromorphological analysis (Figure 5) it can be observed how *Aspergillus oryzae* developed under the shell of the cocoa shell during the fermentation time of 96 hours.

Figure 5- Electromicrographs of the growth of *Aspergillus oryzae* under the cocoa shell: A) Cocoa shell meal; B) *Aspergillus oryzae* conidia; C) *Aspergillus oryzae* hyphae; D) *Aspergillus oryzae* conidial head



The electromicrographs (fig.5.A) show the cocoa shell meal (substrate), the colonies of *Aspergillus oryzae* which was the bioconversion agent (fig.5.B) and the growth of *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 under bran of the cocoa shell (fig.5.C). Species belonging to the genus *Aspergillus* typically produce "aspegillum" or "conidial head", as seen in electromicrography (fig.5.D), have a stem that ends in a rounded vesicle containing one or two layers of specialized cells and metastasis), demonstrating that *Aspergillus oryzae* grew under the analyzed solid matrix, during the fermentation time statistically indicated as ideal for the

development, and it can be affirmed that possibly during the fermentation process the filamentous fungus excreted the enzymes quantified in the study.

Temperature is another independent variable to be considered in the fermentation process. In this study the temperature indicated as the best for the production of endoglucanase and xylanase was around the maximum level (35 °C). Similar temperatures for the production of xylanases were found by Marques et al., (2017) using *Penicillium roqueforti* and Santos (2012) using *Aspergillus niger*. Incubation temperatures below 20 °C in the bioprocesses may lead to a reduction of the enzymatic production, which may be associated with a decrease in microbial metabolism (Santos et al., 2018). Pandey (2003) states that spore germination, cell growth and product formation are directly influenced by temperature. However, at temperatures above 45 °C the microorganisms synthesize only a small amount of proteins required for their development (Pal and Khanum, 2010).

The variable A_w for the production of endoglucanase and xylanase had the center point 0 (0.9) as the region of maximum production of these enzymes. For the amyloglycosidase, the highest productivity of the enzyme with A_w was observed, with a value equal to 0.88.

According to Gomi (2014), *Aspergillus oryzae* is a fungus that develops well in an average A_w around 0.8, and therefore A_w is an important parameter to be considered in the fermentation process. Ferreira et al., (2017) mentioned that the low A_w interferes with microbial growth due to the decrease in nutrient solubility of the solid matrix, the low degree of wettability and the higher water stress.

CONCLUSION

From the study, it was possible to obtain a crude multienzymatic extract with endoglucanases and xylanases from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 under solid-state

fermentation using as solid matrix the shell of the cocoas without any type of supplementation, serving as the only source of energy for fungal growth. The application of the Box-Behnken design was able to verify the best conditions of the investigated variables temperature, aw, and fermentation time for the production of endoglucanases and xylanases, optimizing the process.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), for the financial support, the State University of the Southwest of Bahia (UESB) and the State University of Santa Cruz (UESC), for technical and administrative support.

REFERENCES

- Amorim, G.M. Oliveira, A.C. Gutarra, M.L.E. Godoy, M.G. & Freire, D.M.G. (2017) Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.05.009>
- Ballus, C.A. Meinhart, A.D. Bruns, R.E. & Godoy, H.T. (2011). Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta*, 83, 1181-1187. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.07.013>
- Biz, A. Finkler, T.J. Pitol, L.O. Medina, B.S. Krieger, N. & Mitchell, D.A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 111, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007>
- Brito, A.R. Reis, N.S. Bonomo, R.F. Uetanabaro, A.P.T. & Assis S.A. (2017). Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47, 977-985. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>.
- Cerda, A. Mejías, L. Gea, T. & Sánchez, A. (2017). Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technology*, 243, 1059-1068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.076>.

Coutinho, J.P. Barbero, G.F. Avellán O.F. Garcés-Claver, A. Godoy, H.T. Palma, M. & Barroso, C.G. (2015). Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta*, *134*, 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.004>.

Easson, M. Condon, B. Villalpando, A. & Chang, S. (2018). The application of ultrasound and enzymes in textile processing of greige cotton. *Ultrasonics*, *84*, 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2017.11.007>

Ferraz, J. L. A. A. Souza, L.O. Soares, G.A. Coutinho, J.P. Oliveira, J.R. Aguiar-Oliveira, E. & Franco, M. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresource Technology*, *248*, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>.

Ferreira, A. N. Ribeiro, D.S. Santana, R.A. Felix, A.C.S. Alvarez, L.D.G. Lima, E.O. Freitas, J.S. Valasques, G.L. Franco, M. & Júnior, B. B.N. (2017). Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. *Chemical Engineering Communications*, *204*, 1167-1173. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1347567>

Gomi, K. (2014). *Aspergillus oryzae*. Vol.1, pp.92-96. In: Encyclopedia of Food Microbiology.

Ghose, T. & Bisaria, V.S. (1987). Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, *59*, 1739-1752.

Joana, B. Michal, B. Piotr, D. Agnieszka, W. Dorota, K. & Izabela, W. (2018). Sugar Beet Pulp as a Source of Valuable Biotechnological Products. *14*, pp. 359-392. In: *Advances in Biotechnology for Food Industry*, Chapter 13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00013-X>

Kalaivani, S.S. Vidhyadevi, T. Murugesan, A. Baskaralingam, P. & Anuradha, C.D. (2014). Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of Ni (II) ion from an aqueous solution using activated carbon prepared from *Theobroma cacao* (cocoa) shell. *Journal Desalination and Water Treatment*, *54*, 1629-1641. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.888678>

Krishna, P.R. Srivastava, A.K. Ramaswamy, N.K. Suprasanna, P. & Souza, S.F.D. (2012). Banana peel as substrate for α -amylase production using *Aspergillus niger* NCIM 616 and process optimization. *Indian Journal of Biotechnology*, *11*(3) 314-319.

Lessa, O.A. Reis, N.S. Leite, S.G.F. Gutarra, M.L.E. Souza, A.O. Gualberto, A.S. Oliveira, J.R. Aguiar, O.E. & Franco, M. (2017). Effect of the solid-state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology*, *27*, 107-113. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0196-x>

Li, G. Wang, J. & Reetz, M.T. (2018). Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *26*, 1241–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.021>

Mancini, G., Papirio, S., Lens, P. N. & Esposito, G. (2016). Effect of N-methylmorpholine-Noxide pretreatment on biogas production from rice straw, cocoa shell, and hazelnut skin. *Environmental Engineering Science*, 33, 843-850. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0138>

Marques, G. L. Reis, N.S. Silva, T. P. Ferreira, M. L. O. Aguiar-Oliveira, E. Oliveira, J. R. & Franco, M. (2017) Production and characterisation of xylanase and endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of rice husk residue. *Waste Biomass Valor*, 1, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>

Martínez-Ruiz, A. Tovar-Castro, L. García, H.S. Saucedo-Castaneda, G. & Favela-Torres, E. (2018). Continuous ethyl oleat synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. *Bioresource Technology*, 265, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.080>

Miller, GL. (1959). Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Okiyama, D.C.G. Navarro, S.L.B. & Rodrigues, C.E.C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Food Science Technology*, 63, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>

Pal, A. & Khanum, F. (2010). Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 7563–7569. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.033>.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84 [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)

Pathak, P. Bhardwaj, N.K. & Singh, A.K. (2014). Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 3776–3797. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0758-9>.

Reis, N.S. Brito, A.R. Pacheco, C.S.V. Costa, L.C.B. Gross, E. Silva, T.P. Costa, A.R. Silva, E.G.P. Oliveira, R.A. Aguiar-Oliveira, E. Oliveira, J.R. & Franco, M. (2018). Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multienzymatic extract of *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Communications*, 205, 387-397. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1494580>

Santana, R. S. M., Zanon, S. G., Bonomo, R. C. F. Franco, M. (2012). Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. *Revista Caatinga* 25, 188-192.

Santos, T.C. Cavalcanti, I.S. Bonomo, R.C.F. Santana, N.B. & Franco, M. (2011). Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, 41, 2210-2216. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000145>

Santos, T.C. Gomes, D.P.P. Bonomo, R.C.F. & Franco, M. (2012). Optimisation of solid-state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chemistry*, 133, 1299-1304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.115>

Santos, T.C. Filho, G.A. Oliveira, A.C. Rocha, T.J.O. Machado, F.P.P. Bonomo, R.C.F. Mota, K.I.A. & Franco, M. (2013). Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the purple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1-7 <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0001-4>

Santos, T.C.D. Abreu, F.G. Brito, A.R.D. Pires, A.J.V. Bonomo, R.C.F. & Franco, M. (2016). Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* by solid-state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga*, 29, 222-233. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n126rc>

Santos T.C.D. Brito, A.B. Bonomo, R.C.F. Pires, A.J.V. Oliveira, E.A. Silva, T.P. & Franco, M. (2017). Statistical optimization of culture conditions and characterization for ligninolytic enzymes produced from *Rhizopus sp.* using prickly palm cactus husk. *Chemical Engineering Communications*, 204, 55-63. <https://doi.org/10.1080/00986445.2016.1230851>

Santos T.C.D. Reis, N.S. Silva, T.P. Bonomo, R.C.F. Oliveira, E.A. Oliveira, J.R. & Franco, M. (2018). Production, optimisation and partial characterisation of enzymes from filamentous fungi using dried forage cactus pear as substrate. *Waste and Biomass Valor*, 9, 571-579. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9810-z>

Sharma, H.P. Patel, H. & Sugandha (2017). Enzymatic aided extraction and clarification of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1215-1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>.

Shi, C. Zhang, Y. Lu, Z. & Wang, Y., (2017). Solid-state fermentation of corn-soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* for degrading antinutritional factors and enhancing nutritional value. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0184-2>

Silva, T.P. Souza, L.O. Reis, N.S, Assis, A.S. Ferreira, M.L.O. Oliveira, J.R. & Franco M. (2017). Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16, 745-756.

Silva, T.P. Albuquerque, F.S. Santos, C.W.V. Franco, M. Caetano, L.C. & Pereira, H.J.V. (2018). Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresource Technology*, 270, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.022>.

Soccol, C.R. Costa, E.S.F. Letti, L.A.J. Karp, S.G. Woiciechowski, A.L. & Vandenberghe, L.P.S. (2017). Recent developments and innovations in solid-state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 2, 52-71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>

Sousa, L.O. Brito, A.R. Bonomo, R.C.F. Santana, N.B. Ferraz, J.L.A.A. Fernandes, A.G.A. Ferreira, M.L.O. Oliveira, J.R. Águiar-Oliveira, E. & Franco, M. (2018). Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* and excreted by

Penicillium roqueforti of sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.016>

Taniguchi, J.G. Kawaguti, H.Y. Silva, W.F. Simon, J.W. Okino-Delgado, C.H. & Fleuri, L.F. (2014). Produção de moléculas bioativas por fermentação em estado sólido utilizando novos actinomicetos e caracterização parcial dos principais compostos. *Trends in Bioscience and Biotechnology*, 1, 4-7.

Zhao, H.M. Guo, X.N. & Zhu, K.X. (2017). Impact of solid-state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. *Food Chemistry*, 217, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.062>

CAPÍTULO III

Enzyme extraction by lab-scale hydrodistillation of ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe): chromatographic and micromorphological analyses

Nadabe dos Santos Reis^{1,2}, Nívio Batista de Santana², Iasnaia Maria de Carvalho Tavares², Ozana Almeida Lessa³, Lucas Ribeiro dos Santos⁴, Norma Eliane Pereira⁵, Glêydison Amarante Soares⁶, Rosilene Aparecida Oliveira⁶, Julieta Rangel Oliveira⁶, Marcelo Franco^{6*}

¹ Science and Technology Information Center, Federal University of the South of Bahia (UFSB), Postal Code: 45613-204, Itabuna, Bahia, Brazil. N. S. Reis, nadabereis@ufsb.edu.br

² Post-Graduation Program in Food Engineering, Department of Exact and Natural Sciences, State University of South-West Bahia (UESB), 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil. N. B. Santana, niviobs@yahoo.com.br; I. M. C. Tavares, iasnaiamct@gmail.com

³ Post-Graduation Program in Chemical and Biochemical Process Technology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21949-900, Brazil. O. A. Lessa, ozanalessa@gmail.com

⁴ Electron Microscopy Center, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45662-000, Ilhéus, Bahia, Brazil. L. R. Santos, lsantos@uesc.br

⁵ Department of Agrarian and Environmental Sciences, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil. N. E. Pereira, normaeliane@gmail.com

⁶ Department of Exact Sciences and Technological, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil. G. A. Soares, glydison_chemistry@hotmail.com; R. A. Oliveira, rosilene@uesc.br; J. R. Oliveira, ljulietaquimica@yahoo.com.br; M. Franco, marcelofranco@globo.com

* Corresponding author. E-mail address: marcelofranco@globo.com

Artigo submetido a revista Chemical Engineering Journal em 14-05-2019

Abbreviations:

ANOVA, analysis of variance; CG-MS, gas chromatography coupled to a mass detector; MME, crude multi-enzymatic extracts; CS, control sample; DF, degree of freedom; EG, endo-1,4- β -glucanases; EMC, Electron Microscopy Center; F, Fisher's test; KI, Kovat's Index; MS, mean square; OTE, ginger essential oils obtained after enzymatic pre-treatment; OWE, ginger essential oils obtained without enzymatic pre-treatment; SQ, sum of squares; SSF, Solid-state fermentation; UESC, Santa Cruz State University; *t*, time; T, temperature; YLD, yield.

Abstract

The present study assessed the use of crude multi-enzymatic extracts (MME) obtained from solid-state fermentation of cocoa bean shells by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 in the extraction of ginger essential oils. A Doehlert matrix was used in the optimization of the enzymatic pre-treatment. Independent variables of temperature, time and the proportion of MME/H₂O were evaluated. After enzymatic treatment, extraction occurred by hydrodistillation. The results demonstrated that pre-treatment raised essential oil yields by 47.95% at 40 °C, 130 minutes and MME/H₂O (75/425 mL mL⁻¹). The composition of the obtained essential oils was identified by CG-MS, methyl citronellate (25.20%) being the main volatile constituent. Degradation of the plant cell wall of the ginger was observed through micromorphological analysis. Application of MME in ginger essential oil extraction eliminated the drying stage that is necessary in this type of plant material, reducing both energy consumption of the process and volatilization of the chemical components.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Enzymatic Pre-treatment, Doehlert Matrix, Microscopy, Chromatography

1. Introduction

Essential oils are volatile compounds extracted from aromatic plants. Some are considered inhibitor agents of pathogens, such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Listeria monocytogenes*, among many others (Aziz et al., 2018; Tariq et al., 2019), and are widely used in food preservation (Noori, Zeynali, & Almasi, 2018). Ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe) is considered one of the most used spices in the world and has antibacterial (Silva et al., 2018), antifungal (Noshirvani, Ghanbarzadeh, & Gardrat, 2017), antioxidant (An et al., 2016), anti-

inflammatory (Funk et al., 2017), and anti-carcinogenic (Wang, Qi, & Yuan, 2015) biological activities.

Various techniques are used in the extraction of ginger essential oils, and hydrodistillation is the most common (Aziz et al., 2018). In hydrodistillation, the plant material is subjected to a process of drying to both impede the growth of microorganisms and diminish the moisture content to facilitate essential oil extraction. The recommended drying time varies between 3 and 7 days, depending on the temperature used and the total moisture of the plant matrix (Rahimmalek, & Goli, 2013). However, the drying stage may reduce essential oil content due to volatilization or degradation of the chemical constituents (Rahimmalek, & Goli, 2013). In order to eliminate the drying stage and increased the extraction efficiency, the enzymatic pretreatment is used (Reis et al., 2019).

Enzymatic pre-treatment increased extraction efficiency in the hydrodistillation of essential oils of *Thymus capitatus* by 109% and *Rosmarinus officinalis* by 50% depending on the enzyme employed (Hosni et al., 2013) and 25% in *Lavandula hybrida* flowers (Calinescu et al., 2014). No report of extraction of essential oil of ginger by hydrodistillation using enzymatic pre-treatment. In said studies, the authors used commercial enzymes in the enzymatic pre-treatment. Nevertheless, according to Reis et al. (2019) another possible strategy for the efficient extraction of essential oils is the use of crude multi-enzymatic extracts (MME). These MME present advantages as they contain various hydrolytic enzymes necessary for complete de-structuring of the plant cell wall (Broxterman & Schols, 2018).

The plant cell wall is composed of a rigid complex of carbohydrates (cellulose, hemicellulose, xylan, pectin) (Broxterman & Schols, 2018). This structure requires the joint action of enzymes with different functions in order to be broken down.

Cellulases are enzymes that act on the hydrolysis of cellulose to generate monomeric units (Marques et al., 2018). Endo-1,4- β -glucanases (EG) cleave intramolecular β -1,4-

glycosidic linkages in the amorphous regions of the cellulose fiber, provoking ruptures in the cellulose structure. The xylanases depolymerize the xylan present in the hemicellulose fraction of the plant cell wall (Reis et al., 2019). The xylanolytic action consists of the synergy between the endoxylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) and β -xylosidases (β -D-xyloside xylohydrolase, EC 3.2.1.37) (Ferraz et al., 2018). Amyloglycosidases (E.C. 3.2.1.3) are responsible for catalyzing the α -1-4 and α -1-6 linkages of the polysaccharides, particularly the starches present in the plant cell wall, facilitating the removal of essential oils in the storage glands through hydrolysis of the starches (Pervez et al., 2018).

Cellulases, xylanases and amyloglycosidases can be produced by various types of microorganism, such as filamentous fungi (Brito et al., 2017), bacteria (Martínez-Ruiz et al., 2018) and actinomycetes (Cerdeira, Mejías, Gea, & Sánchez, 2017). These micro-organisms are used as bioconversion agents, using lignocellulosic biomass as an energy source, and excreting different metabolites including the enzymes (Santos et al., 2017).

Thus, the objective of the present study was to assess the use of crude multi-enzymatic extracts (MME) obtained from solid-state fermentation of cocoa shell by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 in the extraction of ginger essential oils and evaluate the composition of the essential oils and degradation of the plant cell wall of fresh ginger rhizomes through chromatographic and micromorphological analyses.

2. Material and Methods

2.1 Collection of plant material

The fresh ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Roscoe) used in this study were obtained at a local market in the city of Itajuípe- Ba in May 2017 and were stored

in polyethylene bags. Each bag contained around 300 g of fresh ginger rhizome and was kept under refrigeration.

2.2 *Solid-state fermentation (SSF)*

Solid-state fermentation (SSF) was based on previous studies by Lessa et al. (2018) whereby the cocoa shell, donated by a cocoa processing company (Ilheus, Bahia, Brazil), was ground in a knife mill (Solab). The granulometry was selected using a sieve with a diameter less than or equal to 200 mesh. *Aspergillus oryzae* ATCC 10124, obtained from the culture collection of the Oswaldo Cruz Institute (Rio de Janeiro, Brazil), was inoculated into a potato dextrose agar medium and incubated for 7 d at 30 °C in a temperature control incubator (SL 222, Solab, Piracicaba, Brazil). Spores were then collected using a 0.01% Tween 80 solution. Spores in suspension were obtained with the assistance of a Neubauer chamber and a binocular microscope (BIOVAL L1000, São Paulo, Brazil). For the SSF, 10 g of dry cocoa shell inoculated with 10^7 spores per g of the dry substrate were used in triplicate, and sterile water was applied to achieve the water activity value of 0.89 (Aqualab PRE CAP, AquaLab, São José dos Campos, Brazil). The Erlenmeyer flasks were maintained at 35 °C for 96 h in a temperature control incubator (TE-317, Tecnal, Piracicaba, Brazil) with forced air ventilation.

2.3 *Multi-enzymatic extract obtainment and characterization*

After the fermentation process, 10 mL of distilled water was added per gram of substrate and the supernatant enzymatic extract was obtained through centrifugation at 40 g (Heraeus Megafuge 16R) for 15 min at 4 °C. The enzymatic activities were quantified according to previous works for endoglycanases (Santos et al., 2017), xylanases (Ferraz et al., 2018) and amyloglycosidases (Santana, Gonçalves, Bonomo, & Franco, 2012). The different

enzymatic activities present in the extract were not isolated individually and determination was performed in triplicate. The enzymatic composition for the obtained multi-enzymatic extract showed endoglucanase activity (0.845 UI g⁻¹), xylanase activity (0.945 UI g⁻¹) and amyloglycosidase activity (0.280 UI g⁻¹).

2.4 Enzymatic pre-treatment

A total of thirty grams (30 g) of ground ginger rhizome was transferred to a round-bottom flask, with a ground glass mouth, and different volumes of multi-enzymatic extracts and distilled water (MME/H₂O, mL mL⁻¹) were added, Table 1. The system was closed and coupled to a thermostatic bath using different combinations of time (*t*, min) and temperature (T, °C). Optimization of these variables was analyzed using a Doehlert Matrix (Table 1). The experimental conditions of the controls did not use MME.

Experiments	T (°C)	t (min)	MME/H ₂ O (mL)	YLD (%)	
				Observed values	Predicted values
1	1 (50)	0 (130)	0 (75)	13.21	11.32
2	0.5 (45)	-0.5 (115)	0.817(100)	15.23	15.48
3	0.5 (45)	-0.5 (115)	-0.817 (25)	7.81	9.22
4	0.5 (45)	0.5 (145)	0.817 (100)	14.05	15.48
5	0.5 (45)	0.5 (145)	-0.817(25)	6.92	9.24
6	0 (40)	-1 (100)	0 (75)	12.03	12.30
7	0 (40)	0 (130)	0 (75)	45.76	48.01
8	0 (40)	1 (160)	0 (75)	12.58	12.30
9	-0.5 (35)	-0.5 (115)	0.817(100)	13.08	15.48
10	-0.5 (35)	-0.5 (115)	-0.817 (25)	11.42	9.24
11	-0.5 (35)	0.5 (145)	0.817 (75)	19.58	15.48
12	-0.5 (35)	0.5 (145)	-0.817(25)	10.8	9.24
13	-1 (30)	0 (130)	0 (100)	9.43	11.32
14	0 (40)	0 (130)	0 (100)	48.67	48.01
15	0 (40)	0 (130)	0 (100)	49.61	48.01

Abbreviations: T, temperature; t, time, MME, crude multienzymatic extracts; YLD, yield.

2.5 Extraction of ginger essential oil (*Z. officinale*)

The essential oil from fresh ginger rhizomes was extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus for 60 min. The oil was separated using dichloromethane, dried with

anhydrous sodium sulfate, and concentrated. The content was determined by the essential oil mass, expressed in weight/weight percentage (g of essential oil per 100 g of dry plant material). The essential oils were cooled to 10 °C until undergoing chromatographic analysis.

2.6 Chromatographic analyses

The quantitative chemical composition was evaluated through gas chromatography coupled to a mass detector (CG-MS), using a Varian Saturn 3800 gas chromatograph equipped with VF5-ms fused-silica capillary column (30 m X 0.25 mm) with 5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane stationary phase (0.25 µm film thickness), with helium 6.0 as carrier gas with a flow of 1.2 mL min⁻¹ (14 psi). The temperatures of the injector and detector were 250 °C and 280 °C, respectively. Using split mode, 1.0 µL of solution in CHCl₃ at 10% was injected (1:10). The column temperature was initiated at 50 °C, maintained for 2 min, and then increased by 8 °C/min until reaching 100 °C. Subsequently, the temperature was increased by 5 °C/min until 150 °C, which was followed by an increase of 8 °C/min until reaching 190 °C. Then, the temperature was increased by 5 °C/min up to 240 °C, and this temperature was then maintained for 5 minutes. The analysis time was 41.25 min. Component quantification was obtained by electronic integration of the peaks detected in the mass detector through standardization and the injections were in triplicate (Adams, 2005).

2.7 Micromorphological analysis

Scanning electron microscopy analysis was carried out at the Electron Microscopy Center (EMC) of the Santa Cruz State University (UESC-Bahia) using a QUANTA 250, FEI COMPANIE, scanning electron microscope. The ginger rhizome cuttings of approximately 0.5 cm² were fixed to “STUB” supports. The readings were taken under ambient conditions, which are used to investigate samples incompatible with high vacuum and as such, impossible

to be analyzed by other traditional methods of scanning electron microscopy. The electron micrographs were carried out using 100x, 1000x and 3000x magnification.

2.8 Statistical analysis

The statistical significance level of the constructed model was evaluated using analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$), regression coefficients were evaluated from the standardized effects (based on t-Student, $p < 0.05$) and the quality of the model evaluated using the coefficient of determination (R^2), the adjusted coefficient of determination (R_{adj}^2) and the lack of fit test. Statistics software (StatSoft) version 10 was used for data analysis and graphics.

3. Results and Discussion

3.1 Optimization of the enzymatic pre-treatment

Essential oil extraction from the ginger rhizomes was conducted with the Doehlert Matrix and are presented in Table 1, with essential oil yield (YLD, %) according to the independent variables of temperature (T, °C), time (t, min) and the volume band of MME in distilled water (MME/H₂O, mL mL⁻¹).

The results were initially analyzed using a Pareto graph (figure 1.A) at 95% confidence level, the quadratic terms being significant, and only the linear terms representing the proportion of the MME/H₂O volume was statistically significant. Temperature (T²) was the variable that exercised the greatest influence on the process of optimization of ginger essential oil extraction. The significant effect of the linear term referring to the MME/H₂O volume suggests that the investigated variable was important for maximum removal of essential oils from ginger through enzymatic action.

The non-significant terms were removed from the model. A new, reduced model was constructed through regression analysis and subjected to ANOVA ($p < 0.05$) (Table 2). The newly-constructed, reduced model presented statistical significance, which was evident from the Fisher test for regression, an F value corresponding to 82.18 ($p < 0.05$) being obtained.

Source	SQ	DF	MS	F	p-value
Regression	3129.67	6	521.61	82.18	< 0.0001
Residue	50.78	8	6.35		
Lack of fit	44.39	6	7.40	2.32	0.3317
Pure error	6.38	2	3.19		
Total	3180.45	14			
R ²	0.9840				
R ² -adj	0.9720				

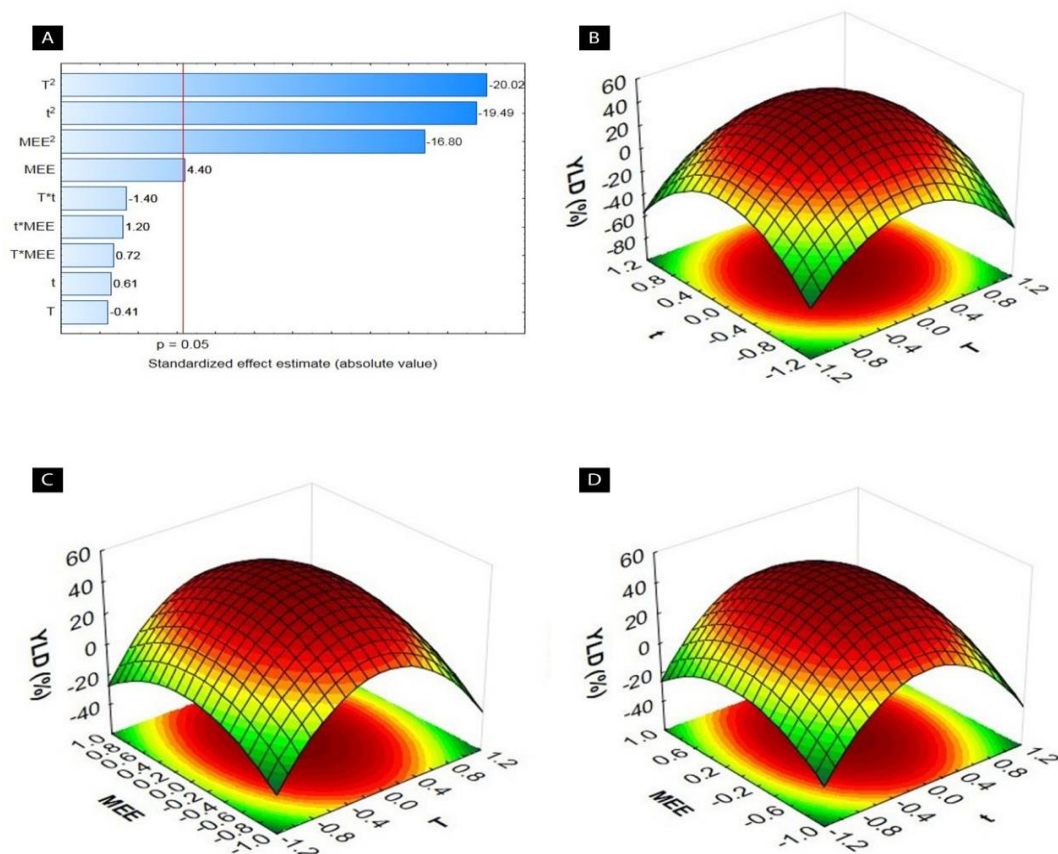
Abbreviations: SQ, sum of squares; DF, degree of freedom; MS, mean square; F, Fisher's test..

The R² value (0.9840) demonstrates that there was a good correlation between the experimental results and predicted values, with the value of R²-adj (0.9720) close to the value of R², highlighting the significance of the model. The lack of fit was insignificant ($p = 0.3317$). The approximation of the real values to the predicted values shows that the residues were relatively low and randomly distributed, making the model valid for construction of the response surface and prediction of the desired regions.

Equation 1 represents the reduced model, adjusted based on the experimental results, where *YLD* represents the quantity of essential oil obtained (response) whereas *T* (temperature), *t* (time) and *MME* (volume of the proportion of MME / H₂O used) represent the independent variables in codified values.

$$YLD = 47.813 - 36.493T^2 - 35.508t^2 + 3.820MME - 26.145MME^2 \quad \text{Eq.1}$$

The response surface graphs (Figure 1. B, 1.C and 1.D), constructed from equation 1, illustrate the effect of the variables and their interactions. The response surfaces generated from the model indicate that the analyzed experimental conditions are within the areas of maximum yield.



From the theoretical results, it was possible to predict a maximum value for ginger essential oil yield equivalent to 47.95% under conditions of a temperature of 40 °C, time of 130 min and a MME / H₂O (75/425 mL mL⁻¹) proportion. In these conditions, a mean experimental value of 47.80% (triplicate) was found, validating the statistical model.

Enzymatic pre-treatment has been applied with essential oil extraction processes from seeds, leaves, flowers and rhizomes (Zhang, Zhang, & Chen, 2012). The use of enzymes associated with the extraction method presents a distinct principle in comparison with

conventional methods such as the extraction of solvents that are based on the solubility of oil in organic solvents (Marathe, Jadhav, Bankar, Dubey, & Singhal, 2019). In enzymatic pre-treatment, the enzymes break down glycosidic linkages that join polysaccharides to the plant cell wall, provoking ruptures in the storage glands of oils present in the epicarp or flavedo, which facilitates their removal. This essential oil migrates from the interior of plant tissues to the middle (water), being recuperated through hydrodistillation (Kumar et al., 2017).

Table 3 presents some researchs carried out in the last five years on the application of enzymes in the process of essential oil extraction. The authors used commercial enzymes and different extraction methods.

Vegetal matrices	Enzymes	Yield (%)	References
Soybean (<i>Glycine max</i>)	Enzyme systems of multi-enzymatic complex (Alcalase/Celluclast or Alcalase/Viscozyme L)	20.23-29.48	Rovaris et al. (2012)
Fruit (<i>Idesia polycarpa</i>)	Enzyme cocktail (cellulase, hemicellulase, and pectinase)	37.73-79.36	Hou et al. (2018)
Sesame (<i>Sesamu indicum</i>)	Pectinex Ultra SPL and Alcalase 2.4L	87.0	Ribeiro et al. (2016)
Grape seed (<i>Vitis vinifera</i>)	Enzyme cocktail (Cellulase, hemicellulase, pectinase, and protease)	13.7-17.5	Passos, Yilmaz, Silva and Coimbra (2009)
Fennel (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Celluclast, Pectinex, Viscozyme or Protease	1.38-1.5	Baby and Ranganathan (2016)
Kernel (<i>Pinus pumila</i>)	Enzyme cocktail (cellulase, pectinase and hemicellulase)	14.02-31.89	Chen, Zhang, Gu and Yang (2016)

Were presented very variable oil extraction rates, which depend on a number of factors, such as the liquid-solid ratio, incubation temperature, incubation time, amount of enzymes, homogenate time, pH, particle size, extraction method, between them, hydrodistillation, pressing and solvent. In addition, the vegetal matrix used and the content of oil present at the beginning, influence in the extraction efficiency, as well as in the increase of

the oil extraction. This shows the importance of studying the use of enzymatic pretreatment in different vegetable matrices.

Reis et al. (2019) addressed the fact that enzymatic pre-treatment associated with hydrodistillation is an ecologically correct process, which enables higher yields. However, the purified enzymes have a high cost, which limits its application (Rovaris et al., 2012). In the present study, the CME obtained from solid-state fermentation of cocoa shell by *A. oryzae* showed different hydrolase activities (endoglycanases, xylanases and amyloglycosidases). The use of CME became a viable alternative, highly efficient in essential oil extraction, and also making the drying process unnecessary for *Z. officinale* rhizomes.

3.2 Chromatographic analyses of essential oil

The essential oil from fresh ginger rhizomes was characterized through gas chromatography coupled to a mass detector. Table 4 presents the quantification of the principal compounds of samples of the ginger rhizomes essential oils obtained after enzymatic pre-treatment (OTE) and of the control samples (OWE), without enzymatic pre-treatment. The compounds were identified by comparison between values of Kovat's Index (KI), calculated with tables as per Adams (2005).

A total of twenty-five constituents were identified regardless of enzymatic pre-treatment, representing 96.32% and 97.34% of the total composition of the OWE and OTE, respectively. The 1.02% difference between OWE and OTE, can be justified by the appearance of the sabinene area, not identified in OWE.

The essential oils (OWE and OTE) presented a similar chemical composition of oxygenated monoterpenes (52.45% in OWE and 54.03% in OTE). The higher proportion of oxygenated monoterpenes present in the ginger essential oils obtained in the present study is possibly due to the reduction in thermal and hydrolytic effects as a result of a process without

drying and with a shorter hydrodistillation time (Jiao et al., 2012). For Sasidharan and Menon (2010), the essential oil from dry ginger rhizomes has fewer volatile compounds of low boiling point, as the majority evaporate during the drying process.

Components	KI Cal.	KI Lit	OWE	OTE
2 - Heptanol	893	889	0,36 ±0,03	0,67± 0,01
Triciclono	925	926	1,12±0,29	2,45±0,56
α-pineno	943	939	4,47±1,12	9,02±1,81
Sabineno	970	976	n.d	0,63±0,36
β-pineno	979	980	1,56±0,28	2,26±0,31
Limoneno	1020	1030	1,29±0,91	1,88±0,29
β-felandreno	1022	1031	4,33±1,32	4,90±0,61
Eucaliptol	1025	1033	6,56±0,04	9,08±0,97
Linalol	1091	1098	1,42±0,21	1,59±0,23
Borneol	1168	1165	1,59±0,62	1,65±0,06
α-terpineol	1190	1189	1,65±0,15	1,82±0,06
Trans- dihidrocarvona	1219	1218	1,63±0,14	1,57±0,11
Formato de Isorbonila	1232	1233	13,18±0,06	12,71±0,008
Nerol	1243	1240	1,23±0,50	1,38±0,26
Metil Citronelato	1261	1261	25,20±0,03	24,23±0,40
Undecanona	1282	1291	0,44±0,14	0,52±1,09
Curcumeno	1460	1468	4,28±0,01	6,54±0,06
cis-β- guaieno	1486	1490	9,08±0,48	1,15±0,67
α-Zingibereno	1488	1493	1,57±0,08	3,61±0,15
α-bisaboleno	1495	1504	5,38±0,99	4,98±2,04
7-epi-α- selineno	1512	1517	5,49±0,46	4,24±0,54
Germacreno B	1550	1556	0,43±0,61	0,49±1,68
epi-longipinanol	1552	1561	0,72±1,35	0,74±0,09
khusimone	1604	1593	0,60±0,23	0,46±0,09
β-eudesmol	1649	1649	0,71±0,11	0,81±0,27
Total			96,32%	97,34%

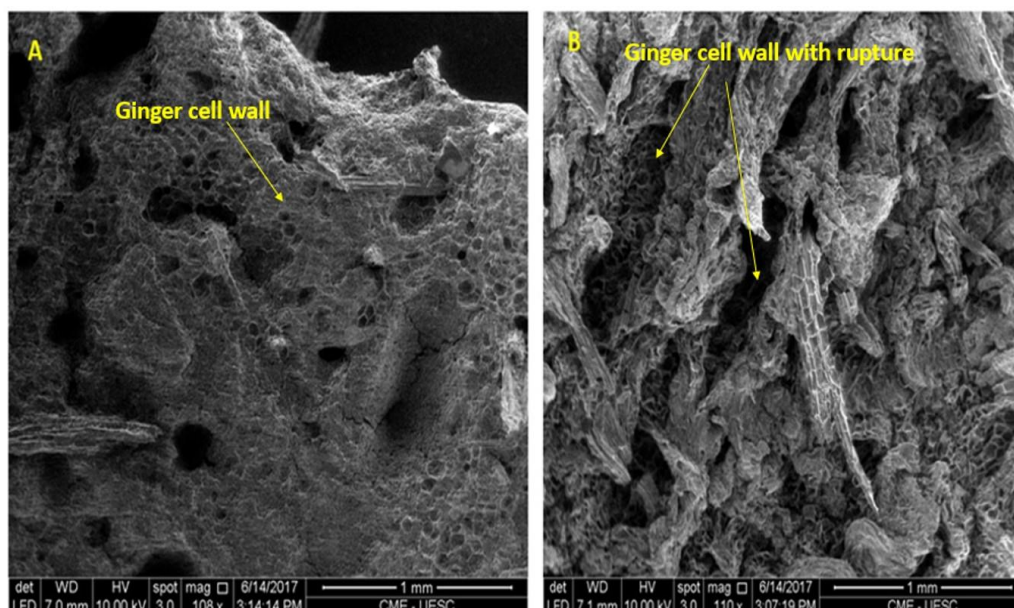
Abbreviations: n.d, not detected.

The chromatographic analyses demonstrated that enzymatic pretreatment promoted a significant increase in the content of some constituents, such as; α -pinene, eucaliptol, curcumene and α -zingiberene. Some studies indicate that β -pinene, together with α -pinene and other terpenes, present cytotoxic, lipophilic, bactericide, fungicide, insecticide, anticarcinogenic, pesticide, antioxidant and sedative biological activities (Mercier, Prost, & Prost, 2009). Sabinene was identified in the OTE; which is a monoterpene used by the food, pharmaceutical and cosmetic industries as a flavoring agent. Sabinene presents anti-fungal activity, which justifies the use of this constituent as a food additive (Kohzaki et al., 2009). The major chemical constituents identified in the present study were methyl citronellate and isorboneol, which can be applied in the food industry as flavoring agents and additives (Mercier et al., 2009).

Hu, Zhang, Xiao and Wang (2018) identified 33 chemical components in dry ginger essential oil through CG-MS, zingiberene (37.72%) being the major constituent. Similar results were described by Silva et al. (2018) and by Noori, Zeynali and Almasi (2018), who reported α -zingiberene as the principle organic compound. The differences in the compositions of the essential oils may be associated with the drying process carried out in the studies described in the literature. An et al. (2016) stated that after drying the ginger rhizomes, the sesquiterpene compound contents (zingiberene and curcumene) increased, while the monoterpene contents (β -phellandrene sabinene and camphene) were reduced. The authors addressed the fact that this alteration may be due to the synthetization of short-chain alkenes and compound isomerization (An et al., 2016)

3.3 Micromorphological analysis

The scanning electron microscopy studies demonstrated a difference in the plant cell wall of the samples as a result of enzymatic pretreatment (figure 2).



The fresh plant tissue presented a porous cortex (figure 3A), containing parenchymal cells, while the fresh plant tissue subjected to enzymatic pretreatment presented perforations in the middle lamella of the plant structure (figure 3B).

Degradation of the cell wall occurred due to the presence of endoglycanase, xylanase and amyloglycosidase. Zhang et al. (2017) observed that the use of commercial cellulases led to alteration in the plant cell wall of *Angelica sinensis*. Jiao et al. (2012) used commercial cellulases on the tissue of *Fructus forsythia* and perceived that both the external and internal cells were significantly disorganized and damaged by the enzyme action. Gai et al. (2013) perceived that application of an enzymatic cocktail (cellulase/proteinase/pectinase = 1/1/1) on *Isatis indigotica* seeds caused visible structural changes to the seed tissues, whereby the majority of the cells were disorganized and completely broken. Jiao et al. (2014) studied enzymatic action on pumpkin seeds and observed partial destruction of the morphological structure of the seed tissues.

4. Conclusion

In the present study, enzymatic pretreatment was optimized through the Doehlert Matrix. The results demonstrated that MME (endoglycanases, xylanases and amyloglycosidases) promoted degradation of the cell wall, seen through morphological analysis. Regardless of enzymatic treatment, chromatographic analyses demonstrated that the principal organic constituents were oxygenated monoterpenes. Among the oxygenated monoterpenes methyl citronellate was the major constituent. The application of CME enabled the appearance of the sabinene in the oil obtained after enzymatic pretreatment. The chemical composition of the obtained essential oil demonstrates its potential as a phytochemical, natural additive and flavoring agent, enabling widespread use by the food industry.

Acknowledgements

The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), for financial support, the State University of South-West Bahia (UESB) and the Santa Cruz State University (UESC), for technical and administrative support and the Federal University of South Bahia for support.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Authors' Contributions: All authors approved the final article.

References

- Adams, R. P. (2005). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 1902–1903. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.07.008>
- An, K., Zhao, D., Wang, Z., Wu, J., Xu, Y., & Xiao, G. (2016). Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food Chemistry*, 197, 1292–1300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.033>

- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(3), 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Baby, K. C., & Ranganathan, T. V. (2016). Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare*) volatile oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 248–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.001>
- Brito, A. R., Reis, N. S., Silva, T. P., Bonomo, C. F., Uetanabaro, A. P. T., Assis, S. A. de, ... Franco, M. (2017). Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid state fermentation by *Aspergillus Oryzae*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47, 977–985. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>
- Broxterman, S. E., & Schols, H. A. (2018). Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 192, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.070>
- Calinescu, I., Gavrilă, A. I., Ivopol, M., Ivopol, G. C., Popescu, M., & Mircioaga, N. (2014). Microwave assisted extraction of essential oils from enzymatically pretreated lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *Central European Journal of Chemistry*, 12(8), 829–836. <https://doi.org/10.2478/s11532-014-0532-4>
- Cerda, A., Mejías, L., Gea, T., & Sánchez, A. (2017). Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technology*, 243, 1059–1068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.076>
- Chen, F., Zhang, Q., Gu, H., & Yang, L. (2016). An approach for extraction of kernel oil from *Pinus pumila* using homogenate-circulating ultrasound in combination with an aqueous enzymatic process and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1471, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.037>
- Ferraz, J. L. de A. A., Souza, L. O., Soares, G. A., Coutinho, J. P., Oliveira, J. R. de, Aguiar-Oliveira, E., & Franco, M. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresource Technology*, 248, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>
- Funk, J. L., Frye, J. B., Oyarzo, J. N., Chen, J., Zhang, H., & Timmermann, B. N. (2017). Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oils of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Experimental Rheumatoid Arthritis. *Pharma Nutrition*, 4(3), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2016.02.004>
- Gai, Q.-Y., Jiao, J., Mu, P.-S., Wang, W., Luo, M., & Li, C.-Y. (2013). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Industrial Crops & Products*, 45, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.050>

- Hosni, K., Hassen, I., Chaâbane, H., Jemli, M., & Dallali, S. (2013). Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, *47*, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.023>
- Hou, K., Yang, X., Bao, M., Chen, F., Tian, H., & Yang, L. (2018). Composition, characteristics and antioxidant activities of fruit oils from *Idesia polycarpa* using homogenate-circulating ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction. *Industrial Crops & Products*, *117*, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.001>
- Hu, J., Zhang, Y., Xiao, Z., & Wang, X. (2018). Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. *Industrial Crops & Products*, *122*(15), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.058>
- Jiao, J., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Luo, M., Wang, W., Zhang, L., & Li, J. (2012). Enzyme-assisted microwave hydro-distillation essential oil from *Fructus forsythia*, chemical constituents, and its antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, *134*, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.114>
- Jiao, J., Li, Z.-G., Gai, Q.-Y., Li, X.-J., Wei, F.-Y., Fu, Y.-J., & Ma, W. (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*, *147*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.079>
- Kohzaki, K., Gomi, K., Yamasaki-kokudo, Y., Ozawa, R., Takabayashi, J., & Akimitsu, K. (2009). Characterization of a sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*). *Journal of Plant Physiology*, *166*(15), 1700–1704. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.003>
- Kumar, S. P. J., Prasad, S. R., Banerjee, R., Agarwal, D. K., Kulkarni, K. S., & Ramesh, K. V. (2017). Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. *Chemistry Central Journal*, *11*(9), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0238-8>
- Lessa, O. A., Reis, N. S., Leite, S. G. F., Gutarra, M. L. E., Souza, A. O., Gualberto, S. A., ... Franco, M. (2018). Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology*, *27*(1), 107–113. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0196-x>
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Dubey, K. K., & Singhal, R. S. (2019). ScienceDirect Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.009>
- Marques, G. L., Reis, N. dos S., Silva, T. P., Ferreira, M. L. O., Aguiar-Oliveira, E., Oliveira, J. R. de, & Franco, M. (2018). Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. *Waste and Biomass Valorization*, *9*(11), 2061–2069. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>
- Martínez-Ruiz, A., Tovar-Castro, L., García, H. S., Saucedo-Castaneda, G., & Favela-Torres, E. (2018). Continuous ethyl oleat synthesis by lipases produced by solid-state

- fermentation by *Rhizopus microsporus*. *Bioresource Technology*, 265, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.080>
- Mercier, B., Prost, J., & Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331–342. <https://doi.org/10.2478/v10001-009-0032-5>
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, 84, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015>
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., & Gardrat, C. (2017). Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids*, 70, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.015>
- Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, 115, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.064>
- Pervez, S., Nawaz, M. A., Shahid, F., Aman, A., Tauseef, I., & Qader, S. A. U. (2018). Characterization of cross-linked amyloglycosidase aggregates from *Aspergillus fumigatus* KIBGE-IB33 for continuous production of glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*, In Press. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.097>
- Rahimmalek, M., & Goli, S. A. H. (2013). Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. *Industrial Crops & Products*, 42, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.012>
- Reis, N. S., Brito, A. R., Pacheco, C. S. V, Costa, L. C. B., Gross, E., Santos, T. P., ... Franco, M. (2019). Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multi-enzymatic extract of *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Communications*, 206(3), 387–397. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1494580>
- Ribeiro, S. A. O., Nicacio, A. E., Zanqui, A. B., Biondo, P. B. F., Abreu-Filho, B. A. de, Visentainer, J. V., ... Matsushita, M. (2016). Improvements in the quality of sesame oil obtained by a green extraction method using enzymes. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 464–470.
- Rovaris, Â. A., Dias, C. O., Cunga, I. P., Scaff, R. M. C., Francisco, A., Petkowicz, C. L. O., & Amante, E. R. (2012). Chemical composition of solid waste and effect of enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*). *Industrial Crops and Products*, 36(1), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.001>
- Santana, R. S. M. de, Gonçalves, Z. S., Bonomo, R. C. F., & Franco, M. (2012). Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. *Revista Caatinga*, 25(1), 188–193

- Santos, T. C., Brito, A. R., Bonomo, R. C. F., Pires, A. J. V., Aguiar-Oliveira, E., Silva, T. P., & Franco, M. (2017). Statistical Optimization of Culture Conditions and Characterization for Statistical Optimization of Culture Conditions and Characterization for Ligninolytic Enzymes Produced from *Rhizopus* Sp. Using Prickly Palm Cactus Husk. *Chemical Engineering Communications*, 204(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/00986445.2016.1230851>
- Sasidharan, I., & Menon, A. N. (2010). Comparative chemical and antimicrobial activity of fresh and dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(4), 40–43.
- Silva, F. T., Cunha, K. F., Fonseca, L. M., Antunes, M. D., Halal, S. L. M. El, Fiorentini, Â. M., ... Dias, A. R. G. (2018). Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultra-fine fibers on the antimicrobial control in situ. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.079>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, In press, Article 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Wang, C.-Z. W., Qi, L.-W., & Yuan, C.-S. (2015). Cancer Chemoprevention Effects of Ginger and its Active Constituents: Potential for New Drug Discovery. *The American Journal of Chinese Medicine*, 43(7), 1351–1363. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500767>
- Zhang, W., Zhang, D., & Chen, X. (2012). A novel process for extraction of tea oil from *Camellia oleifera* seed kernels by combination of microwave puffing and aqueous enzymatic oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(3), 352–356. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000304>
- Zhang, X., Lu, Y., Wang, W., Liu, Z., Liu, J., & Chen, X. (2017). A novel enzyme-assisted approach for efficient extraction of Z-ligustilide from *Angelica sinensis* plants. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10004-x>

Legends

Figure 1: A) Pareto graph presenting the significance of the terms of the variables: temperature, time and CME/H₂O, in the model adjusted for the extraction of essential ginger oil; B-D) Response surface graphs constructed based on the *YLD* model representing the interactions between the temperature, time and CME/H₂O volume variables, having the yield of extracted ginger essential oil as response.

Figure 2: Electron micrographs of the plant cell wall of fresh ginger rhizomes, A) Ginger rhizome fragment without enzymatic pre-treatment. (porous structure of the plant cell wall), B) Ginger rhizome fragment treated with CME (broken down structure of the plant cell wall).

Table 1: Doehlert Matrix used in the enzymatic pre-treatment of fresh ginger rhizomes for the optimization of essential oil extraction.

Table 2: ANOVA for the adjusted reduced model- ginger essential oil extraction.

Table 3: Studies on the efficiency of enzymatic pre-treatment in the degradation of the cell wall of different vegetal matrices.

Table 4: Composition of the ginger essential obtained without enzymatic pre-treatment (OWE) and with enzymatic pre-treatment (OTE), molar% (percentage of each individual compound regarding the total content).

CAPÍTULO IV

Influência do tratamento enzimático no rendimento e caracterização do amido de rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* R.)

Nadabe dos Santos Reis^{1,2}, Paulo Neilson³, Nívio Batista² & Marcelo Franco³

¹ *Science and Techonology Information Center, Federal University of the south of Bahia (UFSEB), Postal Code: 45613-204, Itabuna, Bahia, Brazil.*

² *Post-Graduation Program in Food Engineering, Department of Exact and Natural Sciences, State University of Southwest Bahia (UESB), 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil.*

³ *Department of Exact Sciences and Technological, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil.*

Artigo em processo de tradução, formato nas normas da Revista Food Hydrocoloids.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar o amido de gengibre por um método enzimático e comparar as propriedades físico-químicas e térmicas dos isolados frente aos extraídos de forma convencional. Maior rendimento de amido (14%) foi alcançado quando utilizado extrato multienzimático bruto (EMB) produzido por fermentação em estado sólido da casca da amêndoa de cacau por *Aspergillus oryzae*. Os parâmetros tempo de decantação e volume de EMB foram otimizados utilizando o planejamento Doehlert, sendo as melhores condições encontradas de 60 minutos com a aplicação de 60 mL de EMB. A composição química do amido sofreu pequenas variações com o tratamento enzimático. A análise de Difração de raios-X (DRX) dos amidos revelou grânulos cristalinos do tipo A. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) confirmou o aparecimento de uma banda 2700 cm^{-1} pronunciada apenas no amido obtido após o tratamento enzimático. Os resultados da análise termogravimétrica (TGA) indicaram que o amido de gengibre apresenta maior estabilidade térmica devido à resistência dos cristais tipo A. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostrou amidos com uma baixa temperatura de gelatinização de cerca de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível afirmar que os grânulos obtidos apresentaram grande área de superfície e forma íntegra independente do tratamento enzimático.

Palavras-Chave: amido de gengibre, extração, enzimas, amilose, amilopectina

Introdução

O amido é um carboidrato abundante em tecidos vegetais, sendo considerado como fonte de energia para a dieta humana (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Este carboidrato é formado por duas frações: a amilose e amilopectina (Precha-Atsawan et al., 2017). O amido em seu estado nativo é considerado um polissacarídeo de reserva que se compacta na forma de grânulos com uma estrutura interna organizada e com formato e tamanho dependentes da espécie vegetal (Melo Neto et al., 2015).

Os amidos são biomoléculas com aplicações industriais de relevante importância econômica. Eles são usados nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos químicos, têxteis, entre outras. Com intuito de caracterizar o amido são realizadas análises físico-químicas e térmicas que possibilitam definir o comportamento do amido natural ou modificado, nos mais diversos processos industriais a que eles normalmente são submetidos (Kallman et al., 2015). Conseqüentemente, diferentes propriedades são exigidas, destacando a importância de caracterizar novas fontes naturais.

Vários estudos são relatados na literatura sobre o isolamento de amidos e análises sobre a composição e propriedades térmicas de diversas fontes amiláceas, tais como; milho, arroz, centeio, mandioca, como também pupunha, quinoa, cúrcuma, kiwi e o gengibre (Li & Zhu, 2018a, b, 2017; Franklin et al., 2017). O rizoma de gengibre apresenta cerca de 40–59% de amido em sua composição. Os grânulos de amido de gengibre estão presentes na parede celular vegetal dentro de células parenquimatosas. Os grânulos de amido de gengibre apresentam forma oval, cor branca, porém diferente dos demais, o amido de gengibre é aromático, com cheiro agradável (Nair, 2013).

O processo de extração de amido varia de acordo com a matriz vegetal, principalmente devido as diferenças no teor de proteínas dentro do material intracelular (Andrade, Barbosa & Pereira, 2017). A extração alcalina vem sendo estudada e aplicada para a remoção dos amidos. Entretanto, de acordo com Buksa (2018) a extração alcalina apesar de fornecer rendimentos moderados de amido, pode afetar significativamente as propriedades. Guo (2018) afirma que entre os vários métodos, incluindo químicos, físicos, modificações genéticas, as enzimas têm sido usadas para preparar amidos mais resistentes com desejáveis funcionalidades para atender diversas aplicações industriais.

Atualmente, a modificação enzimática é um dos métodos mais alternativo, caracterizado por ser uma técnica simples e ambientalmente sustentável, uma vez que possui

maior seletividade e especificidade do produto e menos subprodutos prejudiciais (Guo, Zhang, Hu, Du & Cui, 2017). Entretanto, o uso de enzimas comerciais apresenta o fator econômico como um impasse, pois a aplicação de enzimas purificadas eleva o custo de um processo. Sob este olhar, a produção e aplicação de extratos multienzimáticos brutos a partir da fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa economicamente viável, isso porque esta técnica baseia-se na produção de enzimas brutas a partir de fermentação de resíduos agroindustriais por micro-organismos. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo extrair o amido de gengibre pelo método enzimático, utilizando EMB produzidos pela FES da casca da amêndoa de cacau por *Aspergillus oryzae*, otimizando o processo por meio da matriz de Doehlert. Além disso, o estudo teve o interesse de caracterizar e comparar por meio de análises físico-químicas, térmicas e microscópicas os amidos obtidos.

Material e Métodos

Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido foi baseada em estudos realizados por Lessa et al., [28]. A casca da amêndoa de cacau foi cedida por indústrias de processamento de chocolate (Ilhéus, Bahia, Brasil) e foi triturada em moinho tipo Willey (Solab) a uma granulometria aproximada de 2 mm. Os micro-organismos *Aspergillus oryzae* foram obtidos através de cepas pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil), e foram inoculados em placas de petri contendo potato dextrose água e incubados por 7 dias a 30 °C em estufa bacteriológica (SL 222, Solab, Piracicaba, Brazil). A solução de esporos foi obtida através da propagação das culturas esporuladas de *Aspergillus oryzae*. Após a propagação, os esporos foram recuperados em solução de água destilada estéril contendo Tween 80 (vetec) a (0,01%). O número de esporos em suspensão foi quantificado em câmara de Neubauer duplamente espelhada. A concentração utilizada em todos os testes foi de 10^7 esporos/ mL.

Obtenção e caracterização do Extrato Multienzimático

Para a obtenção dos extratos multienzimáticos após o processo fermentativo da casca da amêndoa de cacau, foi adicionado em cada biorreator 50 mL de água destilada. Os extratos foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro. A extração foi realizada por

prensagem mecânica para a obtenção do EMB, o qual foi centrifugado a 15.115 x g por 15 minutos em centrífuga (Heraeus Megafuge 16R) para remoção de sólidos mais finos, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (Reis et al, 2018). As atividades enzimáticas foram quantificadas de acordo com trabalhos anteriores de caracterização das endoglucanases (Santos et al, 2017), xilanases (Ferraz et al., 2018) e amiloglucosidase (Santana et al, 2012). A composição enzimática do extrato multienzimático obtido apresentou atividades de endoglucanases (0,845 UI g⁻¹), xilanases (0,945 UI g⁻¹) e amiloglucosidases (0,280 UI g⁻¹).

Extração e rendimento do amido de gengibre

O amido foi obtido a partir do rizoma de gengibre de acordo com a metodologia descrita na literatura com adaptações (Melo Neto et al., 2015). Para o tratamento enzimático, foi aplicado diferentes volumes de EMB junto com a água destilada adicionada ao processo, gerando um volume total de 1 L. Após o tempo de decantação avaliado, o amido decantado foi purificado com álcool absoluto, filtrado e desidratado a 35 °C durante 12 h em estufa de secagem com circulação forçada de ar (TE-319, Tecnal, Piracicaba, Brasil). Os amidos obtidos foram então reduzidos a pó e passados através de uma peneira de 48 mesh (0,389 mm) para obtenção das amostras para realização das análises. A amostra para análise compreende amido numa proporção de amilose / amilopectina de 1: 5.

O rendimento da extração de amido foi calculado com base na quantidade de amido extraído e na quantidade da massa total do rizoma de gengibre (100g), de acordo com a Equação 4.1.

$$RA = \frac{\textit{massa do amido desidratado (g)}}{\textit{massa total de gengibre fresco (g)}} \times 100\%$$

Equação
4.1

Planejamento Doehlert para otimização da extração de amido do rizoma de gengibre

Foi utilizado uma matriz de planejamento Doehlert para avaliar a influência dos parâmetros tempo de decantação (TD, min) e volume de extrato multienzimático bruto (VEE, mL) sobre a extração do amido de rizoma de gengibre e também determinar os níveis mais adequados dessas variáveis para alcançar o máximo rendimento de amido. O rendimento de amido (RA) (%) foi escolhida como valor de resposta e os fatores tempo de decantação (TD) e volume de extrato multienzimático (VEE) foram selecionados como variáveis independentes. Os valores reais e codificados das variáveis independentes podem ser observados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Variáveis e níveis do planejamento Doehlert para a otimização do rendimento do amido de gengibre utilizando EMB produzido por *A. oryzae* ATCC 10124 em fermentação em estado sólido sob resíduo da casca da amêndoa de cacau.

Experimentos	TD (min)	VEM (mL)	RAE (g)	RAC
1	90 (1)	60(0)	6,51	3,65
2	75(0.5)	80(0.866)	5,23	4,03
3	30(-1)	60(0)	4,31	4,11
4	45(-0.5)	40(-0.866)	4,95	2,53
5	75(0.5)	40(-0.866)	11,3	5,72
6	45(-0.5)	80(0.866)	3,26	2,48
7	60(0)	60(0)	13,03	7,09
8	60(0)	60(0)	14,26	5,72
9	60(0)	60(0)	14,72	7,26

* RAE, rendimento do amido extraído com tratamento enzimático; RAC, rendimento amido controle.

Composição Química

A composição físico-química foi determinada de acordo com a Associação Oficial da Química Analítica (AOAC, 2002); umidade na estufa a 105 °C, procedimento nº 925.09 (32.1.03); cinzas em mufla a 550 °C, procedimento nº 923.03 (32.1.05); o conteúdo proteico pelo método de Kjeldahl, empregando-se 6.25 como fator de conversão, conforme o procedimento nº 991.20 (33.2.11). O conteúdo total de lipídeos foi determinado pelo método Bligh & Dyer (1959). O conteúdo de amido foi avaliado de acordo com a metodologia proposta pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2004). A amilose foi quantificada por espectrometria de acordo com a metodologia proposta por Gilbert & Spragg (1964) e a amilopectina por

diferença. A atividade da água foi medida em um instrumento digital Aqualab, modelo CX-2, fabricado pela Decagon Devices Inc, EUA. As análises foram realizadas em triplicata.

Difração por Raios-X (DRX)

A cristalinidade do amido foi avaliada por difração de raios-X (DRX), em equipamento da marca Shimadzu, modelo XRD-6000, com radiação $\text{Cu.K}\alpha = 0,1518 \text{ nm}$ (40 kV, 30 mA). A faixa analisada foi de $2\theta = 2^\circ$ a 50° , com passo de $0,05^\circ$ e tempo de integração de 2 s. As amostras, na forma de pó, foram devidamente acomodadas em porta amostras e levadas à câmara de radiação do aparelho. Os índices de cristalinidade (I_c) foram estimados segundo metodologia descrita por Nara e Komiya (1983). Para o cálculo da área correspondente aos picos característicos da região cristalina das amostras (A_c), uma linha na base desses picos foi plotada no difratograma, enquanto que para o cálculo da área total (A_t), a linha base foi plotada na faixa angular de 16 a 40° . O cálculo das áreas foi estimado com a ajuda do software Origin v.9.0, utilizando a técnica de deconvolução e a função “Fiting”. A cristalinidade relativa foi determinada pela razão entre a área cristalina e a área total obtidas dos difratogramas.

Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Análise de FTIR foi realizada para caracterizar a estrutura química da amostra pela identificação dos grupos funcionais presentes. A técnica utilizada foi realizada em equipamento: Infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de reflectância total atenuada (ATR) e detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) com software Agilent MicroLab PC software.

Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo (background), em condições padronizadas, sendo subtraído da imagem espectral a ser obtida uma imagem espectral do ambiente, para que eventuais alterações não influenciem nas medidas. Em seguida, cerca de 4 g de amido foi colocado sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante), sendo obtidos os espectros no modo de transmitância.

As amostras foram avaliadas na região espectral com comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , apodização triangular e 64 varreduras para cada espectro. Todos os espectros

foram recolhidos com uma resolução de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente ($17\text{ }^{\circ}\text{C} + 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o tempo de coleta de cada espectro foi de aproximadamente 30 segundos.

Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada para avaliar possíveis mudanças na estabilidade térmica do amido de gengibre. Para tanto, foi utilizado equipamento TA - série Q - modelo Q 500. A amostra foi aquecida na faixa da temperatura ambiente até $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, em atmosfera inerte, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Através dos dados das curvas termogravimétricas, é possível obter a temperatura de decomposição onset (T_{onset}), que é definida como o início extrapolado do evento térmico, e que corresponde ao ponto de interseção da linha base extrapolado, antes do evento, com a tangente à curva produzida no seu intervalo, de modo que a reta passe pelo ponto de inflexão. Na prática, a T_{onset} é usada com o propósito de comparação, visto que ela é mais fácil de ser determinada do que a temperatura T_i , definida como a temperatura à qual se inicia o processo de decomposição térmica com a liberação de componente volátil.

Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

Esta técnica foi empregada utilizando equipamento TA série Q - modelo Q 1000 para as análises. As massas das amostras analisadas variaram de 4,0 a 5,0 mg e foram aquecidas da temperatura ambiente a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. O material passou por dois aquecimentos, sendo o primeiro para apagar a história térmica da amostra. Em seguida, a amostra foi resfriada a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ numa taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, com fluxo de nitrogênio, sendo aquecida novamente a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. O elemento padrão para calibração do DSC foi o Índio.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análise de microscopia eletrônica de varredura do foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC-Bahia) utilizando microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250. Os fragmentos de gengibre e o amido de gengibre foram fixados a um suporte “STUB” e as leituras foram realizadas em modo ambiental que é utilizado para investigar amostras incompatíveis com alto vácuo e por isso, impossíveis de serem analisadas por outros métodos tradicionais de microscopia

eletrônica de varredura. Os fragmentos de gengibre foram fotografados em aumento de 1000x e os grânulos de amido de gengibre foram fotografados em aumento de 100, 500, 1000 e 3000x.

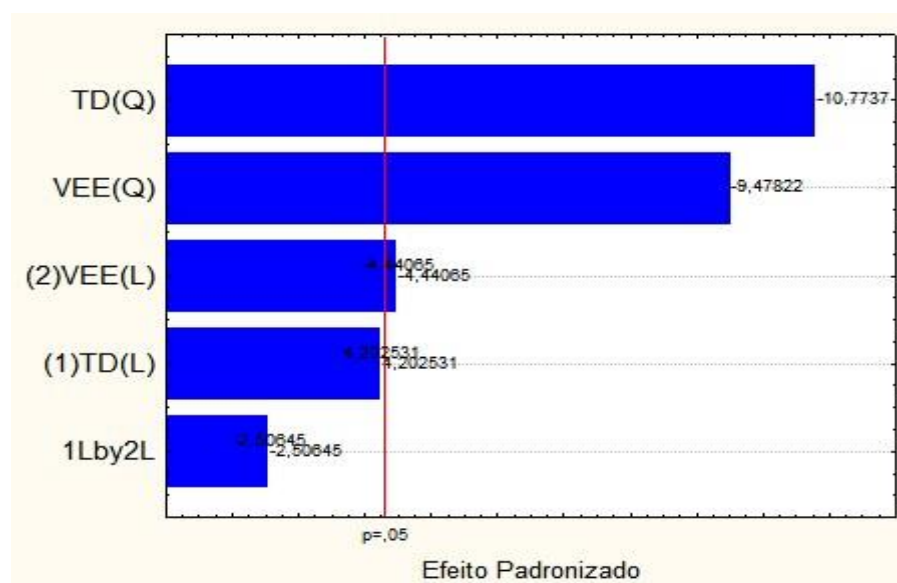
Resultados e Discussão

Planejamento Doehlert para otimização do processo de extração de amido de gengibre

Tempo de decantação (TD) e o volume de extrato multienzimático (VEE) são duas variáveis que podem influenciar o rendimento do amido (RA). Assim, foi desenvolvido um planejamento Doehlert visando avaliar a influência destas variáveis e otimizar o rendimento do amido liberado após o pré-tratamento enzimático utilizando EMB produzido por *A. oryzae* ATCC 10124. A matriz do planejamento experimental e o correspondente rendimento de amidos (%) foram mostrados na Tabela 4.1. Os dados disponíveis nesta tabela foram submetidos à análise de regressão para construção de um modelo matemático de previsão.

Com auxílio do gráfico de Pareto Figura 4.1 é possível observar a significância dos efeitos padronizados dos termos de regressão.

Figura 4.1-Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis tempo de decantação (TD) e volume de EMB (VEE) no modelo ajustado para a extração de amido de gengibre utilizando EMB produzido por *A. oryzae* ATCC 10124.



Neste estudo, todos os termos quadráticos e o termo linear representando o volume de EMB aplicado ao processo (VEE) do modelo foram significativos a um nível de 95% de

confiança. O efeito significativo do termo linear (VEE) sugeriu que esta variável foi determinante para a melhoria no rendimento de amido de gengibre. A significância dos termos quadráticos (TD^2 e VEE^2) implicou que o rendimento de amido foi alterado pelas variáveis em estudo e que pequenas alterações em seus respectivos valores poderiam afetar o processo de extração de amido significativamente. O efeito do termo de interação entre as variáveis ($TD*VEE$) não foi significativo. Portanto, o coeficiente de regressão deste termo foi removido e um novo modelo reduzido foi construído por análise de regressão e submetido à ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 4.2). O modelo reduzido construído apresentou significância estatística, o que ficou evidente a partir do teste de Fisher para a regressão, sendo obtido um valor de F correspondente a ($p < 0,05$).

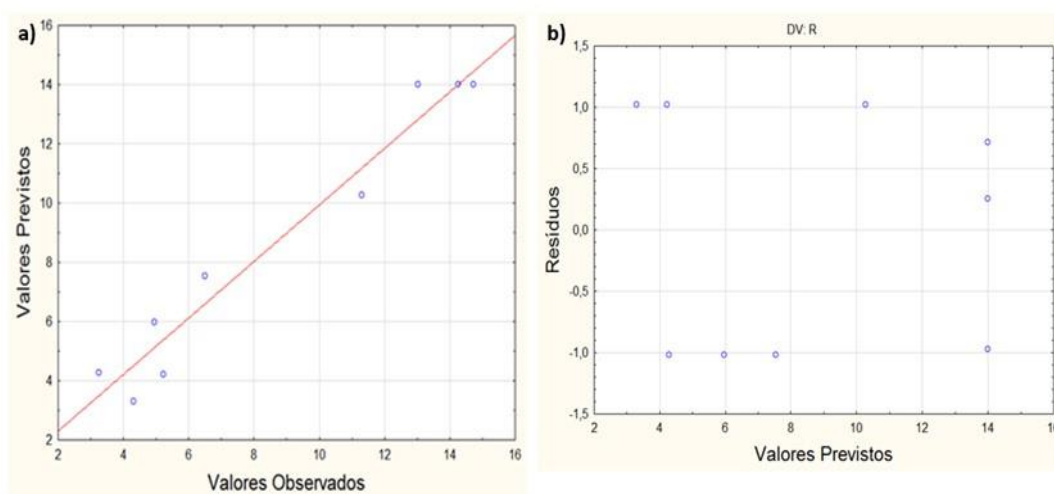
Tabela 4.2: ANOVA para o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos com o planejamento

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Regressão	164,60	5	32,9199	12,71	0,0312
Resíduo	7,7693	3	2,58976		
Falta de ajuste	1,53	2	0,76345	8,17	0,1036
Erro puro	6,24	1	6,24237		
Total	172,37	8			

* $R^2 = 0,9549$; R^2 -adj = 0,8789; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; P, probabilidade.

O valor do coeficiente de regressão R^2 (0,9549) aponta que houve uma boa correlação entre os resultados experimentais e os valores previstos, sendo que 95,49% da variabilidade da resposta (rendimento de amido) pôde ser explicada pelo modelo. Foi obtido um valor de R^2 -adj (0,8789) o que demonstrou que os termos considerados pelo modelo foram válidos. O valor de falta de ajuste foi insignificante ($p = 0,1036$). Esta afirmação pôde ser confirmada a partir dos gráficos de valores reais e previstos e o gráfico de resíduos representado na Figura 4.2, estes gráficos demonstram que o modelo reduzido apresentou os valores das respostas previstas próximos aos valores das respostas experimentais. Pode-se notar também, que os resíduos apresentaram baixos valores e forma aleatória, tornando o modelo válido para construção da superfície de resposta e previsão das regiões desejadas.

Figura 4.2: Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado para explicar a variabilidade dos resultados do rendimento de amido utilizando EMB *A. oryzae* ATCC 10124.

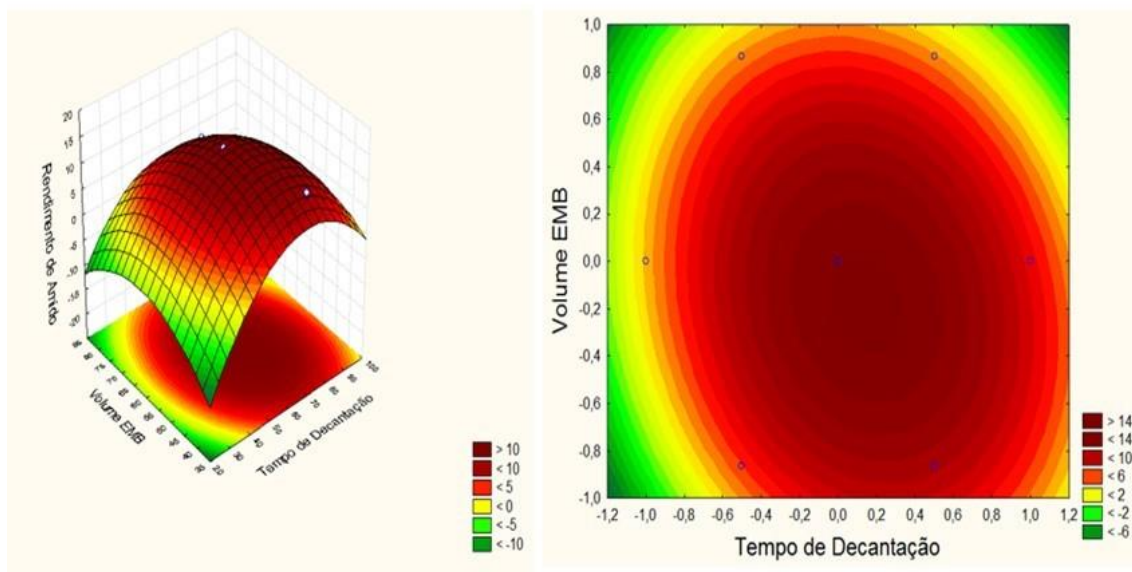


A Equação 4.2 representa o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos para o rendimento do amido. Y representa a quantidade de amido extraído (resposta) ao passo que X e Z representam as variáveis independentes tempo de decantação e volume de extrato multienzimático em valores codificados.

$$Y = 14,00 - 8,59X^2 - 2,24Y - 7,56Y^2 \quad \text{Eq.4.2}$$

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno são apresentados (Figura 4.3), estes foram construídos a partir da equação 4.2 e mostraram o efeito das variáveis e suas interações.

Figura 4.3: Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y representando as interações entre as variáveis tempo de decantação e volume de EMB, tendo-se como resposta o rendimento do amido de gengibre.



A partir destes gráficos, é possível afirmar que dentro da região experimental estudada, as variáveis volume de extrato enzimático bruto (VEE) e tempo decantação (TD) influenciaram no processo de extração de amido.

Composição Química

A composição físico-química do amido apresenta dados importantes para seu uso e de acordo com Zhang et al., (2014) podem ser alterados dependendo do método de extração adotado. Os resultados da composição química físico-química do amido de gengibre são apresentados na Tabela 4.3.

As baixas atividades de água encontradas no amido extraído apenas em água (0,73) e o amido obtido após o tratamento enzimático (0,77) são consideradas desejáveis do ponto de vista microbiológico, embora não haja parâmetros legais determinando seu limite para amidos (Castro et al., 2018). Os baixos teores de cinzas e proteínas nos amidos refletem a alta pureza, pois a presença desses constituintes nos amidos interfere nas suas propriedades funcionais. Resultados similares foram encontrados por Nakthong et al. (2017) e Londoño-Restrepo et al., (2018).

Em relação ao teor de lipídeos verificou-se que com o tratamento enzimático o teor lipídico sofreu redução de 1,06% para 0,75%. Segundo Ascheri et al. (2010) é recomendado um teor de lipídeos inferior a 1%, pois isso torna o amido mais neutro e menos propenso à

complexação. A redução no teor de lipídeos pode ter ocorrido possivelmente devido a ação de lipases presentes no extrato multienzimático bruto, de acordo com Silva et al. (2017) o fungo *Penicillium roqueforti* sintetizou lipases (17,93 U/g) no processo fermentativo sob a casca da amêndoa de cacau.

O conteúdo de amilose quantificada no amido de gengibre extraído em água (10,70%) e no amido obtido após o tratamento enzimático (9,05%). Melo Neto et al. (2015) encontraram um conteúdo de amilose no amido de pupunha (12,40%) e Castro et al. (2018) relataram o conteúdo de amilose de 19,25%.

Tabela 4.3: Composição química do amido de rizoma de gengibre planejamento Doehlert

Componente (%)	Média	
	AC	AE
Amido	71,81± 0,11	69,07± 0,09
Amilose	10,70± 0,14	9,05± 0,11
Amilopectina	61,11± 0,05	60,02± 0,07
Proteína Bruta	0,77± 0,04	0,79± 0,02
Cinzas	0,0095± 4,48x10 ⁻⁶	0,0087± 2,06x10 ⁻⁶
Lipídeos	1,06± 0,05	0,75± 0,05
Atividade de Água	0,73± 1,52 x10 ⁻³	0,77± 1,03x10 ⁻³

* Resultados expressos em base úmida;

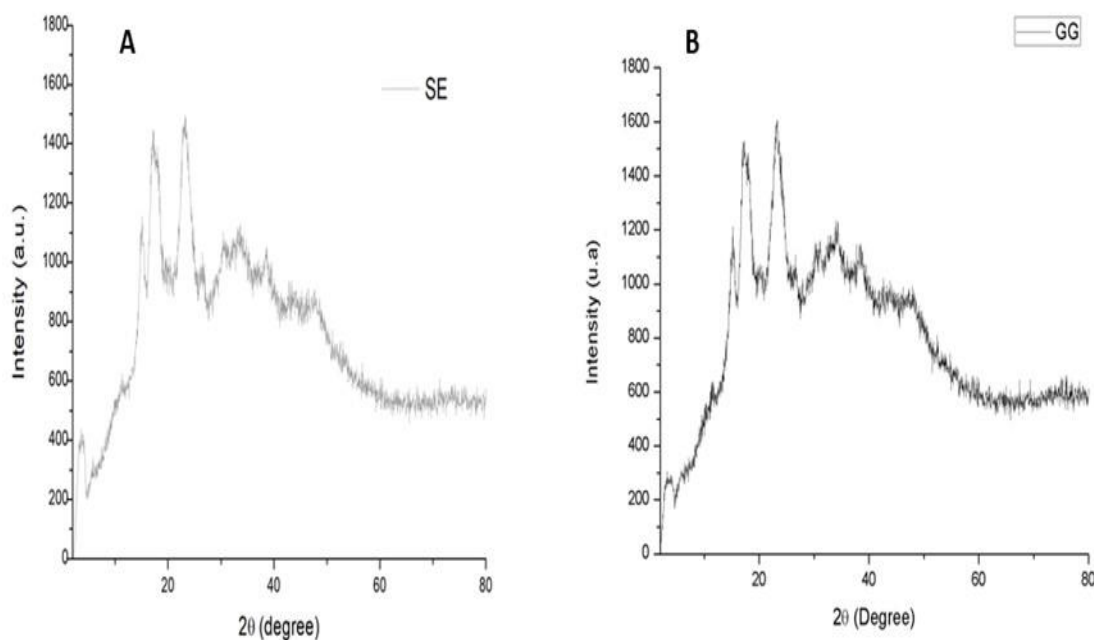
* AC, amido (controle) / AE, (amido obtido após tratamento enzimático).

Difração por Raios-X (DRX)

As técnicas de DRX são aplicadas para fornecer informações sobre a estrutura e dimensões do amido, como revisado por Blazek & Gilbert (2011). Os amidos nativos apresentam três padrões distintos de DRX (A, B e C) e diferentes graus de cristalinidade (Wang et al., 2015).

Os difratogramas de raio X dos amidos de gengibre extraídos com o tratamento enzimático (Figura 4.1 4.4B) e em água (amido controle) (Figura 4.4A) demonstraram que houve semelhanças entre os picos. O perfil de amido de gengibre extraído apenas em água foi caracterizado por três picos a 2θ 15°, 17° e 20°. Os amidos submetidos ao tratamento enzimático apresentaram picos 2θ 15,2°, 17,4° e 23°. O amido extraído em água Figura 4.4 A mostrou um pico, mais forte em torno de 20° e o amido submetido ao tratamento enzimático um pico mais elevado em 21°.

Figura 4.1: Difratoformas de raios X de amido isolado do rizoma de gengibre, **A)** extraído em água; **B)** extraído após tratamento enzimático



Os picos em 20° e 21° são picos típicos de amidos cristalinos do tipo A. Kan et al. (2016) relataram valores de picos similares para o amido de castanha e Wang et al. (2018) corroboraram com dados semelhantes em estudos realizados com o amido de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.). Os padrões de DRX dos amidos de taro apresentados por Zeng, Liu & Liu (2014) foram caracterizados por dois picos largos individuais a $2\theta = 15^\circ$ e 23° o que confere a mesma classificação tipo A.

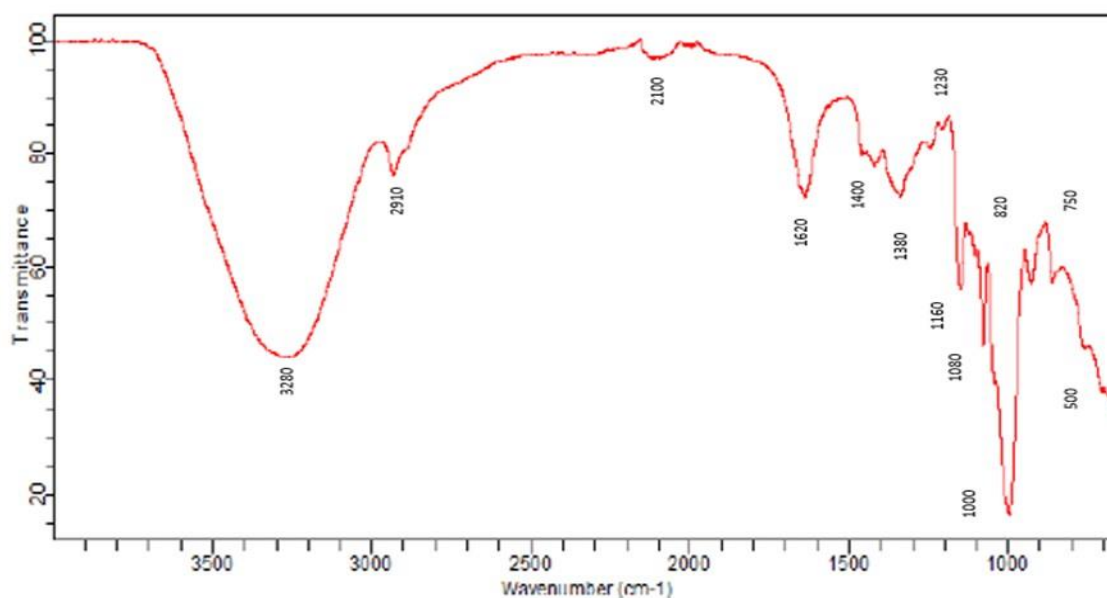
Ma & Boye (2017) explicam que amidos do tipo A, com picos na região acima abordada apresentam elevada resistência a ação enzimática, sugerindo que estes grânulos de amidos são mais homogêneos com relação à distribuição das forças internas. Baseando-se nestas informações pode-se possivelmente justificar o não rompimento das estruturas do amido de gengibre durante o tratamento enzimático.

Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os amidos extraídos dos rizomas de gengibre em água (amido controle) e os que foram obtidos após o tratamento enzimático foram avaliados por FTIR para identificação dos grupos funcionais, com o objetivo de determinar a estrutura dos amidos isolados (Warren, Gidley & Flanagan, 2015).

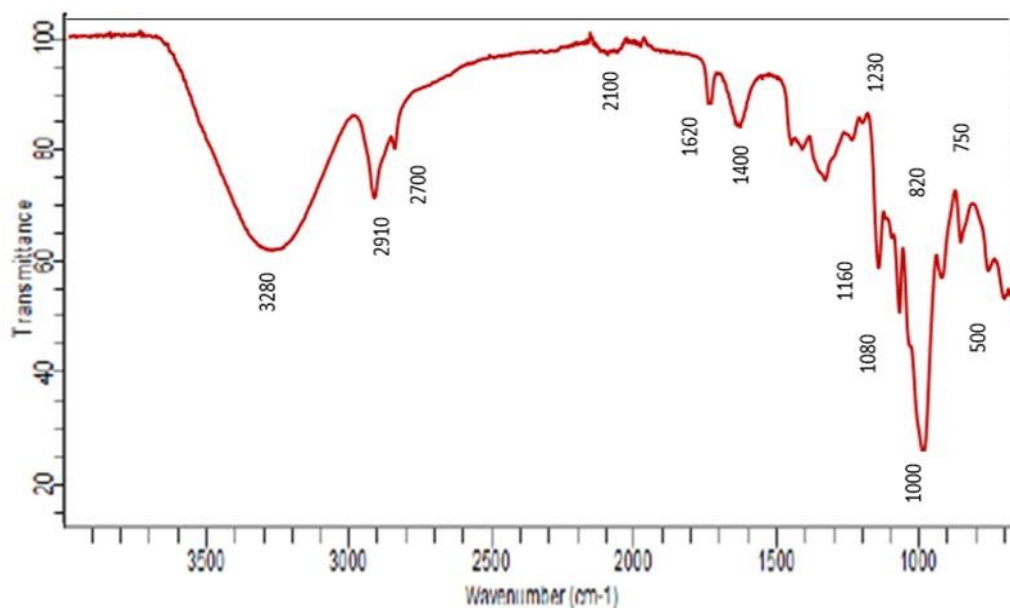
Os espectros dos amidos de gengibre extraído com água, como mostra a Figura 4.5, incluíram bandas de 3280 cm^{-1} (vibração de estiramento do grupo O-H), 2910 cm^{-1} (vibração de estiramento C-H).

Figura 4.5: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) de amido do rizoma de gengibre extraído em água.



Uma banda de 2700 cm^{-1} foi pronunciada no amido obtido após o tratamento enzimático (Figura 4.6). De acordo com Bet et al., (2017) mencionaram que após uma modificação com ácidos em amido de *Mangifera*, este apresentou bandas espectrais entre $1722\text{ cm}^{-1} - 2867\text{ cm}^{-1}$. A banda de 1620 cm^{-1} (água adsorvida presente no polissacarídeo) pronunciada nos espectros (amido controle e amido obtido após tratamento enzimático) e as bandas $1380-1400\text{ cm}^{-1}$ apontam para variações de flexão C-H. Resultados similares a estes foram abordados por Shivaraju, Appukuttan & Kumar (2018) ao analisarem amido de arroz.

Figura 4.6: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) de amido do rizoma de gengibre extraído após o tratamento enzimático.



Bandas na região de 1160 cm^{-1} (alongamento da ligação CO glicosídica) valores similares foram descritos por Policegoudra & Aradhy (2008) com banda característica do amido entre 1019 e 1156 cm^{-1} em amidos de cúrcuma. Conforme Niko-nenko et al. (2002) afirmaram que as ligações glicosídicas α -1 \rightarrow 4 em polissacarídeos são caracterizadas pela presença de bandas de absorção espectral na faixa de $1175 - 1140\text{ cm}^{-1}$.

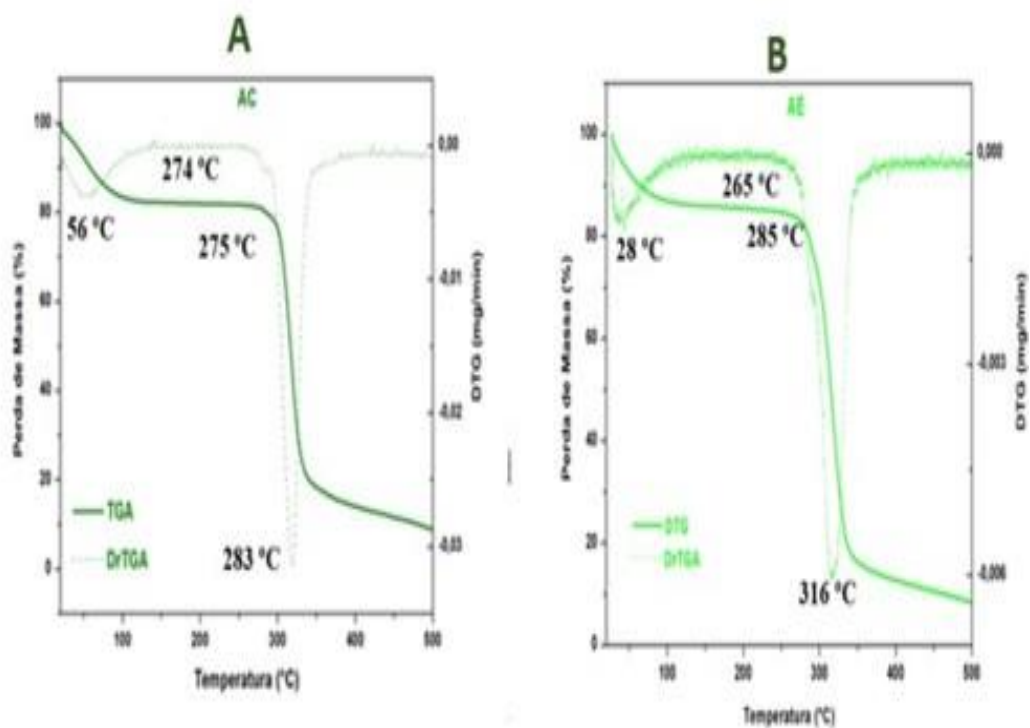
Bandas de $820-1080\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a vibração axial assimétrica do COC, a vibração axial do CO e a vibração axial da corrente principal), enquanto que as bandas de $820 - 700\text{ cm}^{-1}$ (deformação de COH lateral, CCH e grupos contendo ligações CC alongadas), $700 - 500\text{ cm}^{-1}$ (regiões do esqueleto das moléculas contendo deformações exocíclicas) presentes no amido do gengibre também foram encontradas no amido do fruto da palmeira por Melo Neto et al. (2017).

Não houve diferença significativa nas bandas de vibração dos grupos OH, CH e CO dos amidos extraídos com ou sem tratamento enzimático, o que possivelmente estar associado ao fato de que a ação enzimática não afetou as estruturas químicas básicas dos mesmos. Entretanto, em estudos realizados por Shah et al. (2017) amidos de aveia, tanto nativos quanto modificados enzimaticamente, apresentaram alterações nos picos de absorção. Os autores abordaram que o tratamento enzimático nos amidos provocou mudanças de picos de absorção nas bandas de 3400 , 2929 , 1047 e 995 cm^{-1} diminuindo os números de onda, indicando redução entre as ligações de hidrogênio e as ligações com as moléculas dos amidos.

Análises termogravimétricas – TGA

As análises termogravimétricas consistem em um método comum estabelecido para o estudo da estabilidade térmica e decomposição de polissacarídeos. O resultado da análise formal está na forma de uma curva chamada termograma. A partir das curvas obtidas por análise termogravimétrica dos amidos foi possível determinar a temperatura inicial média de degradação e observar as perdas de massas dos amidos (Lima et al., 2012). Os termogramas obtidos para o amido de gengibre (controle) e o amido extraído após o tratamento enzimático são apresentados na Figura 4.7. Pode-se notar que a temperatura inicial média de degradação do amido controle (AC) ocorreu em aproximadamente 275 °C, sendo elevado para 285 °C após o tratamento enzimático (AE), indicando que o amido tratado com enzimas pode ser aplicado em processos industriais que utilizem altas temperaturas.

Figura 4.7: Curvas TGA e DTA do amido de gengibre; A) Amido controle; B) Amido obtido após tratamento enzimático.



As etapas de decomposição térmica pronunciadas neste estudo ocorrem em três momentos. Na primeira etapa ocorreu a redução na massa do amido, esta perda de massa está associada à evaporação de água das amostras, uma vez que as cadeias de glicose que constituem o amido são interligadas e enroladas sobre si mesmas e apresentam diferentes graus de hidratação (Wahyuningtiyas et al., 2017).

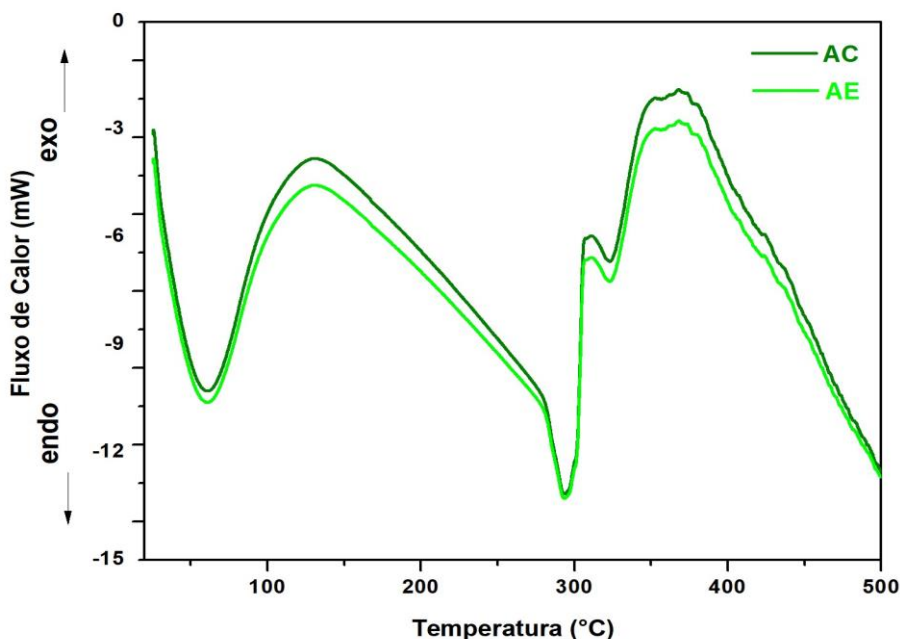
Na segunda etapa do evento térmico ocorre a liberação de matéria volátil que ocorreu para o amido obtido após o tratamento enzimático na faixa de temperatura de 285°C a 300 °C e no amido extraído em água na faixa de temperatura de 275 °C a 283°C, demonstrando mais uma vez a resistência do amido modificado enzimaticamente. Esta etapa do processo de decomposição térmica é caracterizada como a principal, isso está associado ao alto nível de perda de material (perdas de massa de 1,5 mg no amido obtido após o tratamento enzimático e 9,5 mg amido extraído em água). De acordo Azevedo et al. (2015) a rápida decomposição da matéria volátil representa a degradação do anel de glicose nos polímeros dos amidos, amilopectina e amilose.

Na terceira etapa a perda de massa esta correlacionada à oxidação da matéria orgânica e ocorreu na faixa de temperatura de 300 °C a 500° C para o amido controle e entre 320 °C a 600 °C para o amido tratado. Valores similares foram mencionados por Das, Jha & Kumar (2015) no estudo sobre a decomposição térmica do amido do rizoma de *Curcuma angustifolia*.

Calorimetria Diferencial de Varredura- DSC

As características térmicas dos amidos obtidos com e sem tratamento enzimático foram analisados por DSC e os termogramas são apresentados na Figura 4.8.

Figura 4.8- Termogramas DSC do amido de gengibre controle (AC) e amido de gengibre tratado (AE)



Os amidos obtidos apresentaram duas transições endotérmicas, o que varia de acordo com a atividade de água das amostras e com a taxa de aquecimento. Foram observados tanto no amido controle (contendo A_w igual a 0,73) como no tratado com extrato multienzimático (A_w igual a 0,77) dois picos endotérmicos que correspondem à transição ordem-desordem (gelatinização do amido). Amidos com elevada atividade água, apresentam apenas um pico endotérmico, enquanto, em baixa atividade de água observa-se dois picos endotérmicos. Se houver água suficiente nas amostras, o processo de gelatinização pode ocorrer, levando os cristais a se fundirem (Gunaratne & Corke, 2002).

Os eventos térmicos estão interligados as transformações estruturais que ocorrem nos amidos. Os valores para a transição de gelatinização observados neste trabalho para a primeira transição endotérmica foi de 105,64 °C para o amido controle e 107,5 °C para o amido tratado enzimaticamente. A temperatura de gelatinização encontrada foi em torno de 60 °C para esses amidos. No segundo evento térmico, observa-se que os valores das temperaturas dos picos endotérmicos foram de 294 °C para o amido controle e 293 °C para o amido tratado com enzimas.

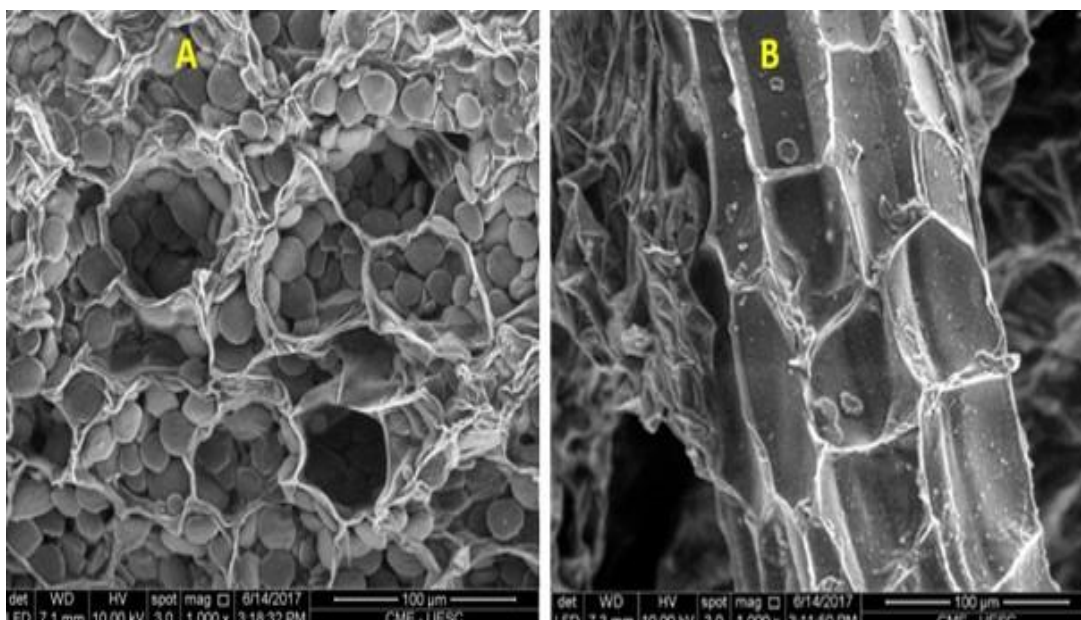
Os picos endotérmicos ocorrem de uma menor temperatura para uma maior, indicando a necessidade de mais energia térmica para quebra dos cristais do amido. Os dois picos de transição endotérmica observados nas amostras (AC) e (AE) podem ser atribuídos aos cristais

de amido tipo A que como verificado através do estudo de DRX apresentam uma maior resistência (Gunaratne & Corke, 2016). Os cristais menos estáveis se fundem na primeira transição endotérmica, enquanto os cristais mais resistentes se fundem em temperaturas mais elevadas (Yu & Christie, 2001).

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

O rizoma de gengibre é constituído morfologicamente por uma cortiça (superfícies finas). Quando um corte transversal foi efetuado no rizoma de gengibre fresco, foi possível observar através da MEV a presença de um grande número células parenquimatosas de paredes finas contendo muitos grânulos de amido e feixes fibrovasculares (Figura 4.9A). No fragmento de rizoma de gengibre submetido ao pré-tratamento enzimático, observou-se uma desorganização no tecido vegetal e a remoção dos grânulos de amido (Figura.4.9 B). A modificação na estrutura vegetal pode ser explicada pela atuação de diferentes enzimas presentes no extrato enzimático bruto, tais como; xilanases, celulases e amiloglucosidades

Figura 4.9: Eletromicrografias da estrutura vegetal- **A)** grânulos de amido em meio as células parenquimatosas (1000x), **B)** estrutura celular após o tratamento enzimático (1000x).



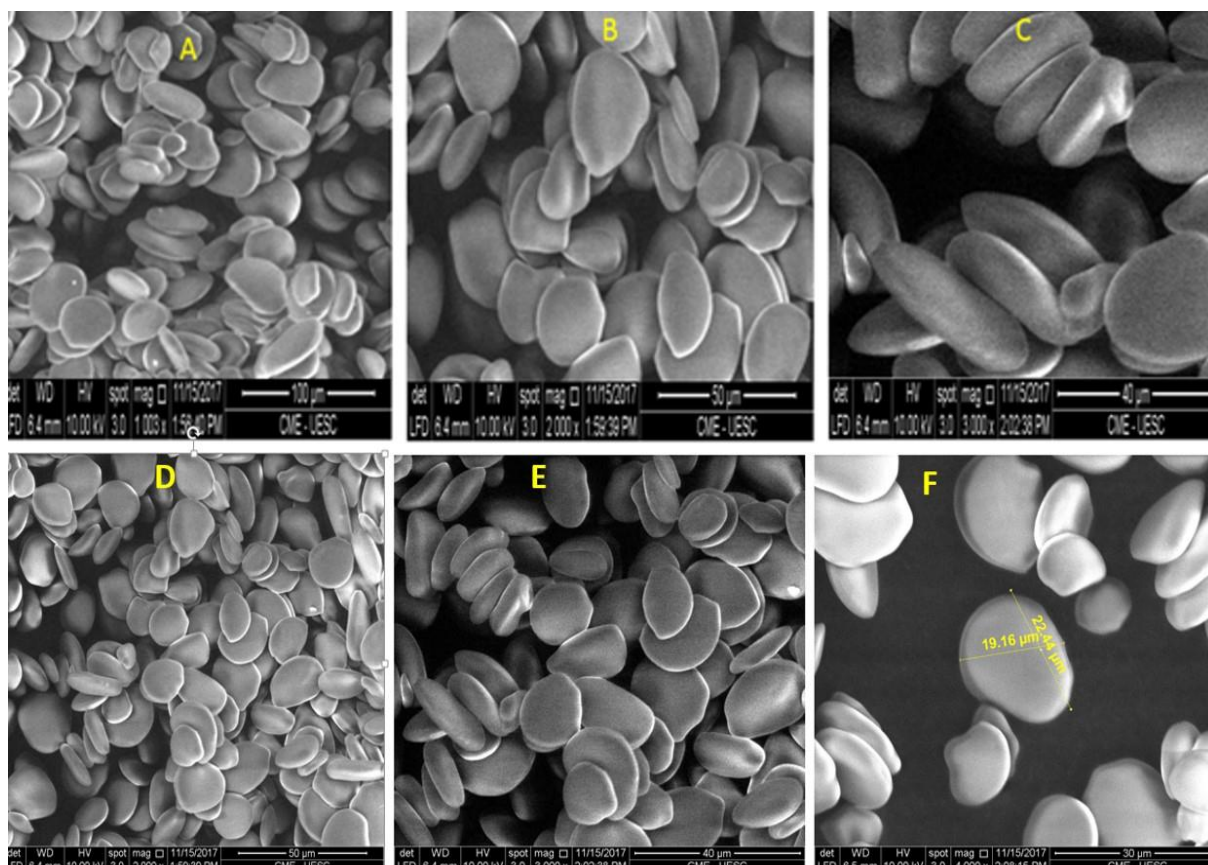
Os grânulos de amido de gengibre (*Zingiber officinale* R.) obtidos neste estudo (com e sem tratamento enzimático) podem ser visualizados através das eletromicrografias (Figura 4.10). Os grânulos de amido apresentaram forma oval e íntegra, (sem rachaduras) com

tamanhos que variaram entre si, apresentando de uma forma geral comprimento de 19 μm e 22,44 μm de largura (figura 8-F), com área igual a 423 μm^2 .

O tamanho da área dos grânulos de amidos possibilita caracteriza-los em amido do tipo A ou do tipo B (Benavent-Gil & Rosell, 2017b). Os grânulos tipo A são caracterizados por apresentar áreas grandes, enquanto os grânulos tipo B são pequenos, portanto, os amidos obtidos neste estudo podem ser considerados como do tipo A.

As eletromicrografias demonstraram que o tratamento enzimático não promoveu alterações nas estruturas dos grânulos de amido de gengibre (Figura 4.10, D, E e F), o que possivelmente pode ser associado ao tipo de amido. Segundo Copeland et al. (2009) os amidos tipos A são considerados mais resistentes aos ataques enzimáticos. Entretanto, resultados diferentes foram observados por Benavent-Gil & Rosell (2017a) que registraram que o tratamento enzimático (aplicação de amiloglicosidases, α -amilases e β -amilases) em amidos de trigo, milho, batata, mandioca e arroz, promoveu rupturas nos grânulos de amido e aumento da porosidade nas superfícies dos mesmos.

Figura 4.10: Eletromicrografias do amido de gengibre extraído em água, **A)** leitura em 1000x, **B)** 2000x, **C)** 4000x; Amido modificado enzimaticamente, **D)** leitura 2000x, **E)** 3000x, **F)** 4000x



Oyeyinka et al. (2018) relataram que os grânulos de amido extraído do caule de abacaxi (*Ananas comosus*) apresentaram tamanhos pequenos entre 5 μm e formas irregulares, sendo estas características semelhantes as relatadas por Li & Zhu (2018) que afirmaram que os grânulos de amido de quinoa (*Chenopodium quinoa*) estavam na faixa de 0.4 μm a 2.0 μm , sendo a forma dos grânulos poligonal, angular e irregular. Melo Neto et al. (2017) observaram que os grânulos de amido de pupunha (*Bactris Gasipaes kunth*) foram predominantemente esféricos, com partículas regulares, superfícies lisas e com poucas rachaduras, onde poucas partículas apresentaram deformação esférica.

O tamanho e a forma são características que podem afetar o comportamento e usos potenciais de amidos. Dentre as aplicações industriais onde os tamanhos e as formas dos grânulos são relevantes pode-se mencionar, a produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis para fax (Leonel, 2007).

Conclusão

A ferramenta de otimização matriz de Doehlert indicou os principais efeitos entre as variáveis permitindo encontrar as melhores condições. O projeto identificou que EMB pode ser aplicado durante a extração do amido melhorando o rendimento do produto. Pode-se verificar que não ocorreu modificações físicas nas estruturas dos grânulos de amido isolados em água e nos que foram submetidos ao tratamento enzimático, o que é suficiente para garantir um amido puro com características peculiares.

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura demonstraram que os grânulos de amidos apresentaram grande área e superfície íntegras. As propriedades térmicas do amido extraído com e sem EMB, demonstram que os amidos são do tipo A (DRX), que suportam maior tempo de exposição a elevadas temperaturas (TGA e DSC). Os grânulos do amido obtido após o tratamento enzimático foram mais resistentes e menos suscetíveis à quebra com o aquecimento prolongado. A caracterização do amido de gengibre demonstra seu potencial para aplicações industriais, incluindo uso alimentar e não alimentar, como em biofilmes, revestimentos e embalagens biodegradáveis.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual Do Sudoeste da Bahia (UESB) e Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

Referências

- Alcázar-Alay, S.C., & Meireles, M.A.A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from diferente botanical sources. *Food Science Techonology*, 35, 215-236. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6749>
- Andrade, L.A., Barbosa, N. A., & Pereira, J. (2017). Extraction and properties of starches from the non-traditional vegetables Yam and Taro. *Polímeros*, 27, 151-157. <https://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.04216>
- AOAC-Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of association of official analytical chemist international. Food composition; Additives; Natural contaminants. 17 th ed. Arlington: AOAC, 2002. (v. II).
- Ascheri, D. P. R., Morais, C. C., Asquieri, E. R., Carvalho, C. W. P. & Ascheri, J. L. R.(2014) Characterization of starch extracted from the roots of *Cissus simsiana* Roem. & Schult *Semina: Ciências Agrárias*, 35, 787-800. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p787>
- Avérous, L., & Halley, P.J. (2014). Starch polymers: From the field to industrial products. *Starch Polymers*, 3-10, (Chapter 1). <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53730-0.00018-x>
- Azevedo V. M, Dias M. V, Borges S. V, Letícia A., Costa R., & Keven E. (2015). Development of whey protein isolate bio-nanocomposites : Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties, *Food Hydrocolloids*, 48, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.014>
- Benavent-Gil, Y., & Rosell, C.M. (2017a). Morphological and physichemical characterization of porous starches obtained from diferente botanical sources and amyolytic enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 587-595, <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.089>
- Benavent-Gil, Y., & Rosell, C.M. (2017b). Comparison of porous starches obtained from different enzyme types and levels. *Carbohydrate Polymers*, 157, 533-540. <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10047>
- Blazeka, J. & Gilbert, E. P. (2011). Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, 85, 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.041>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.
- Buksa, K. (2018). Extraction and characterization of molecular properties of rye grain starch and its susceptibility to the resistant starch formation. *Carbohydrate Polymers*, 194, 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.024>

Castro, D.S., Moreira, I. S., Silva, L.M.M., Lima, J.P., Silva, W.P., Gomes, J.P. & Figueredo, R.M.F. (2018). Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.032>

Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. & Tang, M.C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23, 1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>

Das, D., Jha, K., Kumar, J. (2015). Isolation and release characteristics of starch from the rhizome of India Palo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 341-346. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.009>

Ferraz, J. L. A. A., Souza, L. O., Soares, G. A., Coutinho, J. P., Oliveira, J. R., Oliveira, E. Aguiar & Franco, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit, *Bioresource. Technology* 248 (2018) 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>

Franklin, M.E.E., Pushpadass, H.A., Kumar, B., Kulkarni, S., Muthurayappa, M., Kandasamy, R., Venkatachalam, P. & Vellingiri, P. (2017). Physicochemical, thermal, pasting and microstructural characterization of commercial *Curcuma angustifolia* starch. *Food Hydrocolloids*, 67, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.025>

Gunaratne, A., Hoover, R. (2002) Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers* 49,425–437. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00354-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00354-X)

Gunaratne, A., Corke, H. (2016). Starch: Analysis of Quality. *Encyclopedia of Food Grains*, 2, 198-207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00092-9>

Gilbert, G. A. & Spragg, S. P. (1964) *Iodometric determination of amylose*. In: Whistler, R. L. (Ed.) *Methods in carbohydrate chemistry starch*. (4 th ed.) New York: Academic Press, (pp. 168-169).

Guo, L., Zhang, J.J., Hu, J., Du, X.F. & Cui, B. (2017). The effects of entanglement concentration on the hydrodynamic properties of cereal starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2795-2802. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8107>

Guo, L. (2018). Sweet potato starch modified by branching enzyme, β -amylase and Transglucosidase. *Food Hydrocolloids*, 83,182-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.005>

IAL-Instituto Adolfo Lutz. (2004). *Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. (2. ed). São Paulo.

Kallman, A., Vamadevan, V., Bertoft, E., Koch, K., Seetharaman, K. & Aman, P. (2015). Thermal properties of barley starch and its relation to starch characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 692- 700. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.068>

- Kan, L., Li, Q., Xie, S., Hu, J., Wu, Y. & Ouyang, J. (2016). Effect of thermal processing on the physicochemical properties of chestnut starch and textural profile of chestnut kernel. *Carbohydrate Polymers*, 151, 614-623. [https://doi.org/ 10.1016/j.carbpol.2016.06.008](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.008)
- Leonel, M. (2007). Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 579-588. [https://doi.org/ 10.1590/S0101-20612007000300024](https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300024).
- Lessa, O. A., Reis, N.S., Leite, S.G.F., Gutarra, M.L.E., Souza, A.O., Gualberto, A.S., Oliveira, J.R., Aguiar, O. E. & Franco, M. (2018). Effect of the solid-state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids, *Food Science Biotechnology*, 27, 107-113. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0196-x>
- Li, G. & Zhu, F. (2018) Quinoa starch: structure, properties, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 181, 851-861. [https://doi.org/ 10.1016/j.carbpol.2017.11.067](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.067)
- Li, D. & Zhu, F. (2017). Physicochemical properties of kiwifruit starch. *Food Chemistry*, 220,129-136. [https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2016.09.192](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.192)
- Lima, B.N.B., Cabral, T.B., Neto, R.P. & Tavares, M.I.B. (2012). Estudo do Amido de Farinhas Comerciais Comestíveis. *Polímeros*, 22, 486-490. [https://doi.org/ 10.1590/S0104-14282012005000062](https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000062)
- Ma, Z. & Boye, J.I. (2018). Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1059-1083. [https://doi.org/ 10.1080/10408398.2016.1230537](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1230537)
- Melo Neto, B.A., Barbosa, A.A., Santos, L.C.X., Almeida, P.F., Bonomo, R.C.F. & Pontes, K.V. (2015). Chemical Composition and Functional Properties of Starch Extracted from the Pejibaye Fruit (*Bactris Gasepaes Kunth.*). *Acta Scientiarum Technology*, 37, 105–110. [https://doi.org/ 10.4025/actascitechnol.v37i1.20740](https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v37i1.20740)
- Melo Neto, B. A., Bonomo, R.C.F., Franco, M., Almeida, P.F. & Pontes, K. V. (2017) Starch extraction from the peach palm (*Bactris gasepaes kunth.*) fruit: a model approach for yield increase. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering*, 37, 148-159. [https://doi.org/ 10.1590/1809-4430](https://doi.org/10.1590/1809-4430)
- Nair, K.P.P. (2013). The agronomy and economy of ginger. *The agronomy and economy of turmeric e ginger*, (pp.225-292), (Chapter 15). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394801-4.00015-6>.
- Niko-nenko, N.A., Buslov, D.K., Sushko, N. I. & Zhibankov, R.G. (2002). Analysis of the structure of carbohydrates with use of the regularized deconvolution method of vibrational spectra. *Balikesir Universitesi Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi*, 4, 13-16.
- Oyeyinka, S. A., Sdeleke, O. F., Dauda, A. O., Abiodun, O. A., Kayode, R. M. & Adejuyitan, J. A. (2018). Flour composition and phycochemical properties of white and yellow bitter yam (*Dioscorea dumetorum*) starches. *Industrial Crops & Products* 120, 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.061>

Precha-Atsawan, S., Puncha-Arnon, S., Wandee, Y., Uttapap, D., Puttanlek, C. & Rungsardthong, V. (2018). Physicochemical properties of partially debranched waxy rice starch. *Food Hydrocolloids*, 79, 71-80, [https://doi.org/ 10.1016/j.foodhyd.2017.12.014](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.014)

Reis, N. S., Brito, A. R., Pacheco, C. S.V., Costa, L. C. B., Gross, E., Silva, T. P., Costa, A. R., Silva, E. G. P., Oliveira, R. A., Aguiar-Oliveira, E., Oliviera, J. R. & Franco, M. (2018). Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multienzymatic extract of *Aspergillus niger*, *Chemical Engineering Communications*, 205 387-397. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1494580>

Santos, T.C.D., Brito, A. B., Bonomo, R.C.F., Pires, A. J. V., Oliveira, E. A., Silva, T.P. & Franco, M. (2017). Statistical Optimization of Culture Conditions and Characterization for Ligninolytic Enzymes Produced from *Rhizopus* Sp. Using Prickly Palm Cactus Husk, *Chemical Engineering Communications*, 204 55-63. <https://doi.org/10.1080/00986445.2016.1230851>.

Shah, A, Masood, F. A., Gani, A. & Ashwar, B. (2018). (Dual enzyme modified oat starch: Structural characterisation, rheological properties, and digestibility in simulated GI tract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 140-146. [https://doi.org/ 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.013)

Shivaraju, V.S., Appukuttan, S.V. & Kumar, S. (2018). The Influence of Bound Water on the FTIR Characteristics of Starch and Starch Nanocrystals Obtained from Selected Natural Sources. *Starch – Stärke*, 71, 1-9. [https://doi.org/ 10.1002/star.201700026](https://doi.org/10.1002/star.201700026).

Silva, T.P., Souza, L.O., Reis, N.S., Assis, A.S., Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., & Franco M. (2017). Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16, 745-756.

Wahyuningtiyas, N. E., Suryanto, H., Rudiyanto, E. Sukarni, S. & Puspitasari, P. (2017). Thermogravimetric and Kinetic Analysis of Cassava Starch Based Bioplastic. *Journal of Mechanical Engineering Science and Technology*, 1, 69-77.

Wang, S., LI, C., Copeland, L., Niu, Q. & Wang, S. (2015) Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Food Science and Food Safety*, 14, 568-585. [https://doi.org/ 10.1111/1541-4337.12143](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143)

Wang, T., Wu, C., Fan, G., LI, T., Gong, H. & Cao, F. (2017). Ginkgo biloba extracts- loaded starch nano-spheres: Preparation, characterization, and in vitro release kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, p.10, [https://doi.org/ 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.012](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.012)

Warren, F.J., Gidley, M.J. & Flanagan, B. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure- a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate Polymers*, 139, 35-42. [https://doi.org/ 10.1016/j.carbpol.2015.11.066](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.066)

Yu, L. & Christie, G (2001). Measurement of starch transitions using differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 46, 179-184. · [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00301-5)

Zhang, L., Guantian, L., Sunan, W., Yao, W. & Zhu, F. (2017). Physicochemical properties of maca starch. *Food Chemistry*, 218, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.123>

Zeng, F., Liu, H. & Liu, G. (2014). Physicochemical properties of starch extracted from *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Bun-long taro) grown in Hunan, China. *Starch/Stärke*, 66, 142–148. <https://doi.org/10.1002/star.201300039>